



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-GÁSTRICA DE
NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM MODELO
EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR: ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS**

DANIELLE GALDINO DE SOUZA

**BRASÍLIA-DF
2020**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-GÁSTRICA DE
NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM MODELO
EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR: ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS**

DANIELLE GALDINO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo.

BRASÍLIA-DF
2020

DANIELLE GALDINO DE SOUZA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-GÁSTRICA DE
NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM MODELO
EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR: ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Aprovado em 23/03/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo – Orientador
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Prof^ª. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Prof. Dr. Luciano Paulino Silva
EMBRAPA – UnB

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o amor, compreensão, apoio e incentivo que sempre me ofereceram. Ao meu irmão Luís Miguel. Aos meus tios Sérgio e Maria de Lourdes. Dedico aos meus padrinhos Dr. Sebastião e Dra. Andrea. E aos amigos, os distantes, os de perto e aos que ainda não conheci.

AGRADECIMENTOS

Mestrado, para muitos pode ser apenas um nanopasso nos títulos, mas para mim, é um nanoavanço na vida.

Durante os dois anos de mestrado, aprendi lições valiosas e de fato não importa o lugar, todos nós somos humanos e erramos. Minha odisseia foi marcada por muitos estudos, aprendizados, aventuras e risadas nostálgicas. Diante disso, não poderia deixar de agradecer às pessoas e instituições que com suas nanoajudas, proporcionaram-me nanoconquistas.

Primeiramente, agradeço a Deus, que sempre está comigo e me permitiu durante esses dois anos, caminhar, falar, comer, sorrir e viver sempre saudável e perseverante mesmo diante dos medos e incertezas. Principalmente, colocando em meu caminho pessoas para iluminar a estrada dessa infinita odisseia da vida.

Agradeço aos meus pais, Antonia e Rosemaqui, por todo o apoio desde sempre e, principalmente, por terem me ajudado muito desde a aprovação no processo seletivo de mestrado. Cada nanoavanço na minha vida é dedicada e agradecida a vocês!

Ao meu irmão que nas horas de desespero com notebook travando e me deixando nervosa, sempre me ajudou a resolver a situação mesmo estando longe. Te amo muito!

Aos meus tios Sérgio e Maria de Lourdes por terem me acolhido no início do mestrado em sua moradia. Foram meses de imenso aprendizado e risos com minha prima. Gostaria de ter ficado mais tempo com todos, porém precisei encarar novos horizontes para amadurecer.

Aos meus padrinhos, Dr. Sebastião e Dra. Andrea, que desde minha infância sempre estiveram torcendo por meu sucesso na vida e ajudando minha família. Agradeço por terem nos inserido em seu núcleo familiar e nos acolhido com muito amor. Aprendi muito com vocês, tanto como meus padrinhos como meus chefes. Mesmo, na época, eu não entendendo exatamente as lições que recebia, foi durante o mestrado que consegui entender que todas as lições recebidas eram para meu próprio amadurecimento. Agradeço também a todos os médicos da Policlínica Modelo de Porangatu-GO, por todo o carinho e apoio que sempre deram a minha família e a mim.

A minha amiga Poliana que foi a pessoa que mais me incentivou a dar prosseguimento nos estudos após o término da graduação. Foi com ela que aprendi a viajar mais para fazer especialização em Urgência e Emergência, tornando-me mais independente. Foi com ela que aprendi a chutar o balde quando a mãe queria me guardar dentro de um potinho e eu precisava sair e voar para conhecer novos horizontes. Se hoje estou escrevendo agradecimentos numa dissertação de mestrado, é porque essa amiga querida proporcionou com suas nanoajudas e nanoconselhos, os meus nanoavanços e nanoamadurecimentos. Muito obrigada!

Ao meu orientador, Dr. João Paulo Longo, que literalmente me acolheu como um pai acolhe uma filha sem lar, quando a orientadora escolhida não pôde me orientar. Mesmo não sabendo quem eu era, mesmo não sabendo a cor do meu cabelo, mesmo não sabendo se eu tinha olhos azuis ou verdes e mesmo não sabendo nada sobre minha vida acadêmica, fui recebida de braços abertos e tenho muita honra ter sido orientada por esse magnífico professor. Agradeço pelos nanoaprendizados que sempre levarei comigo, o imenso apoio em todos os momentos e as nanopiadadas que não podem faltar. *‘Quando o professor olha nos teus olhos e, sem precisar de nenhuma palavra sua, percebe que você não entendeu sobre a Lei da Troca Equivalente.*

Ele volta a explicar tudo desde o início, mas de uma maneira especial, como se estivesse explicando para uma criança'. Este sim é um verdadeiro professor e um grande mestre, aquele que só de olhar nos olhos de seu aluno percebe tudo e transforma o difícil em algo simples e divertido. Professor e orientador João Paulo é assim, sua humildade e jeito de conversar transborda pelos sete mares, e tenho a imensa satisfação de tê-lo conhecido e ter sido sua orientanda.

Ao professor Dr. Ricardo Bentes, que foi outro pai para mim, sempre atencioso e disposto a ajudar no que eu precisava. Seus '*Bom dia*' e abraços fizeram muita diferença, principalmente nos dias que a vida me oferecia limão. Outro magnífico professor que não merece Palmas, mas o Tocantins inteiro!

A professora Dra. Anamélia Lorenzetti e ao grupo do Laboratório de Imunologia Aplicada (CEL-IB-UnB) pelo apoio na realização do projeto em modelo experimental de fibrose pulmonar e doação dos materiais necessários. Em especial, a Karina, por além de ter transmitido seus conhecimentos sobre fibrose pulmonar, deu dicas de melhoria no projeto, acompanhou-me durante todas as fases, desde a indução inflamatória até a análise de dados, ajudando-me a amadurecer nessa etapa de vida acadêmica e científica. Mesmo não estando mais no Brasil, desejo muito sucesso e felicidade a Dra. Karina Smidt. Sinto-me honrosa de ter aprendido e trabalhado com a pioneira em modelo experimental de fibrose pulmonar em BALB/c. A Luiza e Stephan por terem me auxiliado durante os experimentos, ajudando-me com os procedimentos experimentais, seja anestesiando, como no caso da Luiza, ou realizando processos cirúrgicos, como no caso do Stephan. A esta equipe maravilhosa, meus sinceros agradecimentos!

Aos professores, Dr. César Augusto Melo-Silva e Dra. Verônica M. Amado, por terem cedido o espaço do Laboratório de Fisiologia Respiratória (FS-UnB) e sua infraestrutura para a concretização do projeto com a mecânica ventilatória. Os quatro dias consecutivos de experimentos foram de intenso aprendizado! Muito obrigada.

A professora, Dra. Selma Aparecida Souza, e a técnica, Msc. Maria da Glória da Silva, do Laboratório de Histologia e Embriologia (FS-UnB) por terem cedido o espaço e sua infraestrutura para o processamento dos materiais histopatológicos. Aprendi muito, durante quatro dias consecutivos, com a técnica Glorinha sobre como executar as etapas de desidratação, diafanização e emblocamento das amostras, e os métodos de coloração da lâmina. Esta bagagem de aprendizado será levada por toda minha vida. Muito obrigada!

Aos técnicos, Karen e Diogo, do Laboratório Nanobiotecnologia (GEM-IB-UnB) que sempre estiveram solícitos em me ajudar com o que eu precisei, seja com materiais, conselhos e ensinamentos no manuseio de equipamentos. Em especial, a Karen que me ajudou a conseguir algo em menos de 1 hora, sendo que deveria ter pedido com antecedência de 1 mês. Aprendi a lição e agradeço muito pelo empenho de ter contribuído para a realização deste projeto.

Ao grupo de pesquisa NanoBioImage (Débora, Luiza, Marina, Camila, Nelice, Thyago e Jayne) coordenado pelo professor Dr. João Paulo. Cada um teve nanopapeis essenciais nas minhas nanoconquistas. Em especial, a Débora, minha amiga, conselheira, companheira de doces, de passeios, de compras e de estudos. Foi a primeira pessoa que me acolheu no âmbito laboratorial e me ajudou a dar os primeiros passos em experimentos, possibilitando eu dar o prosseguimento em sua produtividade científica, realizada durante seu doutorado com suplementação oral de nanoemulsão de óleo de peixe. Em especial, a Nelice que foi a minha primeira amiga de mestrado, e no momento mais indeciso da minha vida, foi ela quem me deu um empurrão e disse para eu continuar seguindo em frente e não desistir, afinal "*quando se*

começa algo, tem que ir até o fim”. Em especial, ao Thyago que com seus conhecimentos em análises de Micro-TC, ajudou-me em tudo que precisei, ensinando-me desde segmentar um pulmão por duas técnicas diferentes até fazer vídeo de imagens em 3D. Amigos como esses não se encontra em qualquer esquina da vida. Muito obrigada a todos!

Ao Athayde que me ajudou com os procedimentos do pré-tratamento durante 21 dias consecutivos. *“É fácil pedir ajuda das pessoas, é fácil a pessoa aceitar te ajudar, mas não é nada fácil essas pessoas terem o compromisso de ir até o fim com você.”* Sem esse garoto, eu não teria conseguido tornar o delineamento possível devido a inexperiência na época com o método de gavagem. Muito obrigada pelos 21 dias de aprendizado!

A Rayane que no meu maior momento de desespero da penúltima semana dos experimentos, conseguiu me tranquilizar e com toda sua paciência me ensinou a fazer algo que tentei aprender por muitos dias e para muitos é fácil, mas para mim era mais difícil que puncionar veia de paciente: anestesiá-los camundongos pela via intraperitoneal. Devo muito a essa garota. Hoje tenho experiência e consigo executar atividades no manuseio de animais com a maior facilidade devido a essa pessoa. *“Às vezes só precisamos que alguém acredite em nós, pegue na nossa mão e caminhe junto com a gente comendo doces, para conseguirmos confiar em nós mesmos.”* Muito obrigada pelos cinco meses de aprendizado no Micro-TC!

A Fernanda que com suas nanopiadadas deixaram meus dias mais leves. Seus conselhos e ensinamentos vou levar para vida toda.

A Francielli do Projeto Rafa que sofreu durante seus próprios experimentos e compartilhou seus medos e incertezas comigo, em um momento que eu também estava passando por situações semelhantes às dela. Ambas de nós sofremos e lutamos juntas, dando nosso melhor no projeto, mesmo diante dos desafios existentes, devido nossa inexperiência. Uma ajudou a outra apenas pelas horas de desabafo. *“Afinal, ninguém nasce sabendo, a vida é uma escalada de aprendizados.”*

Aos colegas Alan, Victor Melo, Giulia, Mosar, Marina, Lucas, Beatriz, Patrícia e Amanda que também me ajudaram nessa jornada de aprendizados.

A Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia e a Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas, pela oportunidade de proporcionar uma infraestrutura para estudos tão promissores na vida acadêmica, não só minha, mas de todos que chegam para alcançar nanoavanços.

Agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Agradeço imensamente às agências de fomento CAPES, CNPq, FINATEC, FINEP e FAP-DF.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”.
– Isaac Newton

“A alquimia é uma ciência de compreensão, decomposição e recomposição da matéria. Contudo, não é uma técnica onipotente, pois não é possível criar algo do nada. Se você deseja obter alguma coisa, é preciso pagar um preço, e este é o fundamento da alquimia, a chamada Lei da Troca Equivalente.”

—Fullmetal Alchemist Brotherhood.

RESUMO

A fibrogênese é o equilíbrio entre os fatores que promovem a biossíntese, o acúmulo de matriz extracelular e sua degradação em tecidos conjuntivos, promovendo a homeostasia. Entretanto, diante da ruptura do equilíbrio homeostático, ocorre a superprodução de matriz extracelular, acarretando no desenvolvimento heterogêneo e progressivo de tecido fibrótico pela extensão tecidual. Nesse sentido, o tecido pulmonar, condicionado a desenvolver processos patológicos com características fibróticas, demonstra preocupação entre os estudiosos, necessitando de estratégias terapêuticas que viabilizem a homeostasia pulmonar, em virtude de não existirem medicamentos que inibam a progressão da patologia, apenas desacelere. Assim sendo, com base nos mecanismos inflamatórios que podem desencadear o processo progressivo da FP, verificou-se que o uso de ácidos graxos poli-insaturados, como ômega-3, podem modular a resposta inflamatória na produção de eicosanoides anti-inflamatórios e de pró-resolução. Nesse sentido, a administração de EPA e DHA vem sendo utilizada com o intuito de atenuar e/ou até mesmo inibir a progressão fibrótica. Contudo, os fatores envolvidos na baixa solubilidade em água, menor estabilidade química e biodisponibilidade desses ácidos graxos condicionam em desafios para garantir a rápida absorção na membrana celular e eficácia terapêutica. É nesse contexto que, com a utilização das aplicabilidades da nanotecnologia, tornou-se possível o estabelecimento de um nanocarreador lipídico para a administração intra-gástrica do óleo de peixe, enriquecida de EPA e DHA, com finalidades de prevenção da inflamação. Dessa forma, tendo em vista que na literatura, não existem estudos que conferem a utilização de nanoemulsão de óleo de peixe em modelo experimental de FP, o objetivo deste trabalho foi verificar se a administração intra-gástrica de NEW3 pode influenciar nos aspectos morfofisiológicos em modelo experimental de FP. Para este fim, foi necessário estabelecer um pré-tratamento durante 21 dias por via oral em camundongos BALB/c fêmeas, realizando, logo após, o desafio inflamatório pulmonar com o uso do fármaco bleomicina por procedimento cirúrgico via intratraqueal. Foram utilizadas diferentes técnicas de análise como a histopatológica, técnica de imageamento *in vivo*, mensuração da frequência respiratória e mecânica ventilatória. Contudo, o tempo de duração estabelecido após o desafio inflamatório correspondeu ao 29°, 33° e 36°, aproximadamente um mês após a indução inflamatória. Utilizando essas técnicas, verificou-se que, diante dos grupos experimentais, controle negativo, controle positivo, OG, OP e NEW3, ocorreu a progressão de um processo fibrótico em todos os grupos, entretanto, enquanto que o grupo pré-tratado com OG apresentou exacerbação da condição patológica, o grupo pré-tratado com NEW3 demonstrou a atenuação diante da progressão da FP, evidenciado por alvéolos pulmonares sem acúmulo exacerbado de massas fibróticas e ausência de deformação na estrutura alveolar, área do espaço aéreo pulmonar não apresentou diferença estatística com o grupo controle negativo ($p < 0,05$), ausência de septos interlobulares radiopacos, arquitetura pulmonar preservada, e não apresentou diferença estatística com o grupo controle negativo ($p < 0,05$) nos parâmetros da mecânica ventilatória, resistência do sistema respiratório, complacência do sistema respiratório, elastância do sistema respiratório, resistência newtoniana, resistência tecidual e elastância tecidual. Dessa forma, o pré-tratamento com administração intra-gástrica de NEW3 condicionou uma proteção pulmonar ao comparar com outros grupos que apresentaram alterações significativas para com o grupo controle negativo PBS ($p < 0,05$), proporcionando uma repercussão satisfatória em modelo experimental de fibrose pulmonar com camundongos pré-tratados com a NEW3.

Palavras-chave: Fibrose pulmonar. Ômega-3. Administração intra-gástrica. Nanoemulsão. óleo de peixe.

ABSTRACT

Fibrogenesis is the balance between factors that promote biosynthesis, the accumulation of extracellular matrix and its degradation in connective tissues, promoting homeostasis. However, in the face of disruption of the homeostatic balance, there is an overproduction of extracellular matrix, resulting in the heterogeneous and progressive development of fibrotic tissue by tissue extension. In this sense, the lung tissue, conditioned to develop pathological processes with fibrotic characteristics, shows concern among scholars, requiring therapeutic strategies that make pulmonary homeostasis feasible, since there are no drugs that inhibit the progression of the pathology, just slow down. Therefore, based on the inflammatory mechanisms that can trigger the progressive process of PF, it was found that the use of polyunsaturated fatty acids, such as omega-3, can modulate the inflammatory response in the production of anti-inflammatory and pro-eicosanoids. -resolution. In this sense, the administration of EPA and DHA has been used in order to attenuate and / or even inhibit fibrotic progression. However, the factors involved in low water solubility, less chemical stability and bioavailability of these fatty acids condition challenges to ensure rapid absorption in the cell membrane and therapeutic efficacy. It is in this context that, with the use of the applicability of nanotechnology, it became possible to establish a lipid nanocarrier for the intra-gastric administration of fish oil, enriched with EPA and DHA, with the purpose of preventing inflammation. Thus, considering that in the literature, there are no studies that confer the use of fish oil nanoemulsion in an experimental model of PF, the objective of this work was to verify whether the intra-gastric administration of NEW3 can influence the morphophysiological aspects in a model experimental FP. For this purpose, it was necessary to establish a pre-treatment for 21 days orally in female BALB / c mice, performing, immediately after, the pulmonary inflammatory challenge with the use of the bleomycin drug by an intratracheal surgical procedure. Different analysis techniques were used, such as histopathology, in vivo imaging technique, measurement of respiratory rate and ventilatory mechanics. However, the duration established after the inflammatory challenge corresponded to 29 °, 33 ° and 36 °, approximately one month after the inflammatory induction. Using these techniques, it was found that, in the face of the experimental groups, negative control, positive control, OG, OP and NEW3, a fibrotic process progressed in all groups, however, while the group pretreated with OG presented exacerbation of the pathological condition, the group pretreated with NEW3 demonstrated attenuation due to the progression of PF, evidenced by pulmonary alveoli without exacerbated accumulation of fibrotic masses and absence of deformation in the alveolar structure, an area of the pulmonary air space that did not show statistical difference with the negative control group ($p < 0.05$), absence of radiopaque interlobular septa, preserved pulmonary architecture, and there was no statistical difference with the negative control group ($p < 0.05$) in the parameters of ventilatory mechanics, respiratory system resistance, complacency of the respiratory system, elastance of the respiratory system, Newtonian resistance, tissue resistance dual and tissue elastance. Thus, the pretreatment with intra-gastric administration of NEW3 conditioned pulmonary protection when compared with other groups that showed significant changes with the negative control group PBS ($p < 0.05$), providing a satisfactory repercussion in an experimental model of pulmonary fibrosis with mice pretreated with NEW3.

Keywords: Pulmonary fibrosis. Omega 3. Intra-gastric administration. Nanoemulsion. Fish oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema pulmonar das vias aéreas inferiores.....	18
Figura 2. Esquema da metabolização de eicosanoides.....	24
Figura 3. Etapas de processamento do material histopatológico.....	34
Figura 4. Imagem representativa do método utilizado para calcular a área do espaço aéreo pulmonar.....	35
Figura 5. Aparelho de microtomografia computadorizada Albira no GEM-IB-UnB	37
Figura 6. Representação esquemática do interior do aparelho de microtomografia computadorizada Albira no GEM-IB-UnB	37
Figura 7. Esquema do desenho experimental <i>in vivo</i>	39
Figura 8. Massa corpórea dos camundongos durante o pré-tratamento ao longo de 21 dias. 40	
Figura 9. Massa corpórea dos camundongos ao longo de 36 dias após o desafio inflamatório pulmonar.....	41
Figura 10. Sobrevida dos camundongos ao longo de 36 dias após o desafio inflamatório pulmonar.....	43
Figura 11. Análise histológica do parênquima pulmonar de camundongos BALB/c após desafio inflamatório, corados nas técnicas de H&E e tricrômico de masson.....	44
Figura 12. Área do espaço aéreo pulmonar	45
Figura 13. Escala do grau de fibrose pulmonar.....	46
Figura 14. Análise em microtomografia computadorizada	48
Figura 15. Frequência Respiratória no 29° dia após desafio inflamatório	49
Figura 16 Resistência do Sistema Respiratório no 36° dia após desafio inflamatório	51
Figura 17. Complacência do Sistema Respiratório no 36° dia após desafio inflamatório	51
Figura 18. Elastância do Sistema Respiratório no 36° dia após desafio inflamatório.....	52
Figura 19. Resistência Newtoniana no 36° dia após desafio inflamatório	52
Figura 20. Resistência tecidual no 36° dia após desafio inflamatório.....	53
Figura 21. Elastância Tecidual no 36° dia após desafio inflamatório.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação dos grupos que foram utilizados no trabalho.....	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

2D -	Bidimensional
3D -	Três dimensões
AA -	Ácido Araquidônico
ALA -	Ácido α -linolênico
B&W -	Preto e Branco (Do inglês, <i>Black and White</i>)
BLM -	Bleomicina
C7 -	7ª vértebra cervical
CEL -	Departamento de Biologia Celular
CEUA -	Comitê de Ética no Uso Animal
CmH₂O -	Centímetros de água
COD -	Coefficiente de Determinação
COX -	Ciclooxigenase
Csr -	Complacência do Sistema Respiratório
DF -	Distrito Federal
DHA -	Ácido Docosahexaenóico
Et -	Elastância tecidual
EPA -	Ácido Eicosapentaenóico
ERO -	Espécies reativas de oxigênio
Esr -	Elastância do Sistema Respiratório
EUA -	Estados Unidos da América
FC -	Fibrose Cística
FOV -	Medição do Campo de Visão
FP -	Fibrose Pulmonar
FPI -	Fibrose Pulmonar Idiopática
FS -	Faculdade de Ciências da Saúde
g -	grama
GEM -	Departamento de Genética e Morfologia
H&E -	Hematoxilina e Eosina
IB -	Instituto de Ciências Biológicas
IL -	Interleucina
INS -	Instituto Nacional de Saúde
kV -	Kilovolt

LA -	Ácido linoléico
LIA -	Laboratório de imunologia aplicada
LOX -	Lipoxigenase
LTs -	Leucotrienos
M1 -	Macrófago tipo 1
M2 -	Macrófago tipo 2
MEC -	Matriz extracelular
μL -	Micro litro
μm -	Micrômetro
mA -	Miliampere
Micro-TC -	Microtomografia computadorizada
Mg/kg -	Miligrama por kilograma
Mg/mL -	Miligrama por mililitro
NEW3 -	Nanoemulsão de óleo de peixe
Nm -	Nanômetro
OG -	Óleo de girassol
ω-3 -	Ômega-3
ω-6 -	Ômega-6
OP -	Óleo de peixe
PBS -	Solução salina tamponada de fosfato
PDI -	Índice de polidispersão
PEEP -	Pressão positiva expiratória final
PGs -	Prostaglandinas
PLA2 -	Fosfolipase A2
PQ -	Paraquat
PUFAs -	Ácidos graxos poli-insaturados, do inglês <i>PolyUnsaturated Fatty Acid</i>
Rt -	Resistência tecidual
RM -	Ressonância magnética
Rn -	Resistência newtoniana
Rsr -	Resistência do Sistema Respiratório
TGF -	Fator de Transformação do Crescimento Beta 1, do <i>Transforming Growth Factor</i>
TNF -	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>

TXs -	Tromboxanos
UCB -	Central da Universidade Católica de Brasília
UnB -	Universidade de Brasília
VD -	Valores diários
α -	Alpha
β -	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Morfofisiologia pulmonar x inflamação	18
1.2	Fibrose pulmonar	19
1.3	Fibrose pulmonar induzida por bleomicina	20
1.4	Estratégias terapêuticas para fibrose pulmonar com PUFAs	21
1.5	PUFAs e seu papel no processo inflamatório do organismo	22
1.6	Administração oral com EPA e DHA na fibrose pulmonar	24
1.7	Nanoemulsão x PUFAs ômega-3	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Óleos utilizados no pré-tratamento	29
4.2	Nanoemulsão utilizada no pré-tratamento	29
4.3	Animais	29
4.4	Grupos experimentais	30
4.5	Pré-tratamento	31
4.6	Desafio inflamatório pulmonar	31
4.7	Mensuração da frequência respiratória	31
4.8	Mecânica ventilatória pulmonar	32
4.9	Histologia pulmonar	33
4.9.1	Remoção do pulmão direito	33
4.9.2	Fixação e preparo das lâminas	33
4.9.3	Técnicas para coloração das lâminas	34
4.9.4	Análise histopatológica e morfométrica	34
4.10	Técnica de imageamento <i>in vivo</i>	36
4.10.1	Realização do procedimento	36
4.10.2	Processamento das imagens 2D e 3D	37
4.11	Análise estatística	37
5	RESULTADOS	39
5.1	Nanoemulsão de óleo de peixe	39

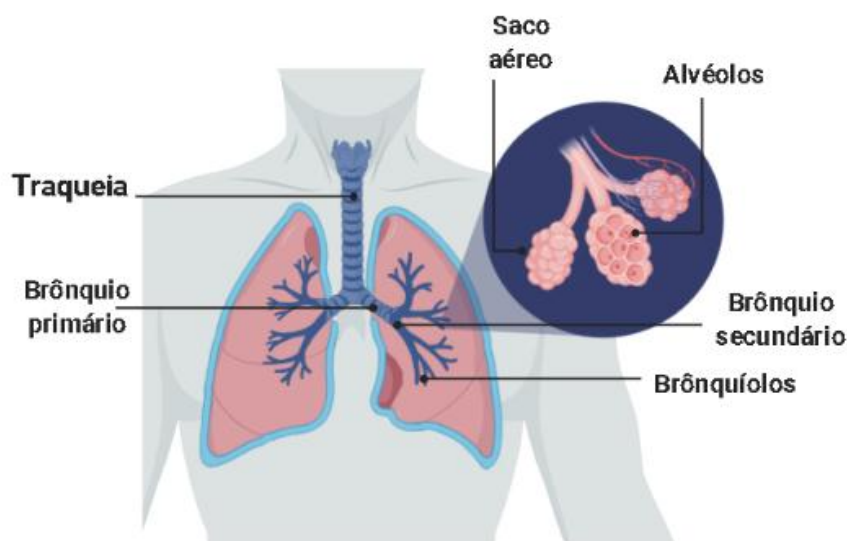
5.2	Análise da massa corpórea dos camundongos	40
5.3	Sobrevida dos camundongos.....	41
5.4	Aspectos morfológicos pulmonares	42
5.4.1	Análise histopatológica	42
5.4.2	Análise em microtomografia computadorizada.....	46
5.5	Aspectos fisiológicos da função pulmonar	49
5.5.1	Frequência respiratória	49
5.5.2	Mecânica ventilatória pulmonar	49
6	DISCUSSÃO	54
6.1	Considerações gerais	54
6.2	Correlação entre massa corpórea e frequência respiratória	55
6.3	Correlação entre análise histopatológica e microtomografia computadorizada	56
6.4	Correlação entre mecânica ventilatória pulmonar e análise histopatológica	59
6.5	Relevância do estudo	62
6.6	Críticas ao estudo.....	63
6.7	Perspectivas ao estudo	64
7	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	PRINCIPAIS ATIVIDADES DURANTE MESTRADO ACADÊMICO	72
	ANEXO I	74
	ANEXO II.....	75
	ANEXO III	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morfofisiologia pulmonar x inflamação

Relacionado aos aspectos morfológicos e fisiológicos dos pulmões, estes são órgãos que apresentam características elásticas e esponjosas, divididos em porção esquerda e direita, sendo, cada uma destas, segmentada em dois e três lobos, respectivamente. Os lobos superiores e inferiores são separados pelas fissuras oblíquas, enquanto que o lobo superior e médio é separado pela fissura horizontal, contribuindo para a movimentação respiratória e acomodando a maior distensão dos órgãos durante a respiração (MUKHIA et al., 2019).

A estrutura das vias respiratórias é dividida em vias aéreas superiores, constituídas pelas fossas nasais, faringe e laringe. Enquanto que as vias aéreas inferiores, correspondem à traqueia e brônquios, e pela porção alveolar, constituída pelos bronquíolos, sacos aéreos e alvéolos pulmonares (Figura 1). A caixa torácica ou caixa óssea, por sua vez, é formada pelo osso esterno, costelas e coluna vertebral, sendo a mais proeminente a 7ª vértebra cervical (C7) (GANAPATHY et al., 2019).



Created in BioRender.com bio

Figura 1. Esquema pulmonar das vias aéreas inferiores. Criado em BioRender.com.

Os alvéolos são os principais responsáveis pelas trocas gasosas, com estrutura de parede elástica e fina, e estando dispostos em grupos no final dos bronquíolos respiratórios.

Por ser um tipo de epitélio exposto à atmosfera do ambiente, estes alvéolos possuem uma grande quantidade de macrófagos residentes que protegem o órgão de possíveis agressões externas (PARKER, 2017).

Esses macrófagos alveolares residentes são um dos responsáveis por regular o processo inflamatório tecidual, podendo ser polarizado em Macrófago tipo 1 (M1), com fenótipo pró-inflamatório ou em Macrófago tipo 2 (M2), com fenótipo anti-inflamatório. Normalmente, estes perfis fenotípicos dos macrófagos estão em equilíbrio e atuam para a resolução da agressão pulmonar e sua consequente reepitelização fisiológica (VELDHUIZEN et al., 2019).

Em alguns eventos, não completamente compreendidos, este equilíbrio é perdido e ocorre uma produção excessiva de mediadores inflamatórios, tais como o Fator de Transformação do Crescimento Beta 1 (Do inglês, *Transforming Growth Factor Beta 1*, TGF- β 1), Fator de Necrose Tumoral Alfa (Do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*, TNF- α), Interleucina (IL)-1 β e IL-6, que, por sua vez, vão promover a quimiotaxia de células inflamatórias, ativação e diferenciação de células mesenquimais em células com características fenotípicas de miofibroblastos, estes responsáveis, principalmente, pela síntese de colágeno da matriz extracelular (MEC). A presença da disrupção do equilíbrio homeostático e a superprodução da MEC está, justamente, correlacionada com a fibrogênese e a progressão fibrótica (KADOTA et al., 2020).

1.2 Fibrose pulmonar

A fibrogênese é um processo natural fisiológico de reparo tecidual, ocorrendo, especialmente, nos tecidos conjuntivos, devido a abundante presença de MEC. Em situações de desregulação da homeostase normal, esse processo pode ser exacerbado e gerar efeitos deletérios ao funcionamento fisiológico dos tecidos. Nestes casos, essa produção desregulada é conhecida como fibrose (GLASSER et al., 2016; KADOTA et al., 2020).

Por sua vez, a fibrose pode ocorrer em todos os tecidos, mas sua prevalência é em tecidos que são expostos frequentemente a agentes químicos e biológicos. É considerada como o resultado final do processo patológico de doenças hepáticas, renais e insuficiência cardíaca, além disso, pode influenciar a invasão do tumor e metástase. Apesar das distintas características etiológicas e clínicas, os distúrbios fibróticos produzem fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, que estimulam a deposição exagerada e desorganizada de MEC com componentes como ácido hialurônico,

fibronectina e colágenos intersticiais que, progressivamente, vão remodelando a arquitetura tecidual e prejudicando seu funcionamento (WYNN; RAMALINGAM, 2012).

A fibrose também é uma característica de diferentes doenças respiratórias, podendo ocorrer na parede e ao redor das vias aéreas ou no parênquima pulmonar. Na fibrose pulmonar idiopática (FPI), é particularmente proeminente, causando cicatrizes irreversíveis nos pulmões e insuficiência respiratória. É uma patologia, principalmente, diagnosticada em idosos entre 50 a 70 anos ou pacientes com histórico de tabagismo, sendo predominante mais em homens do que em mulheres e possuindo um mau prognóstico, com sobrevida mediana entre 2 a 5 anos (MURTHA et al., 2017). A progressão da doença é imprevisível, podendo variar entre longos períodos de estabilidade clínica e exacerbações agudas devido às descompensações da homeostasia do organismo (ZOU et al., 2020).

Apesar de sua etiologia ainda não estar bem delineada, por isso o termo ‘idiopático’, as literaturas consentem ao fato de que a FPI é iniciada por lesões persistentes ao epitélio alveolar, no qual, por razões ainda incompreendidas, a subsequente resposta do reparo à lesão pulmonar é altamente desregulada, resultando na persistência de fibroblastos e no excesso de proteínas da MEC que compõem as paredes dos alvéolos pulmonares. Histologicamente, compreende em infiltrado inflamatório, proliferação de fibroblastos, comprometimento heterogêneo de espessamento intersticial, com áreas alternantes de fibrose e remodelação com aspecto de favo de mel (MURTHA et al., 2017).

Diante disso, a fibrose pulmonar (FP) é caracterizada por apresentar danos nas células epiteliais alveolares, liberação subsequente de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, acúmulo de fibroblastos ativados, miofibroblastos em focos fibróticos e a excessiva deposição anormal de proteínas da MEC, ocasionando na remodelação da arquitetura pulmonar. Outras características são o enrijecimento do tecido pulmonar, redução do tamanho dos pulmões e perda gradativa da capacidade respiratória (LIU; SANTOS; PHAN, 2017).

1.3 Fibrose pulmonar induzida por bleomicina

Contudo, dentre os fatores de risco que podem contribuir para a ativação do processo inflamatório e resultar numa FP, existem: (1) a inalação de partículas, como amianto ou sílica; (2) tabagismo; (3) infecções virais e (4) exposição à radiação ionizante. Além destes, foi identificado que algumas drogas citotóxicas, tais como a Bleomicina (BLM), podem causar a FP como efeito colateral. Na quimioterapia, este fármaco é utilizado para diferentes tipos de

câncer, tornando seu uso limitado em função deste efeito colateral (JANSSEN-HEININGER; ANATHY, 2020).

No âmbito da pesquisa experimental pré-clínica, a BLM é vastamente utilizada para induzir a FP. Esta estratégia tem sido utilizada, pois não existem modelos animais capazes de reproduzir exatamente todas as características da FP humana. A BLM, em camundongos, causa lesões nas células epiteliais alveolares e inflamação pulmonar aguda, seguida por resposta fibrótica transitória, possibilitando análises quanto aos mecanismos da progressão da FP e a avaliação de potenciais terapias relevantes (ABIDI et al., 2018).

A BLM é um fármaco da família de glicopeptídeos complexos com propriedades antineoplásicas, inicialmente isolados de uma cepa de actinobactérias, *Streptomyces verticillus*. Seu uso clínico primário é como fármaco citotóxico antitumoral para vários carcinomas e linfomas. A toxicidade induzida pela BLM ocorre, principalmente, nos órgãos pulmonares, pele e mucosas, em virtude da falta da enzima inativadora da BLM nesses tecidos, a Bleomicina hidrolase. Diante disso, a FP é considerada como um efeito colateral e importante da BLM, porque os pulmões expressam níveis muito baixos dessa enzima (LIU; SANTOS; PHAN, 2017).

Compreende-se, dessa forma, que a BLM é um modelo consolidado nos estudos científicos para induzir a FP, por prejudicar as células epiteliais pulmonares, levando à ativação da resposta imune inata, bem como também a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α . A resposta imune leva ao influxo de leucócitos nos tecidos inflamados, que, por sua vez, essas células ativadas resultam na liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteases, agravando a lesão tecidual nos pulmões (GHORASHI et al., 2016).

1.4 Estratégias terapêuticas para fibrose pulmonar com PUFAs

Atualmente, não existem tratamentos medicamentosos capazes de reverter por completo o quadro de FP. Porém, estratégias envolvendo o uso de anti-inflamatórios, corticosteroides, ou uma combinação destes com outros agentes imunossupressores são utilizados, mas estes apenas desaceleram a progressão patológica. Restando apenas o transplante pulmonar como a única intervenção viável quando o portador está em estágio terminal (YAO et al., 2019).

Considerando o fato de que a FPI é uma das principais causas de morte entre as doenças respiratórias, vários grupos de pesquisa, ao redor do mundo, têm se dedicado a

estudar novas estratégias terapêuticas que possam proporcionar a inibição ou atenuação da condição patológica da fibrose (ABIDI et al., 2019).

Dentre as estratégias terapêuticas utilizadas na FP, pode-se citar a modulação do perfil inflamatório em animais experimentais pela administração oral com Ácidos Graxos Poli-insaturados (Do inglês, *PolyUnsaturated Fatty Acid*, PUFAs), tais como o Ômega-3 (ω -3). Estes são componentes com um valor terapêutico, consolidados tanto na indústria farmacêutica como na alimentícia por conferirem atividades anti-inflamatórias, anti-arrítmicas, anti-trombóticas, anti-neoplásicas e imunomoduladoras. Entretanto, apenas são obtidos na dieta ou por suplementos, porque o organismo não possui enzimas que auxiliam em sua síntese (AHMAD et al., 2020).

1.5 PUFAs e seu papel no processo inflamatório do organismo

Contextualizando sobre os PUFAs, os Ácidos Graxos são formados por um ácido carboxílico com uma cadeia lateral de hidrocarboneto, sendo considerados como saturados, quando há átomos de carbono ligados entre si por ligações simples, e insaturados quando existem duas ou mais ligações. Quando os ácidos graxos insaturados apresentam mais de uma ligação dupla são considerados como PUFAs, sendo classificados em Ômega-6 (ω -6) e ω -3 (CALDER, 2013).

Na dieta, os principais PUFAs obtidos são o Ácido Linoléico (LA) da família do ω -6 e o Ácido α -linolênico (ALA) da família do ω -3, que, através das enzimas delta-6-dessaturase e delta-5-dessaturase, formam seus respectivos metabólitos: Ácido Araquidônico (AA), correspondente ao ω -6, e Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e Ácido Docosaheptaenóico (DHA), correspondentes ao ω -3 (DAS, 2020).

Relacionada às fontes em que o ω -6 pode ser encontrado, têm-se os óleos vegetais como girassol, soja, milho, e sementes como de uva, papoula e algodão. Já o ω -3, este está presente em vegetais de folhas verdes, linhaça, nozes, óleos de soja e canola, e, principalmente, em óleos de peixe, derivados de animais marinhos de águas frias como salmão, cavala, sardinha, anchova, arenque, truta arco-íris e em algas, sendo fontes essenciais de EPA e DHA (BALIC et al., 2020).

A dieta com óleo de peixe melhora os sintomas de alguns modelos animais de doenças autoimunes e protege contra os efeitos da endotoxina. Estudos clínicos relataram que a suplementação com óleo de peixe por via oral tem efeitos benéficos na artrite reumatóide e entre alguns asmáticos, apoiando a ideia de que o ω -3 no óleo de peixe é anti-inflamatório.

Existem indicações de que a inclusão de óleo de peixe nas fórmulas enteral e parenteral é benéfica também para os pacientes (CALDER, 2003).

Após a ingestão, os PUFAs são metabolizados e podem ser armazenados em fosfolipídios da membrana celular, sendo responsáveis por inúmeras funções, incluindo a manutenção da estrutura, fluidez, sinalização e interação celular (AHMAD et al., 2020).

Como componentes da membrana celular, o ω -3 e ω -6 são precursores das vias de síntese dos eicosanoides, sendo importantes mediadores inflamatórios da resposta na fase aguda, estando presente, inclusive, em inflamações crônicas das vias aéreas. Por sua vez, os eicosanoides são um grupo de mediadores lipídicos derivados do Ácido Eicosapoleico, no qual sua síntese apenas é iniciada se um precursor dos PUFAs tiver sido clivado na membrana de fosfolipídios pela Fosfolipase A2 (PLA2) (PIPER; GARELNABI, 2020).

Quando agentes lesivos são identificados ou ocorre uma injúria tecidual, a PLA2 é induzida a liberar o AA para que sejam produzidos os substratos de eicosanoides pró-inflamatórios que modulam a resposta inflamatória. É por meio da Cascata do AA, que as vias Ciclo-oxigenase (COX)-2 forma os eicosanoides conhecidos por Prostaglandinas (PGs) e Tromboxanos (TXs) da série 2, enquanto que a Lipoxigenase 5-(LOX) forma os Leucotrienos (LTs) da série 4. Porém, esses mediadores de inflamação quando em excesso podem intensificar o processo inflamatório da resposta inata, e com isso gerar uma cronicidade no tecido (SAINI; KEUM, 2018) (Figura 2).

Contudo, para regular o processo inflamatório, o EPA e o DHA, ácidos do ω -3, competem nas mesmas vias que o AA, dando origem aos mediadores lipídicos de pró-resolução com atividade anti-inflamatória. O EPA é metabolizado em PGs e TXs da série 3, LTs da série 5 e resolvinas da série E. O DHA é metabolizado em resolvinas da série D, protectinas e maresinas (BHARDWAJ et al., 2016) (Figura 2).

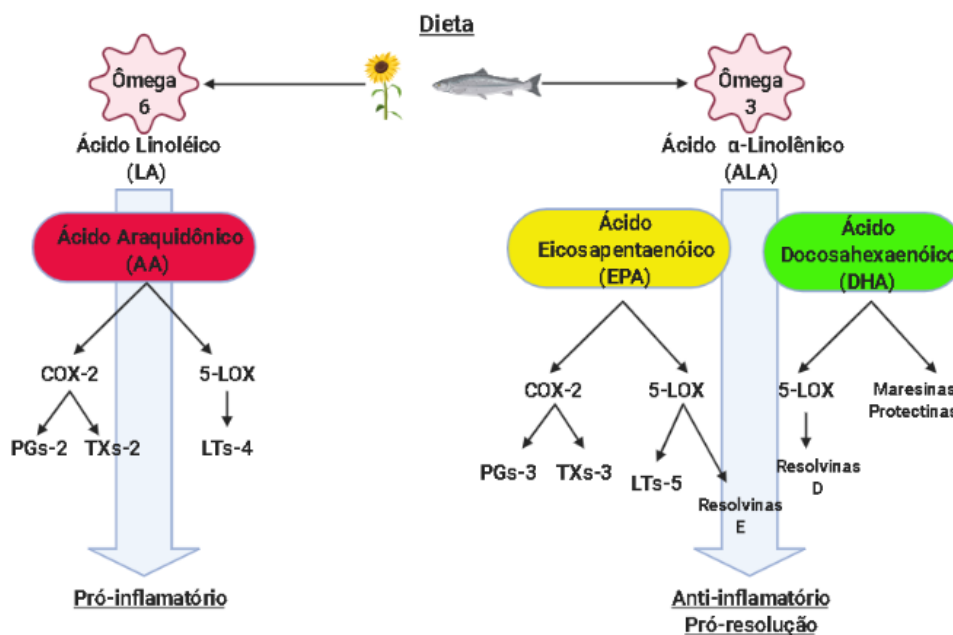


Figura 2. Esquema da metabolização de eicosanóides. Criado em BioRender.com.

Em resumo, diferentes autores indicam que o EPA e DHA podem ser considerados agentes reguladores da inflamação por, justamente, competirem com o AA nas etapas iniciais da inflamação. Nesse sentido, a produção dos mediadores pró-inflamatórios, tais como a PGE-2, é reduzida, enquanto que a produção de mediadores com perfis pró-resolução da inflamação, tais como as resolvinas, é aumentada. Assim sendo, o uso dos ácidos graxos, EPA e DHA, tem como objetivo regular o início do processo inflamatório, atenuando seus efeitos deletérios, incluindo o processo exacerbado da FP (MOLFINO et al., 2017).

1.6 Administração oral com EPA e DHA na fibrose pulmonar

Em estudos realizados por Chen et al. (2013) com a administração oral de DHA, destacaram o seu efeito anti-fibrótico em ratos Wistar com FP induzida por Paraquat (PQ), diante de análises histológicas, concentrações de hidroxiprolina, imuno-histoquímica e *Western Blot*. Os resultados sugeriram que os danos teciduais causados pela fibrose podem ser atenuados com a administração oral de DHA, podendo se tornar uma opção terapêutica, apesar de ainda serem necessárias mais pesquisas que detalhem com precisão sobre os mecanismos benéficos desse ácido graxo.

Zhao et al. (2014) também investigaram o papel terapêutico do DHA na FP induzida por BLM, entretanto pela via intratraqueal ao invés de oral. Contudo, conseguiram demonstrar a ação atenuadora em camundongos C57BL/6 pré-tratados. Os resultados apresentaram redução da mortalidade e na perda de peso, atenuação das alterações funcionais e morfológicas associadas à lesão, e diminuição da IL-6, LTB4, PGE-2 e aumento de IL-10.

Hanssens et al. (2016) demonstraram, por meio da avaliação do estado clínico, tolerância ao exercício, parâmetros inflamatórios e perfil de PUFA, a eficácia após 1 ano de administração oral de ômega-3 em pacientes com Fibrose Cística (FC). O estudo demonstrou que ω -3 é absorvido e incorporado nas membranas celulares após três meses de suplementação, produzindo uma demora quanto aos benefícios clínicos, mas ainda sim, significativos.

No estudo de De Vizia et al. (2003), a suplementação dietética com óleo de peixe, enriquecido de EPA e DHA, pode reduzir a inflamação em pacientes com FC, diante da diminuição dos níveis de eicosanoides pró-inflamatórios produzidos pelo AA nos fosfolipídios da membrana.

1.7 Nanoemulsão x PUFA Ômega-3

Diante do exposto, EPA e DHA têm potencial de amenizar os efeitos da fibrose pulmonar, porém existem barreiras relacionadas à estrutura molecular que podem comprometer a rapidez da eficácia terapêutica, tais como a baixa solubilidade em água, menor estabilidade química e biodisponibilidade. Contudo, diante do interesse em diminuir os obstáculos existentes desses ácidos graxos do ômega-3, as aplicações da nanotecnologia são utilizadas como estratégia terapêutica, a fim de melhorar a permeabilidade celular em tecidos-alvo diante de partículas nanométricas (AHMAD et al., 2020).

Por sua vez, as nanoemulsões, como uma das técnicas da nanotecnologia, podem ser utilizadas para encapsulação, proteção e liberação de óleos, aumentando a sua dispersibilidade em água e permitindo, assim, superar os desafios associados ao óleo de peixe, enriquecido de EPA e DHA (WALKER; DECKER; MCCLEMENTS, 2014).

Ademais, existem relatos demonstrando que a absorção destes ácidos graxos pode ser fortemente influenciada pela qualidade da dieta ingerida. Ao passo de que, uma dieta de lipídios favorece a absorção e, por conseguinte, aumenta a concentração plasmática destes compostos. As razões para isso são que, diante dessa dieta, ocorre o aumento da produção dos componentes emulsificantes, que, conseqüentemente, promovem o aumento da emulsificação

dos ácidos graxos, favorecendo, dessa forma, a formação de micelas e, em seguida, a sua absorção (DAVIDSON et al., 2012).

Nesse sentido, a nanotecnologia atua como um mecanismo que realiza essa tarefa de forma tecnológica, fornecendo micelas ou nanogotículas carreadoras que podem ser mais facilmente absorvidas pelo organismo. Além disso, a experiência de ingestão de óleo de peixe é bastante desagradável pelo perfil de refluxo induzido. Assim sendo, diante da associação de nanocarreadores seria possível reduzir ou eventualmente eliminar este efeito adverso.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que o processo inflamatório é uma reação do organismo a infecções ou lesões teciduais como estratégia de defesa. Considera-se salientar que, no caso da fibrose pulmonar, o processo acaba sendo prolongado, devido a desregulação de subsequentes respostas de reparo à lesão alveolar, resultando na persistência de fibroblastos e no excesso do acúmulo de proteínas da MEC que cicatrizam os pulmões, gerando danos na arquitetura e perda funcional.

Contudo, as propriedades do ômega-3, EPA e DHA, podem possibilitar benefícios quanto à regulação da resposta inflamatória diante de seus mediadores de pró-resolução, atenuando o processo fibrótico e preservando a morfofisiologia do tecido. Na literatura, não existem estudos que conferem a utilização da nanoemulsão de óleo de peixe em modelo experimental de fibrose pulmonar, possibilitando seu uso para avaliações pertinentes aos aspectos morfofisiológicos resultantes processo patológico.

Mediante o modelo animal de inflamação pulmonar é possível avaliar a resposta inflamatória induzida por diferentes maneiras, em virtude da ocorrência de alterações significativas no âmbito imunológico, funcional e estrutural do sistema respiratório (AUN et al., 2017).

Contudo, para estabelecer avaliações morfofisiológicas relevantes da fibrose pulmonar, necessita-se de métodos que auxiliem na eficácia de estratégias terapêuticas pré-clínicas. Assim sendo, dentre os vários métodos existentes, os principais que podem ser utilizados são: Microtomografia Computadorizada (Micro-TC), Ressonância Magnética (RM), análise de expressão gênica, análise bioquímica, biomarcadores sanguíneos e medidas da função pulmonar. A quantificação da gravidade da fibrose também pode ser avaliada por métodos histológicos baseados no score de classificação ou pela análise de imagens digitais (GILHODES et al., 2017).

Diante disso, utilizando as aplicabilidades da nanotecnologia e as propriedades do ômega-3, torna-se relevante o estudo dos aspectos morfofisiológicos do modelo experimental de fibrose pulmonar, proporcionando, diante do exposto, a justificativa da apresentação proposta de pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é verificar se a administração intra-gástrica de nanoemulsão de óleo de peixe pode influenciar os aspectos morfofisiológicos em modelo experimental de fibrose pulmonar.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o modelo experimental de fibrose pulmonar em camundongos BALB/c dentro do período de 36 dias;
- b) Verificar os aspectos morfológicos, diante de parâmetros histopatológicos e de imageamento, em modelo experimental de fibrose pulmonar;
- c) Verificar os aspectos fisiológicos, diante da frequência respiratória e mecânica ventilatória, em modelo experimental de fibrose pulmonar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia, do Departamento de Genética e Morfologia (GEM) e Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), do Departamento de Biologia Celular (CEL), no Instituto de Ciências Biológicas (IB), e Laboratório de Fisiologia Respiratória e Laboratório de Histologia e Embriologia, da Faculdade de Ciências da Saúde (FS), da Universidade de Brasília (UnB).

Os materiais e métodos utilizados para a obtenção de resultados do presente estudo estão dispostos nos tópicos a seguir.

4.1 Óleos utilizados no pré-tratamento

O óleo de peixe utilizado para o experimento realizados foi obtido de forma comercial através do produto Ômega-3 DHA 500 da Naturalis, rico em ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 como DHA e EPA (Anexo I).

O óleo de girassol foi obtido de forma comercial através do produto Óleo de Girassol Liza 900 mL, rico em ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-6 (Anexo II).

4.2 Nanoemulsão utilizada no pré-tratamento

A nanoemulsão de óleo de peixe constitui um resultado que foi gerado na tese de doutorado com o título: “Nanoformulação a base de ácidos graxos EPA (eicosapentaenoico 20:5 ω -3) e DHA (docosahexaenoico 22:6 ω -3) para administração oral e seu efeito em distúrbios inflamatórios”, desenvolvida na Universidade de Brasília-UnB (SANTOS, 2020). Importante destacar que os resultados se encontram em processo de uma publicação de um artigo científico original.

As amostras de nanoemulsão de óleo de peixe (NEW3) foram cedidas para esta pesquisa para prosseguimento na aplicação e avaliação do modelo experimental inflamatório de fibrose pulmonar, firmando assim uma colaboração e um intercâmbio científico.

A estabilidade das amostras cedidas foram previamente caracterizadas e avaliadas em diferentes condições ao longo de 1 (um) ano, estes resultados, bem como os métodos aplicados de desenvolvimento e caracterização coloidal estão descritos no trabalho de Santos (2020).

4.3 Animais

O BALB/c é amplamente utilizado em pesquisas com inflamação pulmonar, visto

que as características da resposta do seu sistema imunológico quanto à intensidade à presença de antígenos, tornou-se o principal modelo animal empregado neste estudo de fibrose pulmonar (CAPUTO et al., 2020).

Visto que o mais utilizado é o C57BL/6, por estudos afirmarem que o camundongo BALB/c não desenvolve FP, foi desenvolvido um modelo experimental de fibrose pulmonar para BALB/c, constatando que a linhagem desenvolve a condição patológica mas o tempo de progressão é mais lento comparado com os C57BL/6 que com 21 dias já possuem uma fibrose estabelecida (SMIDT, 2019).

Diante disso, o estudo utilizou camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (*Mus musculus*), com peso entre 20 e 25 gramas e possuindo a mesma idade (aproximadamente 6 semanas). Foram obtidos no biotério Central da Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília-Distrito Federal (DF), e mantidos em quarentena, antes da realização do experimento, no biotério do GEM-IB-UnB, relocados em estantes ventiladas permanentes, com maravalha, temperatura controlada (aproximadamente 23°C), ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas e recebendo água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos que foram realizados para anestesia e eutanásia dos animais estão de acordo com os métodos recomendados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (N° CEUA 97/2019) (Anexo III).

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos após a quarentena: Solução Salina Tamponada de Fosfato (PBS) – Controle negativo, BLM – Controle positivo, Óleo de Girassol (OG), Óleo de Peixe (OP) e NEW3.

Dessa forma, os animais foram divididos conforme a tabela abaixo:

Grupos	Pré-tratamento	Desafio inflamatório
PBS (n=8)	PBS	x
BLM (n=8)	x	✓
OG (n=8)	OG	✓
OP (n=8)	OP	✓
NEW3 (n=8)	NEW3	✓

Tabela 1. Representação dos grupos que foram utilizados no trabalho. O X representa que os animais não receberam o tratamento apontado. O ✓ representa que os animais receberam o tratamento apontado.

Durante o experimento, tanto no período de pré-tratamento como no pós-desafio inflamatório pulmonar, a massa corpórea dos camundongos foi verificada a cada sete dias e a perda de massa de cada grupo foi comparada.

4.5 Pré-tratamento

Foi realizado um pré-tratamento por gavagem gástrica, com os grupos experimentais, PBS, OG, OP e NEW3 na dose diária de 100 mg/kg, aproximadamente 200 µL para cada animal, com os respectivos componentes: solução salina tamponada de fosfato, óleo de girassol, óleo de peixe e nanoemulsão de óleo de peixe. A dosagem escolhida coincide com a utilizada no estudo conduzido previamente pelo nosso grupo de pesquisa em modelos de inflamação (SANTOS, 2020).

Todos foram tratados entre duas e quatro horas da tarde, durante vinte e um dias, utilizando uma cânula própria para o procedimento. Foi realizada avaliação clínica diária dos animais, sendo verificada a massa corpórea a cada sete dias. Após este período, os camundongos receberam o desafio inflamatório pulmonar com BLM.

4.6 Desafio inflamatório pulmonar

Os animais receberam solução anestésica composta de Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) inserida via intramuscular. Foi administrada dose única de 5 mg/mL (50 µL) de Sulfato de Bleomicina, pelo método cirúrgico intratraqueal nos camundongos. Para tal foram utilizados instrumentos cirúrgicos que permitiram a incisão e administração da BLM na via traqueal. O grupo PBS recebeu volume equivalente de solução salina pela mesma via. O procedimento foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada no Departamento de Biologia Celular da UnB.

A fim de verificar a eficácia da técnica, foram monitorados a massa corpórea dos animais durante 36 dias e realizada a mensuração da frequência respiratória no 29º dia após a administração do fármaco. A dose selecionada e o procedimento cirúrgico intratraqueal realizados coincidem com o estudo conduzido previamente pelo grupo de pesquisa do LIA da UnB (SMIDT, 2019).

4.7 Mensuração da frequência respiratória

No 29º dia após o desafio inflamatório, foi verificada a Frequência Respiratória (FR) dos animais, a fim de estabelecer a quantidade de incursões respiratórias em aproximadamente 60 segundos. Entretanto, em vista da dificuldade de obter uma mensuração próxima a fidedignidade em camundongos BALB/c devido a movimentação e respiração acelerada, foi empregado o método de gravação de vídeo de cada animal durante 10 segundos para posteriormente ao conseguir mensurar a incursão respiratória por 10 segundos,

multiplicar por seis e obter um valor aproximado a mensuração de 1 minuto. Ainda relacionada a respiração acelerada dos animais, foi necessário submeter o vídeo ao aplicativo de domínio público *Efectum* - Câmera Lenta, Rápida e Inversa (*Craigpark Limited*), para com o uso da ferramenta *Slow* diminuir a velocidade de 10 segundos em 10x mais, condicionando a duração do novo vídeo adquirido em aproximadamente 60 segundos. A contagem foi estabelecida pelo método observacional da inspiração por minuto de cada animal.

Vale ressaltar que a hipoatividade e lentidão dos grupos BLM, OG, OP e NEW3 contribuíram para a realização desse monitoramento, visto que alguns dos animais ficaram quase praticamente estáticos por 10 segundos. Com o intuito de não condicionar os animais ao estresse, tendo que imobilizá-los ou anestesiá-los, distanciando-os de suas condições fisiológicas, foi realizada a frequência respiratória apenas nesse período, visto que antes do desafio inflamatório pulmonar, os animais pré-tratados, estavam mais ativos, dificultando ainda mais realizar tal coleta de dados.

4.8 Mecânica ventilatória pulmonar

A avaliação da mecânica ventilatória é amplamente utilizada em animais experimentais, principalmente, em ratos e camundongos, com o intuito de auxiliar nos estudos relacionados às propriedades mecânicas do sistema respiratório. Apesar da ventilação por pressão positiva (respiração forçada) ser um método invasivo, condicionando o animal a ser anestesiado, paralisado e traqueostomizado, distanciando-o de suas condições fisiológicas. É o único que fornece dados com mais exatidão ao considerar o comportamento linear do sistema (MELO-SILVA et al., 2011).

O procedimento e avaliação da mecânica ventilatória foram realizados no Laboratório de Fisiologia Respiratória, da FS, na UnB sob a supervisão dos professores Dr. César Augusto Melo-Silva e Dra. Verônica M. Amado.

No 36° dia, após o desafio inflamatório, todos os animais foram sedados e anestesiados com solução anestésica composta de Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) inserida via intramuscular para a inserção de uma cânula intratraqueal. Foram, mecanicamente, ventilados com parâmetros constantes em modo de volume controlado: volume corrente de 8 mL/kg, com ar ambiente e frequência respiratória de 100 sopros/minuto e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 3 cmH₂O.m.

Seguindo a metodologia de Melo-Silva et al. (2011) foram realizadas as seguintes etapas para o método da mecânica ventilatória: (1) realização da traqueostomia com uma cânula de metal de calibre 18; (2) administração do brometo de pancurônio (0,1 mg/kg),

intraperitonealmente, para bloqueio da musculatura respiratória; e (3) acoplação ao ventilador mecânico FlexiVent FX controlado por computador (Scireq, Montreal, Canadá).

Foram realizadas até cinco medidas (Coeficiente de Determinação – $COD > 0,95$), sendo registrados em cada animal, no qual foi calculada a média e analisada. Foram excluídas apenas as medidas que apresentaram valores negativos. Os parâmetros obtidos na mecânica ventilatória, conforme descritos por Saddy (2011), Anciães (2011), Aoki (2013), Zhao et al. (2014), e Cano-Jiménez, González e Peloché (2018), foram:

- a) **Resistência do Sistema Respiratório (Rsr):** representa as propriedades resistivas da soma da resistência das vias aéreas, tecidual e da parede torácica, sendo inversamente proporcional ao volume pulmonar, no qual a perda de volume acarreta no aumento da resistência;
- b) **Complacência do Sistema Respiratório (Csr):** grau de variação do volume pulmonar para uma dada alteração da pressão, ou seja, corresponde a capacidade da expansão pulmonar e da parede torácica na inspiração. Sendo que se a complacência diminui, há resistência na expansão, e consequentemente, dificulta a inspiração;
- c) **Elastância do Sistema Respiratório (Esr):** corresponde as propriedades elásticas dos pulmões e parede torácica, no qual se aumentada há facilidade de expirar, ou seja tende a retrair mais os pulmões. É inversamente proporcional a complacência;
- d) **Resistência Newtoniana (Rn):** é a resistência das vias aéreas, ou seja, a resistência ao fluxo aéreo ao longo da árvore traqueobrônquica;
- e) **Resistência tecidual (Rt):** determinada pela dissipação energética gerada pela viscosidade ou atrito pertinente à movimentação dos pulmões;
- f) **Elastância tecidual (Et):** caracterizada pelo armazenamento de energia no tecido pulmonar.

4.9 Histologia Pulmonar

Diante das etapas da histologia pulmonar, a coleta do material para análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Fisiologia Respiratória, da FS. A fixação, preparo das lâminas e as técnicas de coloração utilizadas foram realizadas no Laboratório de Histologia e Embriologia, da FS. Por último, a análise morfométrica foi realizada no GEM-IB. Todos os locais situados na Universidade de Brasília.

4.9.1 Remoção do pulmão

Após a avaliação da mecânica ventilatória, todos os animais foram eutanasiados e em sequência, cortes do pulmão direito foram armazenados em solução de formol a 10% em tampão salino para fixação do material (SMIDT, 2019).

4.9.2 Fixação e preparo das lâminas

Foram seguidas as etapas de processamento do material, conforme os métodos histológicos padrão, descrito por Longo et al. (2016), utilizando o Histotécnico modelo 808 para realizar a desidratação em uma série graduada de etanol (70%, 80%, 90% e três vezes 100%) durante 1 hora cada banho, a diafanização para tornar o tecido mais translúcido em 3

banhos de xilol de 40 minutos cada e em 3 banhos de parafina de 1 hora cada.

As amostras foram emblocadas na parafina em barras de Leuckhart, depois foram cortadas na espessura de 5 μm em micrótomo Leica modelo RM2125RT (Leica Alemanha), colocadas em lâminas de vidro, permanecendo na estufa a 37°C por 24 horas para aderir a lâmina. Foram coradas nos métodos de Hematoxilina e Eosina (H&E), para identificar células inflamatórias, e no Tricrômico de Masson, para identificar a deposição de colágeno evidenciado pelo tom de azul.

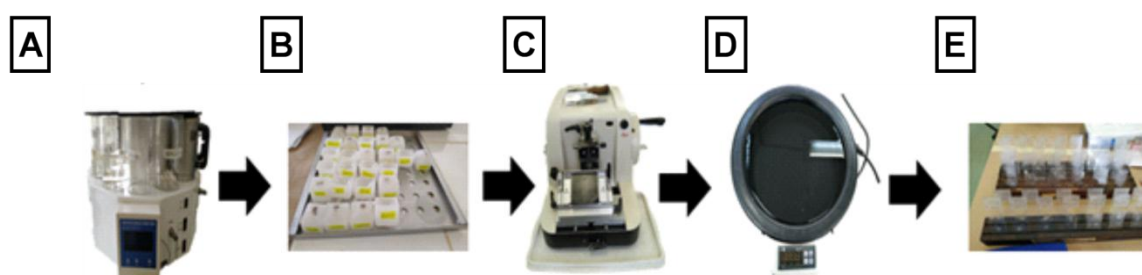


Figura 3. Etapas de processamento do material histopatológico. (A) Desidratação, diafanização e infiltração na parafina; (B) emblocamento das amostras; (C) cortes histológicos; (D) banho histológico para posicionamento das amostras em lâminas de vidro; (E) aderência das amostras em lâminas de vidro.

4.9.3 Técnicas para coloração das lâminas

Para H&E, as lâminas foram colocadas em uma sequência de banhos, de 1 minuto cada, com xilol puro (três vezes), etanol/xilol (1:1), etanol 100%, 90%, 80% e 70%, hematoxilina, água corrente, eosina, etanol 70%, 80%, 90%, etanol/xilol (1:1) e xilol puro (três vezes).

Para o Tricrômico de Masson, as lâminas foram colocadas em uma sequência de banhos, de 1 minuto cada, de xilol puro (três vezes), etanol/xilol (1:1), etanol 100%, 90%, 80% e 70%, Hematoxilina de Weigert, água corrente, Ponceau, água corrente novamente, Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico, azul de anilina, etanol 70%, 80%, 90%, etanol/xiloleno (1:1) e xilol puro (três vezes).

Todas as amostras de tecido pulmonar afetados pela fibrose, bem como os controles das amostras, foram coradas e examinadas.

4.9.4 Análise histopatológica e morfométrica

As lâminas contendo amostras dos cortes pulmonares, corados em H&E e Tricrômico de Masson foram analisadas qualitativamente e quantitativamente, sendo

capturadas sob o sistema Invitrogen EVOS *FL Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher Scientific) presente no GEM-IB-UnB, com ampliação de 10x, 20x, 40x e 60x.

As lâminas de H&E foram quantificadas por imagem digital, no qual, foram capturadas cinco imagens de cada animal em objetiva de 20x e analisadas quanto à área do espaço aéreo pulmonar. Foi obtida uma média de 20 imagens por grupo, a fim de tentar aproximar da fidedignidade dos dados obtidos para fibrose pulmonar, conforme Ashcroft, Simpson e Timbrell (1988).

Os resultados da área do espaço aéreo pulmonar (branco) (figura 4) foram expressos em porcentagem, conforme Caputo et al. (2020)., definindo a escala das imagens (200 μm) para possibilitar a medida da distância dos espaços aéreos ou do parênquima pulmonar (dependendo do que se quer ser analisado), convertendo-as posteriormente em 8-bit, em escala cinza, e aplicando nas imagens o *Threshold*, com a ferramenta Preto e Branco (Do inglês, *Black and White*, B&W) para limitar a intensidade das cores nas amostras histopatológicas diante das áreas de interesse (tom branco para o espaço aéreo, incluindo alvéolos, sacos alveolares e bronquíolos, e preto para o parênquima pulmonar), demonstrado na figura 4.

Assim sendo, os resultados das medidas da área, expressas em porcentagem, foram obtidas pelo programa de domínio público software ImageJ Versão 1.51p do Instituto Nacional de Saúde (INS, Estados Unidos da América (EUA)).

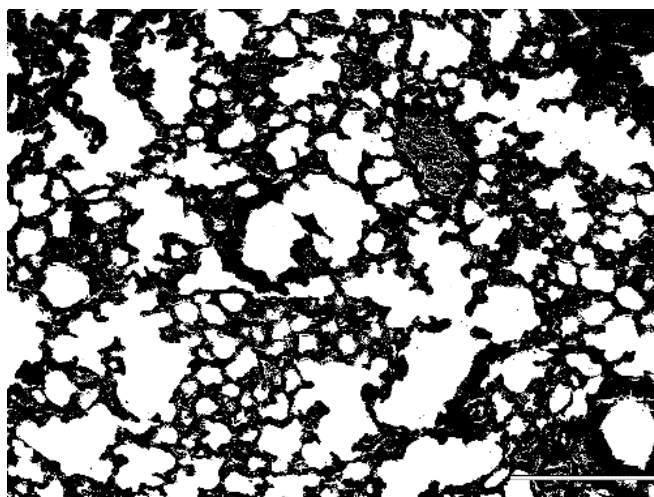


Figura 4. Imagem representativa do método utilizado para calcular a área do espaço aéreo pulmonar. Barra: 200 μm .

A análise da classificação histológica do grau das lesões fibrosas foi estabelecida por uma pontuação semi-quantitativa cega, diante do sistema adotado por Ashcroft, Simpson e Timbrell (1988) relacionada à extensão e gravidade da inflamação, e fibrose no parênquima

pulmonar. A gravidade da inflamação foi classificada da seguinte maneira: grau 0, pulmão normal; grau 1, espessamento fibroso mínimo das paredes alveolares ou brônquicas; graus 2 a 3, espessamento moderado das paredes sem danos óbvios à arquitetura pulmonar; graus 4 a 5, aumento da fibrose com dano definitivo à arquitetura pulmonar e formação de bandas fibrosas ou pequenas massas fibrosas; graus 6 a 7, distorção severa da estrutura e grandes áreas fibrosas; e grau 8, obliteração fibrótica total do campo. O escore médio de todas as seções foi considerado como o escore de fibrose dessa seção pulmonar.

4.10 Técnica de imageamento *in vivo*

O Micro-TC está sendo aplicado em estudos pré-clínicos, principalmente, em modelos animais de doença pulmonar, permitindo uma avaliação detalhada da morfologia pulmonar, devido às diferenças de radiopacidade bem definidas entre o ar e o tecido pulmonar. Sendo uma ferramenta de essencial importância para avaliação da progressão da FP em camundongos por meio da inspeção visual de imagens pulmonares (WU et al., 2019).

Diante disso, a técnica de imageamento *in vivo* foi adotada neste estudo como potencial instrumento de análise morfológica da radiopacidade pulmonar em modelo experimental de fibrose pulmonar, visto ser importante para correlacionar com outros métodos utilizados no projeto.

4.10.1 Realização do procedimento

Para a realização do estudo, foi utilizado o aparelho de Micro-TC Albira Bruker, presente no GEM-IB-UnB (Figura 5 e 6). Os camundongos foram tomografados em posição decúbito ventral no 33º dia após o desafio inflamatório pulmonar. Foram anestesiados por meio dos anestésicos cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), injetada pela via intraperitoneal, para a realização do procedimento.

O microtomógrafo utilizado tem como acessórios uma câmera de vídeo e diversos aparelhos para monitoramento do animal durante o escaneamento, possibilitando a aquisição das imagens em planos transversal, coronal e sagital. As imagens foram adquiridas em baixa resolução com voltagem de 35 kV, 200 mA, totalizando 250 projeções, com tempo de digitalização aproximadamente de 10 minutos, e em alta resolução com voltagem de 45 kV, 400 mA, 70 mm FOV (Medição do Campo de Visão), totalizando 1.000 projeções, com tempo de digitalização aproximadamente de 30 minutos. Todas as imagens foram adquiridas sob um ângulo de 360º, sendo reconstruídas pelo software Albira Suite 09-00127 Bruker.



Figura 5. Aparelho de Microtomografia Computadorizada Albira no GEM-IB-UnB.

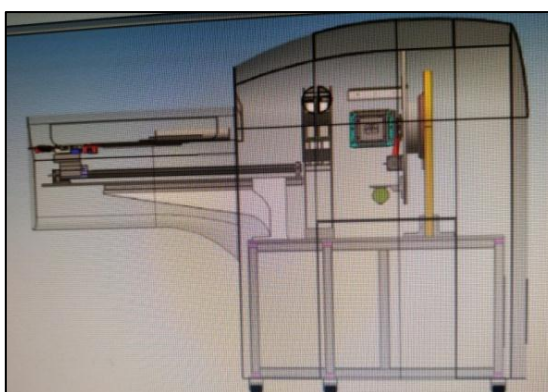


Figura 6. Representação esquemática do interior do aparelho de Microtomografia Computadorizada Albira no GEM-IB-UnB.

4.10.2 Processamento das imagens 2D e 3D

Para avaliação qualitativa da condição inflamatória pulmonar induzida por Bleomicina, em Micro-TC, foram utilizadas imagens adquiridas do processo de aquisição de reconstruídas em alta resolução. As análises das reconstruções bidimensionais (2D) foram realizadas, utilizando o software comercial PMOD – *Biomedical Image Quantification* Versão 3.307 (Zurique, Suíça). Todos os parâmetros de aquisição e reconstrução foram iguais para todos os camundongos.

Para o processamento das imagens em três dimensionais (3D) foi utilizado o programa de domínio público software VolView Versão 3.4 (Clifton Park, Nova Iorque, EUA), um sistema intuitivo e interativo para visualização do volume em 3D. Entretanto, antes de adquirir as imagens, foram realizadas seleções automáticas na área pulmonar, em planos transversal, coronal e sagital, permitindo assim imagens apenas do órgão de interesse.

4.11 Análise estatística

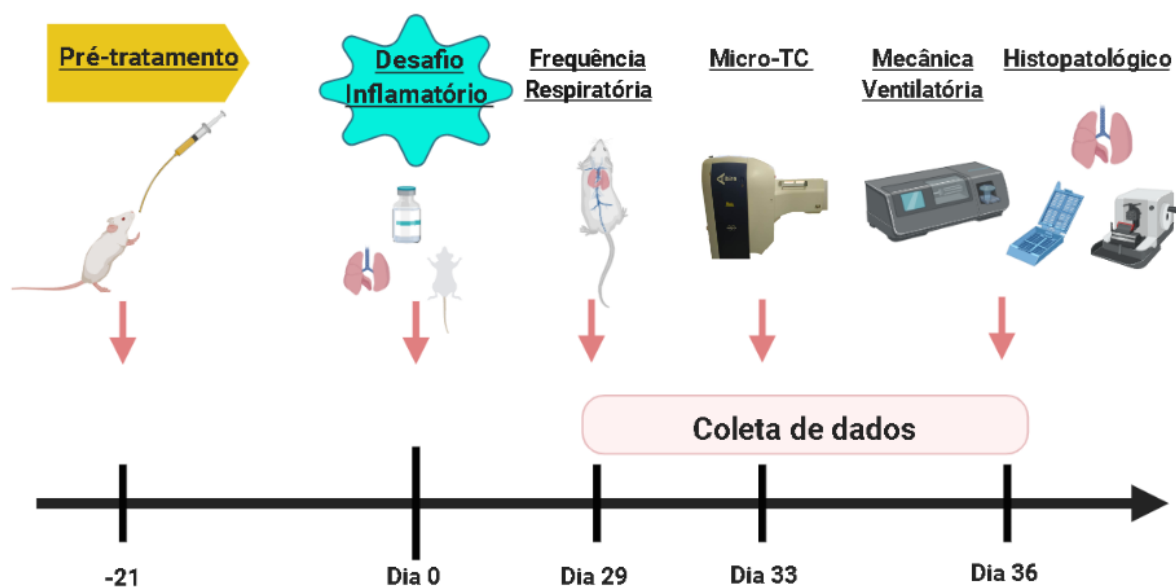
Os resultados foram apresentados como média \pm desvio-padrão e analisados

estatisticamente no software GraphPad Prisma® 7.0 (Califórnia, EUA), sendo submetidos aos testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ($p < 0,05$). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste One-way ANOVA, aplicando testes de comparações múltiplas de Tukey.

5. RESULTADOS

No presente estudo, com o intuito de verificar se a administração intra-gástrica de nanoemulsão de óleo de peixe pode influenciar os aspectos morfofisiológicos em modelo experimental de FP, foram realizadas diferentes análises cujos resultados estão descritos a seguir. Os dados apresentados nesta seção se referem, principalmente, às observações qualitativas e quantitativas coletadas de um estudo pré-clínico envolvendo um modelo animal de fibrose pulmonar induzida com o quimioterápico bleomicina.

Neste estudo animal, criamos diferentes grupos de tratamento e coletamos os dados após o desafio inflamatório pulmonar, conforme o período de dias delineados no desenho esquemático (Figura 7), levando em consideração o período de 21 dias de pré-tratamento:



Created in BioRender.com 

Figura 7. Esquema do desenho experimental *in vivo*. Pré-tratamento realizado 21 dias antes do desafio inflamatório pulmonar. No dia zero é iniciado o desafio inflamatório pulmonar, em que no 29º dia é realizada a mensuração da frequência respiratória, no 33º é realizada a coleta de dados no Micro-TC e no 36º são realizadas a mecânica ventilatória pulmonar e a coleta do material para análise histopatológica. Criado em BioRender.com.

5.1 Nanoemulsão de óleo de peixe

Para o presente estudo, as amostras de NEW3 apresentaram média de tamanho de $152,03 \pm 1,60$ nm e Índice de Polidispersão (PDI) de $0,36 \pm 0,01$ e Potencial Zeta de $-17,66$ mV $\pm 0,288$.

No presente trabalho preservaram-se as concentrações já estabelecidas de óleo de peixe contendo 6,25 mg/mL de DHA e 1,25 mg/mL de EPA e as doses diárias para os estudos *in vivo* de 50 mg/kg de DHA e 10 mg/kg EPA por animal (SANTOS, 2020).

5.2 Análise da massa corpórea dos camundongos

A figura 8 apresenta dados da massa corpórea dos animais obtidos durante o pré-tratamento para os grupos OG, OP e NEW3. A partir desses resultados, foi possível verificar que houve uma diferença significativa entre OG e OP comparando com a NEW3, sendo evidente no sexto dia do pré-tratamento em que os grupos OG e OP apresentaram redução de sua massa corpórea. Contudo houve uma recuperação considerável dos mesmos após esse período.

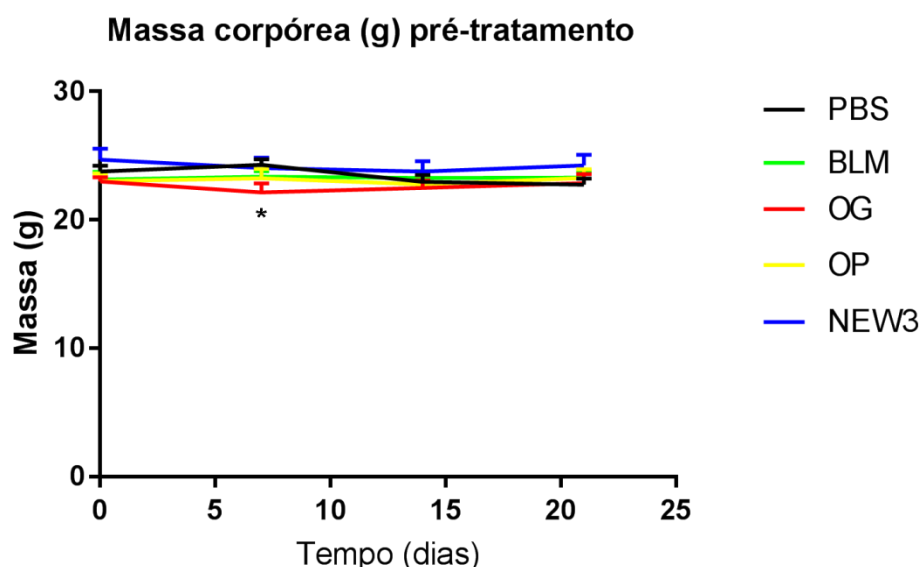


Figura 8. Massa corpórea dos camundongos durante o pré-tratamento ao longo de 21 dias. (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo; **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg); **OP:** animais pré-tratados com óleo de peixe (100 mg/kg); **NEW3:** animais pré-tratados com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação aos demais grupos experimentais.

A figura 9 apresenta os dados da massa corpórea dos animais obtidos após o desafio inflamatório pulmonar para os grupos PBS, BLM, OG, OP e NEW3. A partir desses resultados, foi possível verificar que houve uma diferença significativa entre OG, OP e NEW3 comparado com o grupo controle PBS, sendo mais evidente no sétimo dia após o desafio inflamatório. Após o sétimo dia houve uma tendência de ganho de massa corpórea em todos os grupos experimentais.

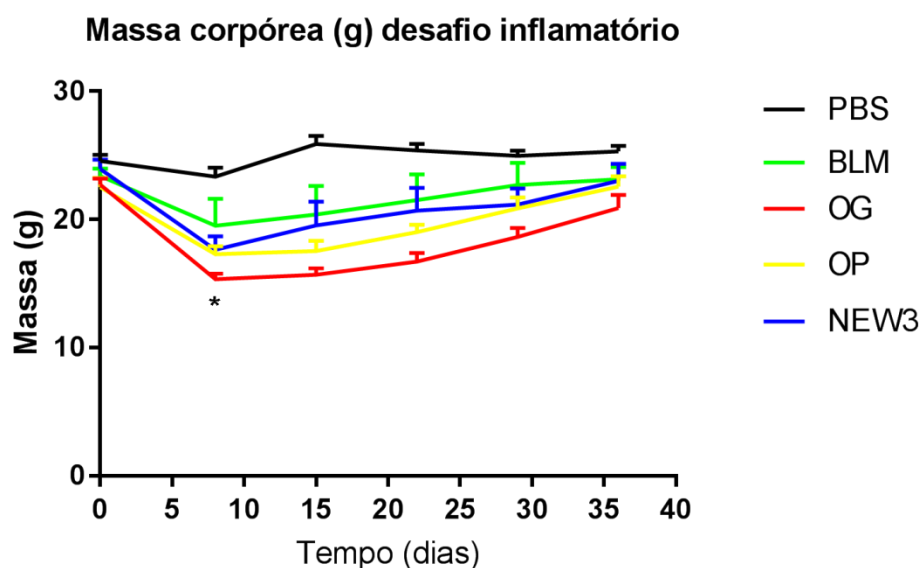


Figura 9. Massa corpórea dos camundongos ao longo de 36 dias após o desafio inflamatório pulmonar (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

5.3 Sobrevida dos camundongos

A figura 10 apresenta os dados da sobrevida dos camundongos após o desafio inflamatório pulmonar, obtida ao longo de 36 dias para os grupos PBS, BLM, OG, OP e NEW3. A partir desses resultados, foi possível observar a taxa de sobrevida nos grupos BLM (66%), OG (66%), OP (75%) e NEW3 (62,5%).

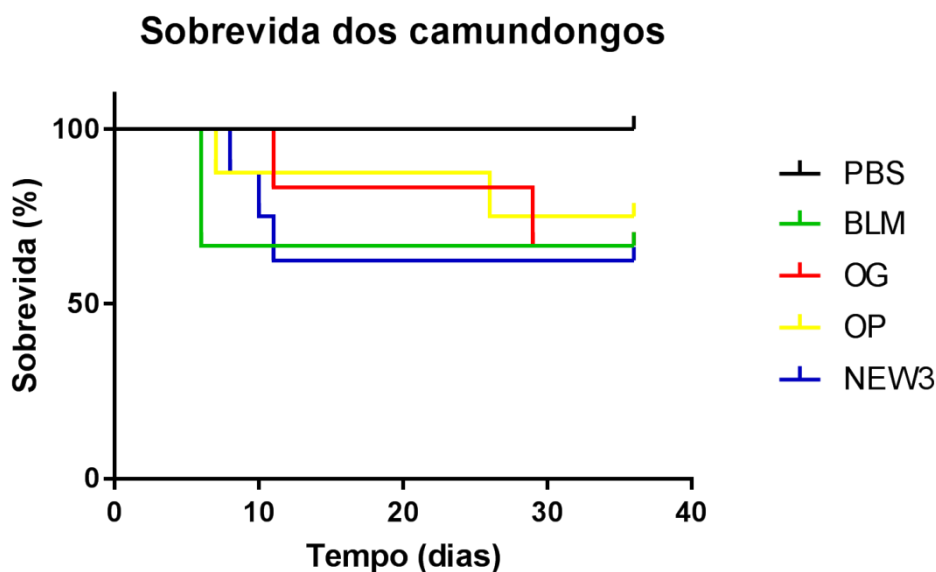


Figura 10. Sobrevida dos camundongos ao longo de 36 dias após o desafio inflamatório pulmonar (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey.

5.4 Aspectos morfológicos pulmonares

Com o intuito de verificar se a administração intra-gástrica de nanoemulsão de óleo de peixe pode influenciar os aspectos morfológicos do modelo experimental de FP, foram realizadas análises pertinentes ao tecido pulmonar, por meio das técnicas histológicas, e análises pertinentes a radiopacidade dos pulmões, por meio da técnica de imageamento. Os resultados estão descritos a seguir.

5.4.1 Análise histopatológica

A análise histopatológica dos camundongos desafiados com Bleomicina corresponde ao 36º dia após inflamação pulmonar. Mostrando que, ao comparar com o grupo controle que recebeu apenas tratamento com PBS, o grupo NEW3 apresentaram menores alterações inflamatórias no parênquima pulmonar, visto qualitativamente e quantitativamente por meio das técnicas de H&E e Tricrômico de Masson.

No parênquima pulmonar da figura 11A foi observado aspecto histológico normal, com bronquíolos e alvéolos aerados e, septos alveolares de espessura normal, representado em H&E, e sem presença de acúmulo de colágeno nos septos alveolares, representado em Masson.

As figuras 11B, 11C, 11D e 11E mostram os efeitos do desafio inflamatório ao

analisar os aspectos do parênquima pulmonar diante do espessamento dos septos alveolares, em H&E, e acúmulo de colágeno, em Masson, sendo mais proeminente nas figuras 11B e 11C, já que em ambas, observa-se um comprometimento tecidual heterogêneo de espessamento intersticial, com áreas alternantes.

A figura 11B apresenta espessamento moderado dos septos alveolares sem danos significativos à arquitetura pulmonar. Os septos alveolares apresentam paredes fibróticas contínuas em todo o campo da figura e os alvéolos estão visivelmente aumentados e rarefeitos. Há acúmulo moderado de colágeno nas paredes alveolares. Em suma, o parênquima pulmonar apresenta um aspecto típico de estágio inicial da fibrose pulmonar, demonstrando desorganização do tecido, principalmente, na figura sob a técnica do Masson.

Na figura 11C, observa-se o aumento da fibrose com dano definitivo à estrutura pulmonar, apresentando bandas com massas fibróticas confluentes e estrutura pulmonar severamente alterada, entretanto a arquitetura ainda está preservada, sendo mais evidente na figura sob a técnica do Masson. Percebe-se a presença de macrófagos, na figura sob a técnica de H&E e acúmulo de colágeno visto nas paredes alveolares onde está mais acentuado ao comparar com as figuras 11B, 11D e 11E sob a técnica do Masson.

Relacionada à figura 11D, nota-se alterações claramente de progressão fibrótica, com alvéolos parcialmente aumentados e rarefeitos, mas sem massas fibróticas. Por sua vez, a figura 11E possui alterações fibróticas suaves de maneira isolada, com alvéolos parcialmente aumentados e rarefeitos, mas sem massas fibróticas. Não houve presença de colágeno nas figuras 11D e 11E.

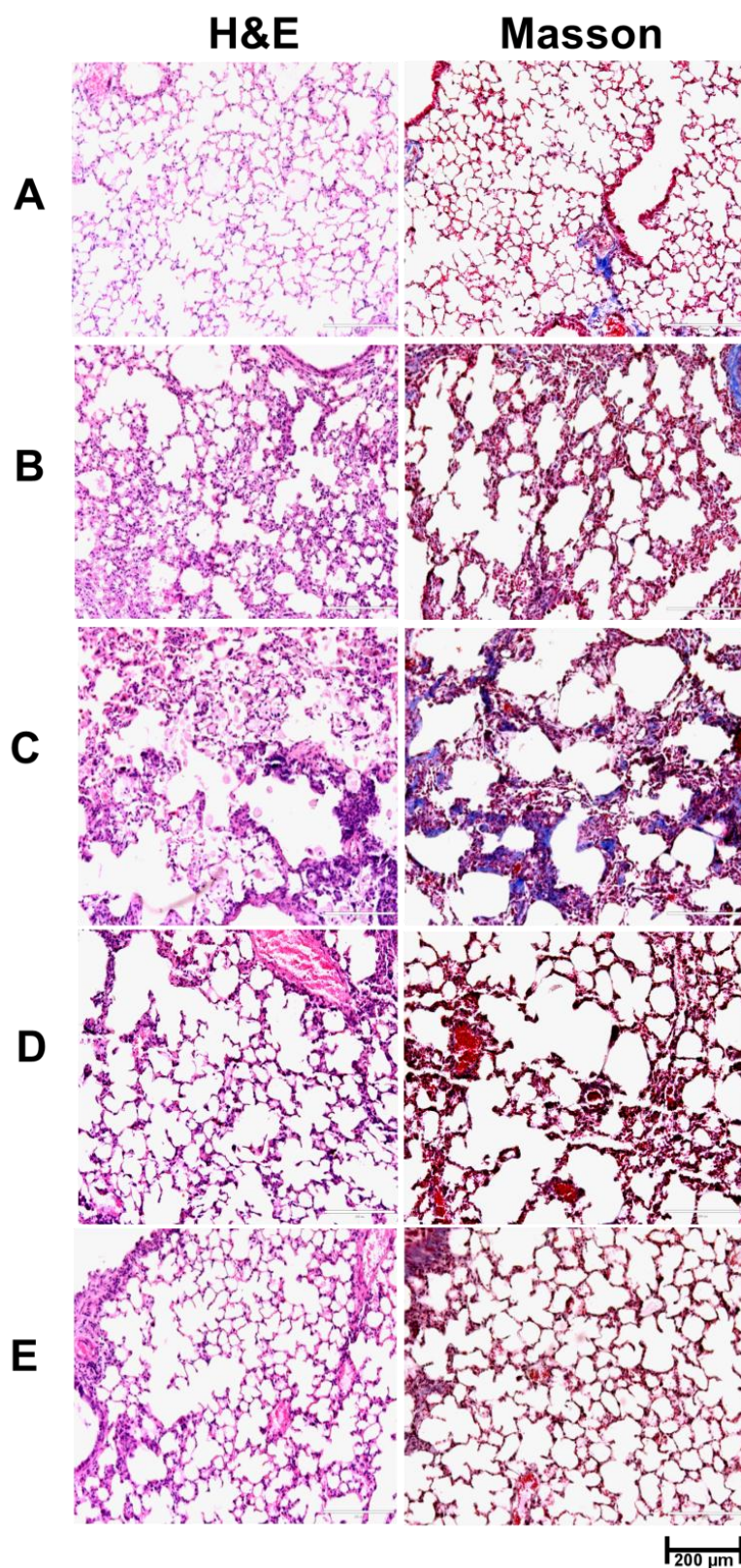


Figura 11. Análise histológica do parênquima pulmonar de camundongos BALB/c após desafio inflamatório, corados nas técnicas de H&E e Tricrômico de Masson. **(A)** Animal do grupo controle tratado com PBS, visto pela técnica H&E e Masson. **(B)** Animal do grupo controle positivo tratado com BLM, visto pela técnica H&E e Masson. **(C)** Animal do grupo OG, visto pela técnica H&E e Masson. **(D)** Animal do grupo OP, visto pela técnica H&E e Masson. Barra: **(E)** Animal do grupo NEW3, visto pela técnica H&E e Masson. Barra de referência de tamanho de 200 μm é válida para todas as microfotografias.

A figura 12 corresponde ao espaçamento aéreo pulmonar presentes no tecido, em que o grupo OG apresentou menor espaço aéreo comparado com o grupo controle PBS. Não foram constatadas diferenças estatísticas entre o grupo NEW e PBS, complementando os dados qualitativos demonstrados na figura 11 correspondentes a esses grupos, ressaltando-se que o espaço aéreo pulmonar da NEW3 não foi afetado exacerbadamente como demonstrado no grupo OG.

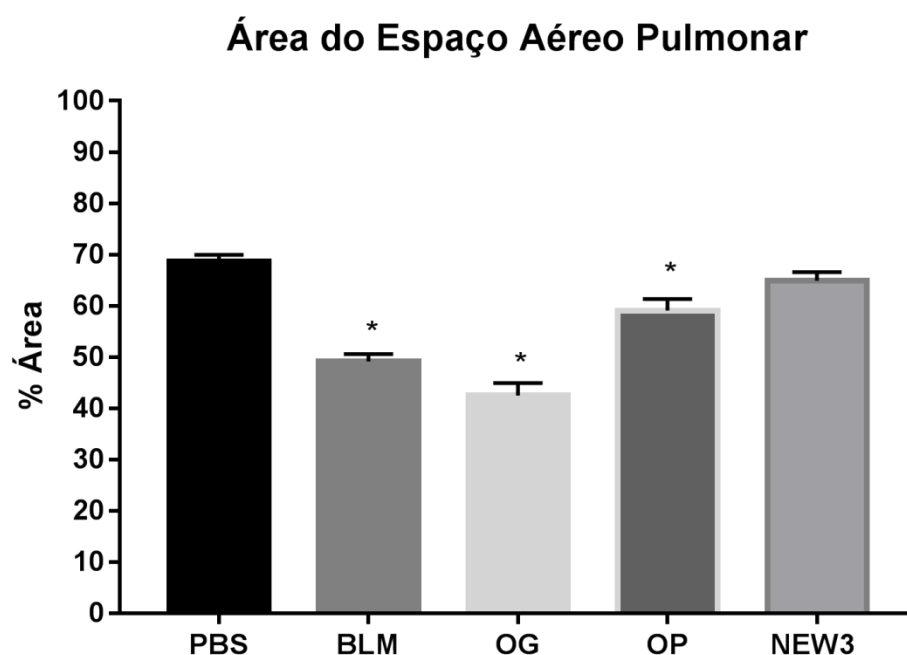


Figura 12. Área do espaço aéreo pulmonar (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Imagens (total: 20 cada grupo) do parênquima pulmonar foram capturadas para avaliar o espaçamento aéreo de cada grupo. Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

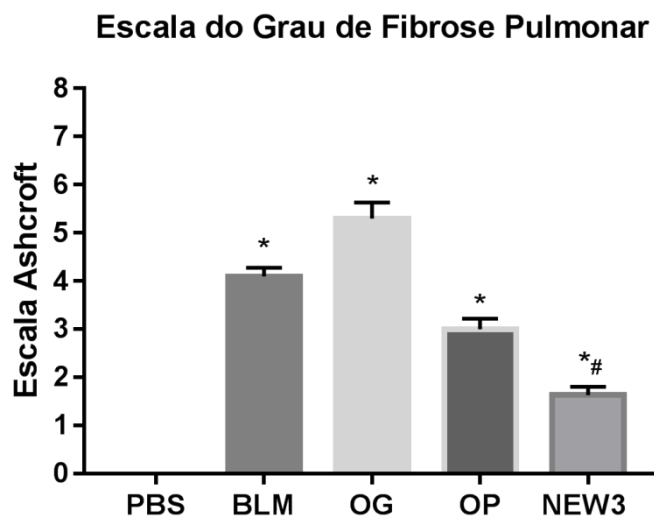


Figura 13. Escala do grau de fibrose pulmonar (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Imagens (total: 20 cada grupo) do parênquima pulmonar foram capturadas para avaliar o grau de gravidade da fibrose pulmonar de cada grupo de 0 a 8. Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS. # representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação aos grupos desafiados com bleomicina.

Na figura 13, diante da análise das lâminas histológicas, está representada a escala de Ashcroft conduzida pelos oito estágios da fibrose pulmonar. Diante disso, considerando o zero como parênquima normal, os grupos BLM, OG, OP e NEW3 demonstraram significância em suas médias, visto que o grupo NEW3 apresentou menor grau de fibrose comparado com os grupos desafiados com bleomicina.

5.4.2 Análise em microtomografia computadorizada

Destaca-se, primeiramente, que os dados obtidos no Micro-TC complementaram os que foram obtidos nas análises histológicas, no que se refere aos aspectos morfológicos do processo progressivo da fibrose pulmonar.

As imagens em 2D foram analisadas qualitativamente no software PMOD Versão 3.307. Por meio da reconstrução em alta resolução das imagens adquiridas, percebeu-se que após 30 dias da administração de BLM, a região pulmonar, comumente preto devido a radiolucidez típica, foi gradativamente ocupada por porções radiopacas quando comparamos com o Grupo PBS. Esse dado corrobora aos achados histológicos, onde foram observados o aumento do espessamento alveolar decorrente da ação da BLM (figura 11), implicando consequentemente na diminuição do espaço aéreo pulmonar (figura 12).

A reconstrução em 3D foi realizada no software VolView Versão 3.4 usando a

segmentação automática 2D dos pulmões. As imagens foram analisadas qualitativamente diante das alterações correspondentes a arquitetura pulmonar.

A figura 14A representada em 2D e 3D mostra ausência de anormalidades, sendo este o grupo controle negativo, diante da ausência de radiopacidade e arquitetura pulmonar preservada. Na figura 14B, 14C, 14D e 14E, representada em 2D, há visivelmente o aumento da radiopacidade bilateralmente, sendo mais atenuada na figura 14E.

A figura 14B apresenta radiopacidade unifocal com formato de listras isoladas na região do pulmão direito, visto pela imagem em 2D. Enquanto que na imagem em 3D, a arquitetura da região superior dos pulmões está comprometida, mas ainda o órgão está com a estrutura preservada, demonstrando deformação na região superior do pulmão direito e esquerdo.

Na figura 14C, demonstra lesões de opacidade multifocais em vidro fosco com septos interlobulares espessados e opacificação do espaço aéreo pulmonar, apresentando-se em distribuição simétrica nos pulmões. Paralelamente, em 3D demonstra a deformação da arquitetura pulmonar visivelmente mais acentuada do que na figura 14B, 14D e 14E, principalmente do pulmão direito.

Na figura 14D, em 2D, apresenta radiopacidade multifocal, por toda a extensão pulmonar, tanto no pulmão direito como no esquerdo, mas sem presença de listras isoladas ou lesões com espessamento dos septos interlobulares. Em 3D, há preservação da arquitetura pulmonar sem presença de alterações visíveis.

A figura 14E representada em 2D apresenta radiopacidade unifocal no pulmão direito e esquerdo, entretanto ao comparar com os demais grupos desafiados com BLM, há presença de listras isoladas, e não há lesões com espessamento dos septos interlobulares ou radiopacidade por toda a extensão pulmonar.

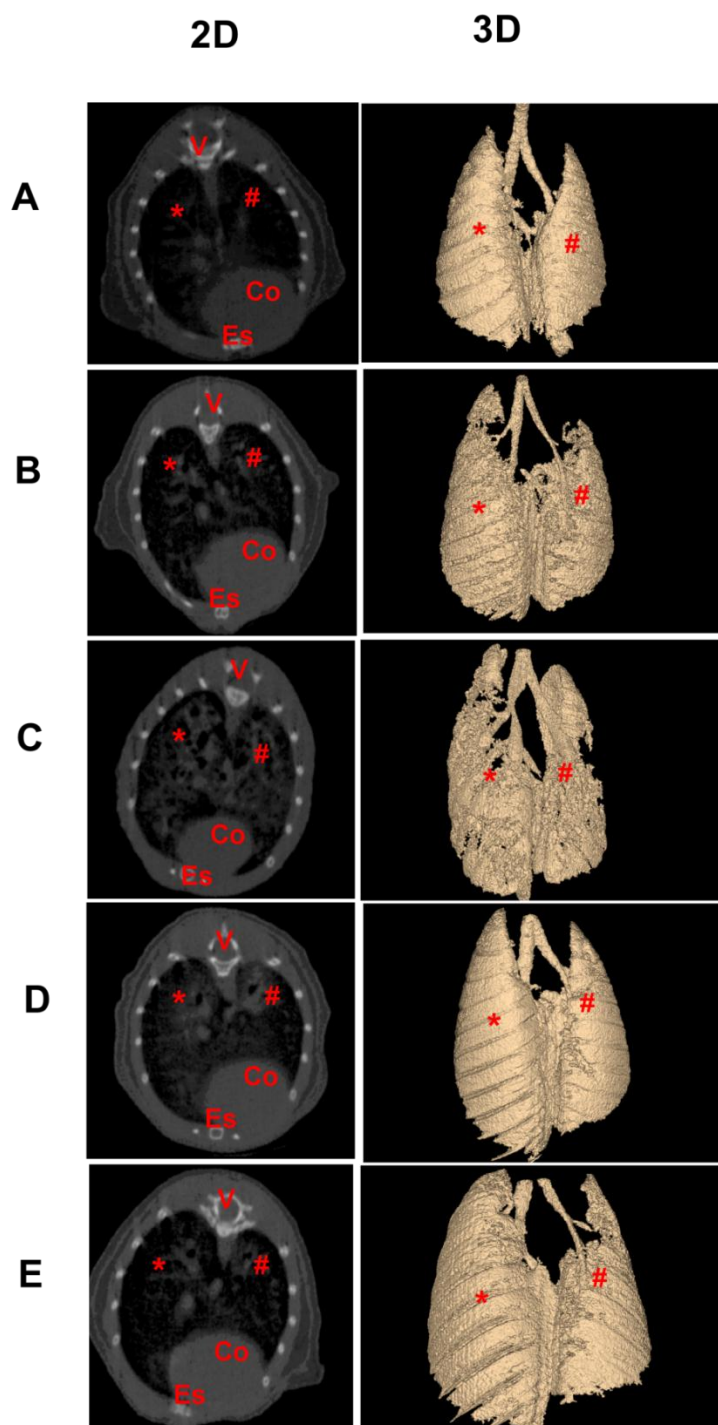


Figura 14. Análise em microtomografia computadorizada. **(A)** corte transversal representado em 2D e região anterior dos pulmões representado em 3D de animal do grupo controle negativo – PBS; **(B)** corte transversal representado em 2D e região anterior dos pulmões representado em 3D de animal do grupo controle positivo – BLM; **(C)** corte transversal representado em 2D e região anterior dos pulmões representado em 3D de animal do grupo OG desafiado com BLM; **(D)** corte transversal representado em 2D e região anterior dos pulmões representado em 3D de animal do grupo OP desafiado com BLM; **(E)** corte transversal representado em 2D e região anterior dos pulmões representado em 3D de animal do grupo NEW3 desafiado com BLM. Os animais foram analisados no 33º dia após o desafio inflamatório pulmonar. **Co:** Coração; **V:** Vértebra; **Es:** Osso esterno. * pulmão direito; # pulmão esquerdo.

5.5 Aspectos fisiológicos da função pulmonar

A fim de verificar se a administração intra-gástrica de nanoemulsão de óleo de peixe pode influenciar os aspectos fisiológicos do modelo experimental de FP, foram realizadas análises pertinentes ao funcionamento pulmonar. Entre elas, a análise da frequência respiratória e mecânica ventilatória. Os resultados estão descritos a seguir.

5.5.1 Frequência Respiratória

A frequência respiratória foi avaliada com o intuito de verificar a quantidade de incursões respiratórias dos animais do estudo em 60 segundos, no 29º dia após o desafio inflamatório.

Na figura 15, observa-se, diante dos dados obtidos, que a frequência respiratória dos grupos em que os animais foram pré-tratados com OG e desafiados com BLM apresentaram um aumento significativo comparado ao grupo controle PBS. Os grupos BLM, OP e NEW3, não apresentaram diferenças estatísticas significativas ao comparar com o grupo PBS.

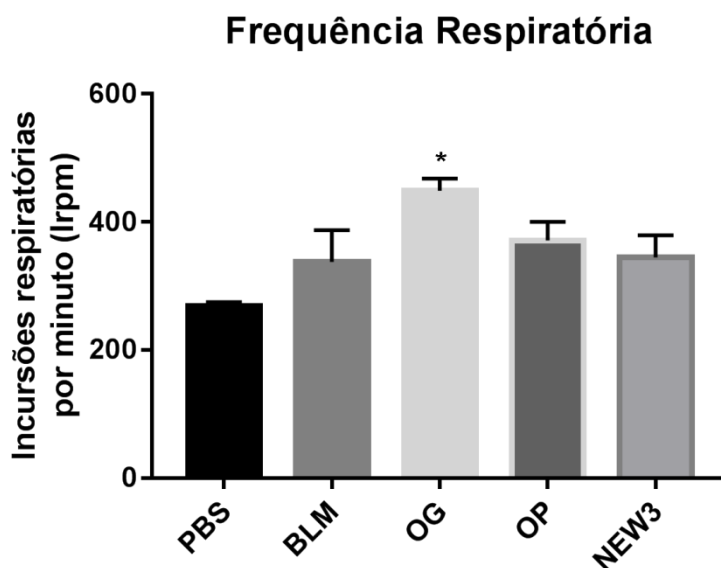


Figura 15. Frequência Respiratória no 29º dia após desafio inflamatório (n=8). Legenda: **Irpm:** incursões respiratórias por minuto. **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

5.5.2 Mecânica ventilatória pulmonar

Diante dos parâmetros fornecidos pela mecânica ventilatória, é possível estabelecer análises relevantes sobre as alterações fisiológicas do modelo experimental de FP, mediante a resistência, complacência e elastância do sistema respiratório, resistência newtoniana,

resistência e elastância tecidual.

Relacionada à resistência do sistema respiratório, na figura 16 o grupo OG apresentou dados significativos comparado com o grupo controle PBS. A ocorrência do aumento dessa resistência correlaciona com as análises histológicas que verificaram o acúmulo de colágeno e a diminuição do espaço aéreo, condicionando o aumento do esforço respiratório, visto as incursões significativamente maiores do que o grupo controle PBS, evidenciado pela FR.

Na figura 17, a complacência do sistema respiratório apresentou diminuição significativa entre os grupos BLM, OG e OP comparado com o PBS, demonstrando redução da capacidade de expansão pulmonar e conseqüentemente diminuição da ventilação alveolar. Relacionado ao grupo NEW3, este não apresentou alterações significativas, conduzindo ao entendimento de que o pré-tratamento pode ter possibilitado a preservação da capacidade inspiratória dos animais.

Em contrapartida, na figura 18, a elastância do sistema respiratório demonstrou aumento significativo nos mesmos grupos que apresentaram diminuição na complacência, enquanto que o grupo NEW3 não apresentou diferenças significativas comparado com o grupo controle negativo PBS. Diante do fato da complacência ser inversamente proporcional à elastância, pode ser observado este evento diante dessas duas figuras.

A resistência newtoniana, demonstrada na figura 19, apresentou diferenças significativas nos grupos BLM e OG comparado com PBS, demonstrando um aumento considerável da resistência nas vias aéreas. Enquanto que o grupo NEW3 não apresentou diferenças significativas comparado com o grupo controle negativo PBS.

Na resistência tecidual, houve aumento significativo da dissipação de energia do componente viscoelástico pulmonar nos grupos BLM e OG (Figura 20). Enquanto que na elastância tecidual houve aumento em BLM, OG e OP, conduzindo em pertinentes alterações das propriedades viscoelásticas desses respectivos grupos (Figura 21). Em ambos os parâmetros de R_t e E_t , o grupo NEW3 não apresentou diferenças significativas comparado com o grupo controle negativo PBS.

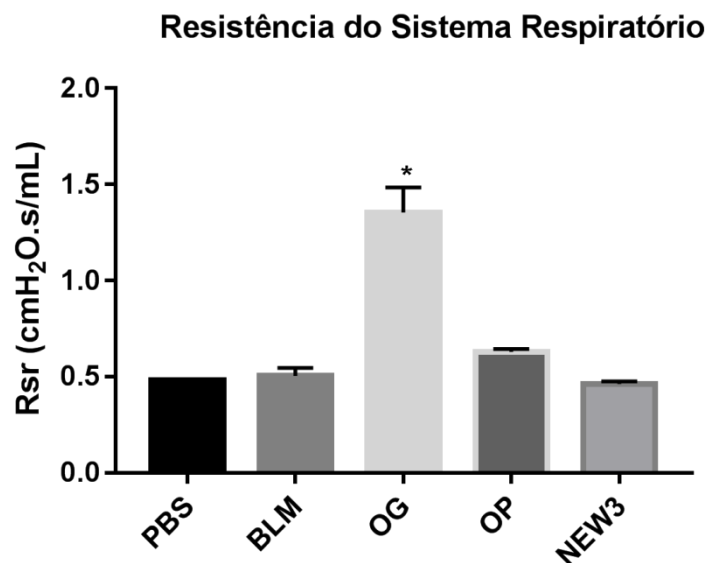


Figura 16. Resistência do Sistema Respiratório no 36° dia após desafio inflamatório (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

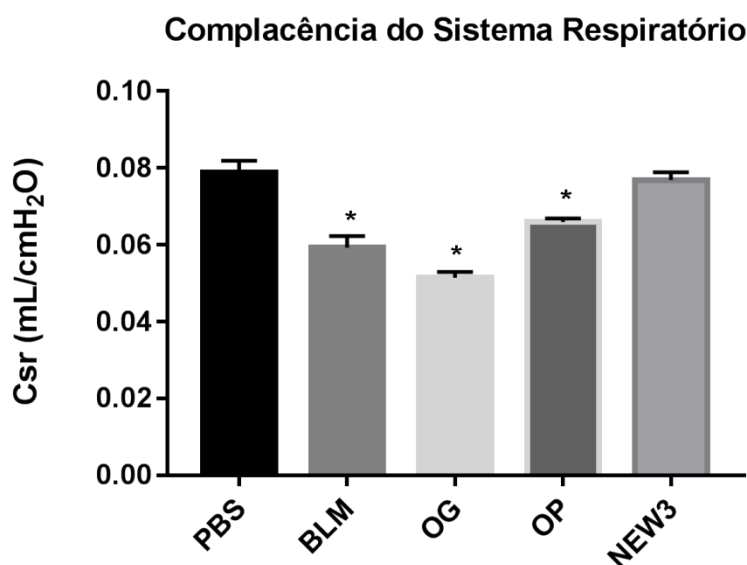


Figura 17. Complacência do Sistema Respiratório no 36° dia após desafio inflamatório (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

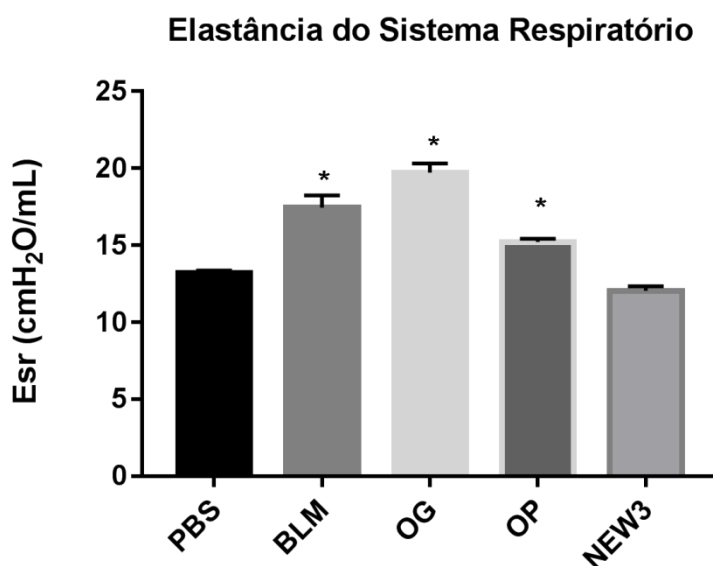


Figura 18. Elastância do Sistema Respiratório no 36° dia após desafio inflamatório (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

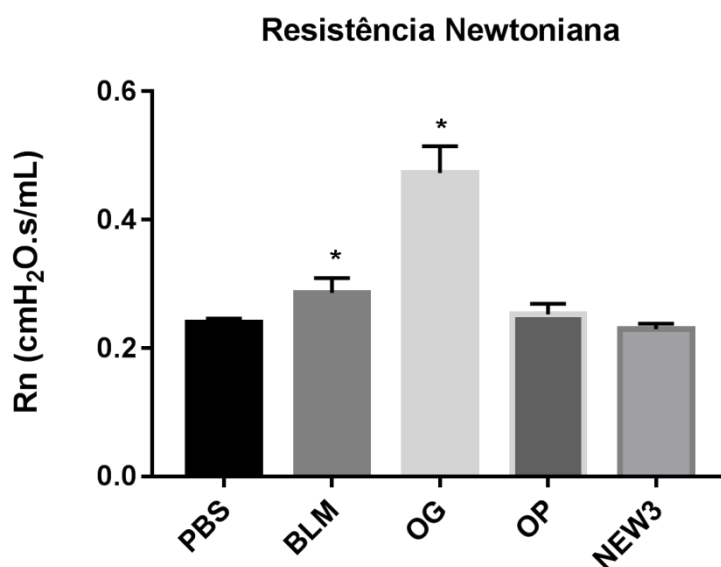


Figura 19. Resistência Newtoniana no 36° dia após desafio inflamatório (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

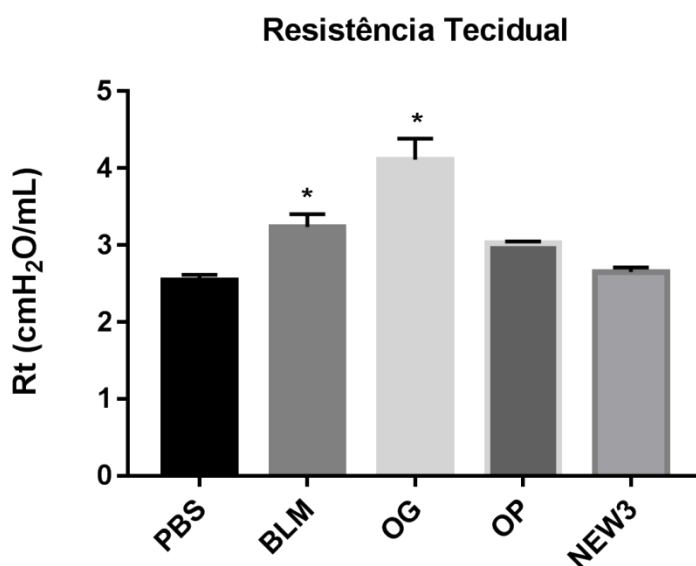


Figura 20. Resistência tecidual no 36° dia após desafio inflamatório (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

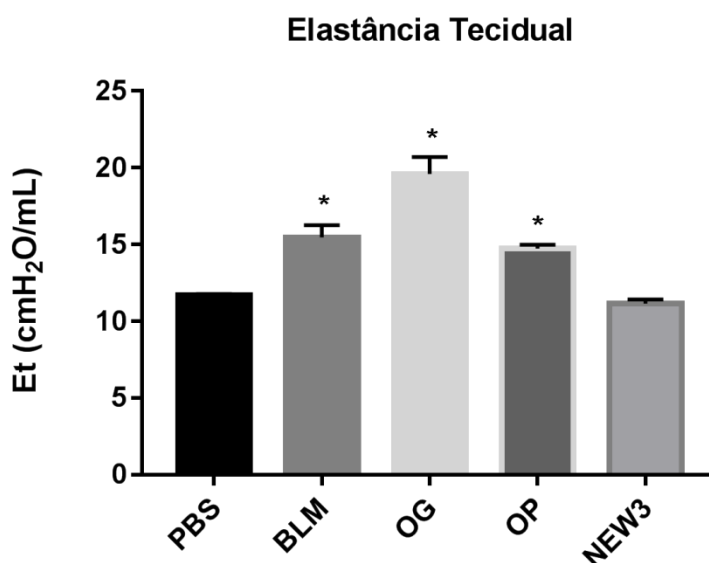


Figura 21. Elastância Tecidual no 36° dia após desafio inflamatório (n=8). Legenda: **PBS:** grupo controle negativo; **BLM:** grupo controle positivo desafiado com BLM (5 mg/mL); **OG:** grupo pré-tratado com óleo de girassol (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **OP:** grupo pré-tratado com óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL); **NEW3:** grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe (100 mg/kg) e desafiado com BLM (5 mg/mL). Os dados estão representados conforme a média \pm desvio-padrão. Os valores foram submetidos aos testes de comparações múltiplas de Tukey. *representa a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PBS.

6. DISCUSSÃO

6.1 Considerações gerais

De fato, o sistema respiratório, a todo instante, está condicionado às modificações estruturais e funcionais de processos inflamatórios, como resposta de defesa a agentes lesivos. Esse evento condiciona em estudos voltados para o tratamento e a prevenção dos distúrbios que acometem o desequilíbrio morfofisiológico dos pulmões (KADOTA et al., 2020).

Nesta vertente, a suplementação de óleo de peixe na dieta humana é reconhecida por contribuir com a atenuação de processos inflamatórios. Visto que os mecanismos para esta atividade estão relacionados à incorporação de ácidos graxos em fosfolipídios de membranas celulares, especialmente os PUFA's, EPA e DHA, presentes no óleo de peixe. Diante desta constituição fosfolipídica, rica em EPA e DHA, a produção de eicosanoides é modulada, permitindo, assim, a regulação dos mecanismos inflamatórios. Como estes ácidos graxos são obtidos exclusivamente da dieta, a suplementação de óleo de peixe com esses ativos tem sido fonte de estudo para diferentes tipos de desordens inflamatórias, incluindo as pulmonares (MANNER, 1993).

Nesse sentido, diante das limitações existentes nos tratamentos disponíveis para a fibrose pulmonar, visto que apenas desaceleram ao invés de reverter ou atenuar, o presente estudo buscou realizar um pré-tratamento com nanoemulsão de óleo de peixe em modelo experimental de fibrose pulmonar, no intuito de verificar sua influência diante dos aspectos morfofisiológicos nos pulmões.

Importante destacar que este pré-tratamento com a NEW3 não promoveu alteração significativa na massa corpórea dos animais experimentais (Figura 8), indicando que esta suplementação é tolerável dentro dos aspectos analisados.

Diante das alterações pulmonares que ocorrem após a administração única de bleomicina intratraqueal descritas na literatura, podemos dividir o processo de fibrose em três estágios: (1) estágio inflamatório agudo, estendendo-se do primeiro ao sétimo dia; (2) estágio subagudo entre o sétimo ao décimo quinto dia, no qual a resposta inflamatória é mais intensa; (3) estágio de resolução, entre o décimo quinto ao trigésimo dia, diminuindo o infiltrado inflamatório e reepitelização alveolar ou reendotelização capilar (ROSSARI, 2004).

6.2 Correlação entre massa corpórea e frequência respiratória

Diante das alterações pulmonares que a progressão fibrótica acomete, é comum observar as manifestações sistêmicas como a perda de massa corpórea relacionada à redução da capacidade respiratória, típica da inflamação pulmonar.

Nos nossos dados experimentais (figura 9), observamos que todos os animais perderam massa corpórea após o desafio inflamatório pulmonar, principalmente, no sétimo dia, visto que, conforme Rossari (2004), este período corresponde ao estágio inflamatório agudo. Além disso, entre o sétimo até o décimo quinto dia, em que a resposta inflamatória é mais intensa, percebe-se o ganho de massa dos animais pré-tratados com NEW3, enquanto que os animais pré-tratados com OG continuaram apresentando perda significativa de massa. Em suma, a perda foi mais significativa para os animais pré-tratados com óleo de girassol, enquanto que, os da NEW3 apresentaram uma perda de massa menor do que os demais grupos, OG e OP.

Estudos relacionados com a perda de peso, diante da indução de FP, mostraram que a patologia causa, justamente, a diminuição na massa corpórea dos animais como observado nos resultados do estudo. Os autores ainda complementam a importância das propriedades do ômega-3, visto que, diante dos resultados, ocorre uma atenuação das alterações incidentes, e, conseqüentemente, havendo menor perda significativa (CHEN et al., 2013; ZHAO et al., 2014).

Nesse sentido, Chen et al. (2013) também descreve sobre o fato dos animais, pós-desafio, apresentarem lentidão, hipotatividade e perda de apetite, refletindo nos dados observados tanto na massa corpórea como na FR, em que neste é mensurado o número de incursões respiratórias por minuto (figura 15). Ressaltando que, somente foi possível estabelecer uma mensuração aproximada à fidedignidade do estudo, em virtude da pouca movimentação dos animais.

Essa observação é uma importante análise que corrobora com os dados de perda de peso discutidos anteriormente. Principalmente, ao destacar que, o grupo OG foi o que mais se destacou significativamente comparado ao grupo controle negativo, apresentando um aumento das incursões respiratórias, condizendo com o que Zou et al. (2020) ressalta ao descrever que os pacientes com doença pulmonar fibrótica apresentam dispneia progressiva em virtude das alterações na resistência, complacência e elastância pulmonar, conduzindo na redução da capacidade funcional do órgão.

Defronte às análises realizadas na massa corpórea e na frequência respiratória, os animais pré-tratados com OG apresentaram resultados que comprometeram na homeostasia do organismo, ocorrendo de maneira mais significativa do que os demais grupos desafiados com BLM.

Nesse sentido, percebeu-se a necessidade de explanar, sucintamente, sobre essa influência do ômega-6 no tecido pulmonar, representado pelo óleo de girassol, na modulação inflamatória do organismo.

Diante disso, os estudos realizados em células pulmonares verificaram que os PUFAs ω -6, principalmente o AA, são precursores de mediadores pró-inflamatórios, como a PGE-2, amplificando as alterações desencadeadas nos pulmões que podem advir de fatores exógenos e/ou endógenos, enquanto que os PUFAs ω -3, em especial EPA e DHA, diminuem a produção de mediadores pró-inflamatórios nos alvéolos, por meio de seus mediadores de pró-resolução com atividade anti-inflamatória, como as PGE-3 e resolvinas da série D e E que, conseqüentemente, atenuam os danos respiratórios em modelos animais pulmonares (COTOGNI et al., 2011).

6.3 Correlação entre análise histopatológica e microtomografia computadorizada

Contudo, muitos estudos descrevem sobre o potencial da administração intra-gástrica com EPA e DHA diante dos processos inflamatórios, seja utilizando em combinação ou isolados. Entretanto, houve o interesse de verificar se a nanoformulação baseada em EPA e DHA apresenta resultados mais satisfatórios do que os descritos na literatura que não utilizam as aplicabilidades da nanotecnologia.

Assim sendo, comparando os resultados obtidos do histopatológico com os dos autores Chen et al. (2013) e Zhao et al. (2014) que utilizaram apenas o DHA em administração oral por 7 dias antes do desafio inflamatório e durante 35 dias consecutivos após o desafio, e a administração intratraqueal por 4 dias antes da indução da FP, respectivamente, percebeu-se que o efeito do óleo de peixe em nanoformulação, na fibrose pulmonar, apresenta melhora significativa ao comparar o parênquima pulmonar por H&E e Masson.

Mesmo que Chen et al. (2013) tenham utilizado o Paraquat para induzir a fibrose, a linhagem dos animais ter sido Wistar e não terem realizado a escala de Ashcroft para avaliar o grau em que se encontrava o grupo suplementado com DHA, vale destacar que, ao comparar os resultados dos autores com o do presente estudo, foi possível perceber, no histopatológico,

que os septos alveolares apresentavam espessamento mais acentuado e leve depósito de colágeno do que os resultados obtidos neste estudo correspondente ao grupo pré-tratado com NEW3 em que não apresentaram qualitativamente espessamento alveolar, correlacionando com o espaço aéreo pulmonar, e não houve presença de colágeno acentuado como no grupo OG (figura 11E e 11C, respectivamente).

Já nos resultados obtidos por Zhao et al. (2014), estes utilizaram a Bleomicina para induzir a fibrose, mas a linhagem utilizada foi C57BL/6 e o tratamento com DHA foi pela via intratraqueal. Contudo, foi realizada a escala de Ashcroft, demonstrando que no 21º dia após o desafio inflamatório, o histopatológico do grupo tratado com DHA apresentou escore de grau 2, enquanto que no presente estudo, o grupo NEW3 obteve a média de grau 1 (figura 14). Mesmo sendo graus próximos, deve ser levado em consideração, além das técnicas utilizadas, que há dois pulmões e diante da extensão pulmonar, e os aspectos da progressão fibrótica em apresentar alterações isoladas, o grupo pré-tratado com nanoemulsão de óleo de peixe promoveu atenuação mais eficiente do que a administração intratraqueal realizada pelos autores.

Entretanto, ainda vale ressaltar que, relacionado à linhagem, os camundongos BALB/c desenvolvem a fibrose pulmonar mais lentamente do que Wistar e C57BL/6, que com 21 dias já apresentam uma inflamação pulmonar bem mais acentuada de aspecto fibrótico, conforme demonstrado por Smidt (2019) ao desenvolver o modelo experimental de fibrose pulmonar em BALB/c, afirmando que com 30 dias a fibrose nesses camundongos é desenvolvida.

Nesse sentido, diante da escassez desse tipo de modelo na literatura, o estudo se propôs em realizar avaliações morfofisiológicas pertinentes às alterações inflamatórias decorrentes da progressão desta patologia, contribuindo, assim, para mais resultados relevantes dessa linhagem.

Infere-se que cada modelo animal demonstra suas peculiaridades quanto ao processo inflamatório, e que diante de Smidt (2019), a linhagem BALB/c, apesar das diferenças de tempo para desenvolvimento da fibrose pulmonar, a progressão ocorre de maneira heterogênea e o presente estudo se propôs justamente em verificar a influência do pré-tratamento com a administração intra-gástrica de nanoemulsão de óleo de peixe nos aspectos morfofisiológicos deste modelo específico, mesmo sabendo que os processos de progressão fibrótica não são idênticos, conforme Hübner et al. (2008).

A análise histopatológica é o método padrão para o diagnóstico e estadiamento de processos patológicos, entretanto como o desenvolvimento da fibrose é distribuída de maneira

heterogênea pela extensão pulmonar, apresentando áreas que, por razões ainda não compreendidas, não são afetadas, vale ressaltar a necessidade de outros exames complementares que forneçam informações diante de todos os lobos pulmonares (HÜBNER et al., 2008).

Conforme Ask et al. (2008), a tomografia computadorizada de alta resolução é uma das técnicas de imageamento essenciais para o diagnóstico e estadiamento clínico de FP, visto que quando as imagens são analisadas em 2D, podem apresentar radiopacidade como indicativo de densidade, permitindo o acompanhamento das alterações morfológicas totais do parênquima pulmonar ao longo do processo patológico. Essa técnica é bastante utilizada nas literaturas para distúrbios crônicos pulmonares caracterizados pela perda de tecido, como o enfisema e a fibrose pulmonar.

Diante de Ask et al. (2008), ao destacar que o tecido pulmonar fibrótico apresenta maior radiopacidade em comparação aos pulmões normais, esse evento pode ser confirmado em nossos resultados da figura 14 em que os grupos desafiados, BLM, OG e OP demonstraram áreas radiopacas comparadas ao grupo PBS, visto que o grupo OG foi o que mais apresentou alterações acentuadas visualmente.

Diante das análises em 2D e 3D, conforme Diao et al. (2020), a fibrose é definida com a presença dos achados radiológicos na tomografia de alta resolução: opacidade linear irregular, bandas parenquimatosas, bronquiectasias de tração e distorção pulmonar. A distribuição anatômica dessas alterações pulmonares está correspondente a todos os lobos do pulmão direito e esquerdo.

Em suma, diante das imagens reconstruídas em 2D, em cortes transversais da região pulmonar, foi possível visualizar a distribuição da radiopacidade nas regiões alteradas, estando mais proeminente, nas figuras 14B, 14C, 14D e 14E. Visto que o grupo OG apresentou alterações de radiopacidade mais acentuadas, correlacionando com os descritos por Diao et al. (2020) ao destacar a presença de opacidade linear irregular e distorção pulmonar (Figura 14C). Além disso, corroborou com os achados do histopatológico em que demonstraram a exacerbação da progressão patológica nesse grupo, comparado com o que apenas recebeu o desafio inflamatório (Grupo BLM).

Outra correlação pertinente a ser feita é com a frequência respiratória, visto que diante do grupo OG ter apresentado aumento das incursões respiratórias, apresentando uma das características respiratórias da fibrose pulmonar que é a dispneia, Marchiori, Zanetti e Hochegger (2016), demonstraram que pacientes com dispneia progressiva apresentam em tomografia computadorizada de alta resolução o espessamento nos septos interlobulares,

principalmente na base do pulmão direito. Já o grupo NEW3 não apresentou espessamento dos septos interlobulares e múltiplas lesões radiopacas (Figura 14E), demonstrando atenuação das alterações do processo progressivo da fibrose.

Vale ressaltar que a progressão da fibrose é heterogênea, conforme Castillo et al. (2019), sendo predominante nos lobos superiores e/ou médio, como pode ser observado na figura 14B e 14C nas representações em 3D, nas quais apresentam distorção da arquitetura pulmonar principalmente nesses lobos. Enquanto que no grupo NEW3 (figura 14E), a arquitetura pulmonar foi preservada, não havendo deformações exacerbadas.

Esses dados são importantes, complementando com os achados do histopatológico, em que o grupo OG apresentou massa fibrótica, presença de colágeno e menor espaço aéreo pulmonar e conseqüentemente, como visto na figura 14C em 2D, a maior radiopacidade. O grupo BLM, apresentou radiopacidade (figura 14B em 2D), mas não tão acentuada como o grupo OG, confirmando as análises realizadas na histologia pulmonar em que foi obtida uma inflamação fibrótica menos acentuada ao comparar com o grupo OG. Já o grupo NEW3, não apresentou massas fibróticas que configurassem no aumento da radiopacidade, como no grupo OP (figura 14D em 2D).

Assim sendo, estes resultados corroboram com as análises obtidas no histopatológico em que foram demonstradas tanto qualitativamente como quantitativamente as alterações fibróticas pulmonares, validando os principais aspectos da avaliação morfológica da FP neste estudo, já que enquanto nas análises histológicas é possível visualizar o tecido conforme uma limitação de amostras, o Micro-TC permite uma ampla visão da morfologia do órgão num todo diante da radiopacidade pulmonar.

Langhe et al. (2012) ressalta, justamente, esse potencial da técnica de imageamento com o uso do Micro-TC em estudos pré-clínicos e clínicos de fibrose pulmonar, permitindo a análise qualitativa e quantitativa da radiopacidade do tecido-alvo. Assim sendo, esses dados obtidos em tomografia, no presente estudo, tornaram-se importantes não apenas para correlacionar com os achados histopatológicos em camundongos BALB/c, mas também para o acompanhamento da progressão patológica em situações clínicas, visto a necessidade da utilização de exames de imagens não invasivos.

6.4 Correlação entre mecânica ventilatória pulmonar e análise histopatológica

Diante dos dados adquiridos pela mecânica, ressalta-se sua importância, visto ser um dos campos da física que analisa movimento, variações de energia e de forças que atuam

sobre um corpo, objeto ou um sistema. Nesse sentido, percebe-se a necessidade da sua mensuração e monitorização no contexto do sistema respiratório, especialmente, para a avaliação da ventilação diante dos desequilíbrios ocorridos na homeostasia do organismo decorrentes da resposta inflamatória pulmonar (SADDY, 2011).

O estudo se propôs a estabelecer uma ligação entre os parâmetros fornecidos pela mecânica ventilatória com o modelo experimental de FP no 36º dia após o desafio inflamatório pulmonar. Diante disso, observou-se alterações significativas quanto a diminuição da complacência (figura 17), aumento da elastância do sistema respiratório e tecidual (figura 18 e 21, respectivamente) e aumento da resistência do sistema respiratório, newtoniana e tecidual (figura 16, 19 e 20, respectivamente).

Estes aspectos analisados em nossos resultados estão correlacionados com os de Cano-Jiménez, González e Peloche (2018) em que descrevem sobre a progressão da fibrose pulmonar, ocasionar o aumento da elastância pulmonar e da resistência, e a diminuição da complacência. Visto que, Anciães (2011) ainda complementa que esses resultados são decorrentes das alterações na composição e distribuição da MEC, especialmente o colágeno, que influencia nas propriedades viscoelásticas dos pulmões, principalmente, nos parâmetros da resistência tecidual.

Aoki (2013) complementa que as fibras de colágeno, quando em acúmulo nos alvéolos, podem apresentar resistência a tensão, possuindo baixa extensibilidade diante da inspiração ou da insuflação do órgão. Enquanto que as fibras de elastina conferem a elasticidade no tecido e ao serem tensionadas possuem grande extensibilidade e baixa resistência à tensão.

Entretanto, Castro (2012) afirmou que os parâmetros da mecânica ventilatória são fatores complexos que ainda não são totalmente compreendidos. Mesmo assim, descreveu resumidamente que as fibras elastinas são responsáveis pela elastância e as fibras colágenas pela resistência, acarretando em alterações, não apenas no âmbito tecidual, mas também num todo do sistema respiratório, levando em consideração todos os parâmetros avaliados no presente estudo, Rsr, Csr, Esr, Rn, Rt e Et.

Apesar do autor descrever que essa explicação é muito superficial, necessitando de estudos que comprovem essa correlação entre as propriedades da mecânica ventilatória e dos achados histopatológicos, buscamos, no presente estudo, correlacionar ambos os resultados, a fim de tentar verificar a influência do pré-tratamento com nanoemulsão de óleo de peixe na progressão da fibrose em modelo experimental.

Em nossos resultados, o grupo OG foi o que apresentou aumento significativo em todos os parâmetros relacionados à resistência e elastância pulmonar, enquanto que o grupo BLM não apresentou aumento significativo na Rsr, apenas na Esr, Rn, Rt e Et, correlacionando com os resultados de Smidt (2019) em que foi verificado que os animais que receberam instilado de Bleomicina, no período de 30 dias, não apresentam significância nas propriedades resistivas do sistema respiratório diante do processo patológico. Ressalta-se diante desse evento que o pré-tratamento realizado com óleo de girassol intensificou a progressão da fibrose, acarretando no aumento das alterações morfofisiológicas.

Relacionada à complacência, houve diminuição significativa nos grupos BLM, OG e OP, confirmando com o que Cano-Jiménez, González e Peloche (2018) descreveram sobre esse declínio, já que a condição da progressão patológica acomete insuficiência respiratória, acarretando na diminuição da capacidade de expansão pulmonar e fazendo com que o órgão aumente o tamanho dos alvéolos diante da dificuldade de estabelecer as trocas gasosas. Por sua vez, o grupo OP não apresentou significância nos parâmetros da Rn e da Rt, corroborando com os achados histopatológicos e de Micro-CT, em que demonstraram um grau leve de fibrose ao comparar com os grupos BLM e OG, logo possivelmente, não apresentou estatisticamente significância diante desses parâmetros.

Considerando ainda os achados histopatológicos, pode-se inferir que o aumento da MEC no tecido pulmonar trouxe justamente alterações significativas nos nossos resultados da mecânica ventilatória, apesar das limitações do presente estudo em não ter apresentado uma análise quantitativa da presença de colágeno e elastina, foi possível apresentar qualitativamente o acúmulo de colágeno nos septos alveolares, principalmente, do grupo OG (figura 11C) e quantitativamente a área do espaço aéreo pulmonar (figura 12), visto que por esse acúmulo de MEC, houve uma diminuição do espaço decorrente da distorção, mesmo que ainda moderada da arquitetura pulmonar.

Ao avaliar o grupo NEW3, este não apresentou alterações significativas, comparado ao grupo controle negativo PBS, em Rsr, Csr, Esr, Rn, Rt e Et. Condizendo com estudos de Zhao et al. (2014) em que observaram em seus dados de resistência e elastância tecidual que o DHA administrado via intratraqueal atenuava a fibrose pulmonar, mediante a diminuição desses parâmetros.

Anciães (2011) ainda destaca que os resultados da complacência pulmonar refletem na perda de tecido e enrijecimento da caixa torácica, resultada de alterações pertinentes às propriedades biológicas e físicas do órgão, em virtude do remodelamento do parênquima pulmonar, uma das características principais do processo fibrótico.

Vale ressaltar que, diante dos resultados da Csr relacionado ao grupo NEW3, este não apresentou diferenças estatísticas ao comparar com grupo PBS, enquanto que os outros grupos BLM, OG e OP apresentaram diminuição, sendo que enquanto estes apresentaram aumento de resistência e elastância, a NEW3 não apresentou diferenças estatísticas diante do grupo controle negativo PBS. Esses resultados corroboram tanto com os achados histopatológicos como também com os do Micro-TC em que demonstram as alterações pertinentes à arquitetura pulmonar, estando mais acentuada no grupo OG e atenuada no grupo NEW3.

Diante dos resultados da mecânica respiratória em camundongos desafiados com BLM, percebeu-se que a NEW3 condicionou uma proteção pulmonar ao comparar com outros grupos que apresentaram alterações significativas para com o grupo controle negativo PBS. Assim, a análise possibilitou uma repercussão satisfatória nos camundongos pré-tratados com a nanoemulsão de óleo de peixe.

6.5 Relevância do estudo

Diante do período de tratamento com administração oral empregados por Chen et al. (2013) e Hanssens et al. (2016) em testes pré-clínicos e clínicos, percebeu-se que a suplementação, seja na combinação de EPA e DHA ou isolados, demonstra resultados satisfatórios após um determinado período de tratamento, seja em 42 dias nos camundongos ou três meses em humanos, como descrito pelos autores.

Zhao et al. (2014) realizaram o tratamento com DHA pela via intratraqueal por quatro dias, em virtude de afirmarem sobre os PUFAs serem ácidos instáveis e propensos a oxidação. Mas, apesar dos resultados terem sido satisfatórios, o método da administração foi invasivo, conduzindo ao entendimento de que uma administração oral é bem mais vantajosa e de baixo custo.

Embora a administração intra-gástrica e a administração via intratraqueal, seja em testes pré-clínicos ou clínicos, apresentem resultados diferentes diante das particularidades das respostas fisiológicas de cada organismo. O presente estudo tentou propor um modelo inflamatório pulmonar que demonstrasse relevância diante dos resultados já presentes na literatura. Contudo, vale ressaltar que as diferenças de cada estudo publicado inferem na afirmação de que a nanoemulsão de óleo de peixe garante resultados superiores aos existentes.

Tomando em conjunto os resultados e discussões apresentados, podemos dizer que a atenuação da fibrose pulmonar foi mais evidente nos animais tratados com a NEW3, em

comparação aos tratamentos com OP. Segundo dados da literatura e dados do nosso grupo de pesquisa (SANTOS, 2020), podemos explicar este evento por diferentes fatores.

Entre os quais, destacamos que a nanoemulsão: (1) Aumenta a dispersibilidade do OP em água, facilitando a permeabilidade nas membranas de fosfolípidios e otimizando os efeitos moduladores da inflamação relacionados aos ácidos graxos presentes nos óleos de peixe. (AHMAD et al., 2020); (2) Melhora a absorção de moléculas hidrofóbicas do OP pela via de administração oral (LIMA, 2016); (3) Promove proteção química dos ativos dos PUFAs dentro da nanoemulsão (WALKER; DECKER; MCCLEMENTS, 2014). Isso em conjunto, justifica a utilização do nanocarreador lipídico para a administração do óleo de peixe com finalidades de prevenção da inflamação.

Este é o primeiro estudo descrevendo sobre os benefícios da nanoemulsão de óleo de peixe na morfofisiologia pulmonar, já que os estudos que existem, de modelos inflamatórios, utilizando a administração oral com nanoformulação de EPA e DHA, foram realizados em modelos de edema de pata e sepse, como pelo nosso grupo de pesquisa (SANTOS, 2020). Ressaltando a relevância do presente estudo diante do modelo experimental de fibrose pulmonar em camundongos BALB/c. Ademais, pelo fato da administração da NEW3 ter sido realizada por via intra-gástrica, torna o projeto bastante atrativo para estudos clínicos futuros.

6.6 Críticas ao estudo

Uma crítica importante que pode ser feita foi em relação à sobrevivência dos grupos desafiados com Bleomicina. Antes do início do estudo, era esperada a ocorrência de óbitos relacionados à condição da progressão patológica, entretanto além de óbitos no momento do processo cirúrgico para induzir a inflamação pulmonar, ocorreram óbitos inesperados durante o processo de aquisição de imagens no Micro-TC, visto que, apesar de não ter sido descrito na metodologia, a análise desta técnica de imageamento correspondia ao período em tempos de 5°, 15° e 30° dia após o desafio inflamatório, para justamente avaliar a progressão da radiopacidade no pulmão.

Entretanto, diante das manifestações sistêmicas da resposta inflamatória aguda, a debilidade dos animais estava acentuada, e a intensidade de dose anestésica pode ter influenciado nos óbitos, visto que eram constatados após os procedimentos no Micro-TC que duravam em torno de 10 a 30 min, quando ocorria a liberação do animal no aparelho. Ao final do estudo, diante do total de camundongos por grupos desafiados com Bleomicina (n=8) sobreviveram: BLM (n=4), OG (n=4), OP (n=6) e NEW3 (n=5) (Figura 10). Diante disso,

optou-se em não apresentar os resultados e colocá-los como crítica descritiva no presente estudo.

Visto que, seria necessário repetição do trabalho para que possa ser avaliada exatamente a sobrevivência dos animais e a radiodensidade em períodos de tempo para acompanhamento da progressão fibrótica, principalmente, dos grupos OG e NEW3 que diante dos resultados apresentados e discutidos, apresentaram características relevantes ao estudo.

6.7 Perspectivas ao estudo

Considerando as análises realizadas frente à administração intra-gástrica de nanoemulsão de óleo de peixe em modelo experimental de fibrose pulmonar, considera-se interessantes avaliações, não apenas com intuito preventivo da desregulação do processo inflamatório dos pulmões, mas também, com intuito terapêutico, visto que no presente trabalho foi realizado um pré-tratamento, considerando que para a patologia não progredir e apresentar efeitos atenuantes, seria necessário que o organismo já estivesse preparado anteriormente com as propriedades do ômega-3 para que não a desenvolvesse de maneira exacerbada.

Seria interessante, também apresentar um modelo de inflamação pulmonar em que a indução fosse realizada no mesmo dia que o tratamento com NEW3, proporcionando, provavelmente, avaliações relevantes e questionadoras quanto à eficiência do nanocarreador, direcionando-o a avanços para a parte clínica.

Outro aspecto necessário a serem ressaltado, como perspectiva ao estudo, é a validação do projeto experimental, visto que as análises realizadas podem ser complementadas com outras como na parte do histopatológico ser realizada a imunohistoquímica para analisar anti-colágeno tipo I e anti-proteína surfactante A (SP-A), por exemplo, e quantificação do colágeno; na parte do Micro-TC realizar a escala de Hounsfield para estabelecer uma quantificação da densidade presente no tecido pulmonar.

7. CONCLUSÃO

As conclusões deste estudo apontaram, diante dos resultados alcançados que:

1. A Bleomicina aplicada em dose única, por método cirúrgico via intratraqueal, alterou as propriedades morfofisiológicas dos pulmões em camundongos BALB/c fêmeas. Dentro do período de 36 dias, desenvolveu-se a lesão pulmonar com progressão fibrótica, caracterizada pela perda de massa corpórea, acúmulo de colágeno nos septos alveolares, espessamento do septo alveolar diante da diminuição da área do espaço aéreo pulmonar, gravidade do grau de fibrose por escala Ashcroft, aumento da radiopacidade pulmonar, aumento da Rsr, Esr, Rn, Rt e Et, e diminuição da Csr;
2. A administração intra-gástrica com nanoemulsão de óleo de peixe promoveu atenuação na progressão fibrótica pulmonar, diante dos aspectos morfológicos, sendo apresentados nas análises histopatológicas, evidenciadas por alvéolos pulmonares sem acúmulo exacerbado de massas fibróticas e ausência de deformação na estrutura alveolar, área do espaço aéreo pulmonar sem alterações significativas, grau gravidade de fibrose pulmonar 1, e no Micro-TC, evidenciado por ausência de septos interlobulares radiopacos, arquitetura pulmonar preservada;
3. A administração intra-gástrica com nanoemulsão de óleo de peixe promoveu atenuação na progressão fibrótica pulmonar, diante dos aspectos fisiológicos, destacados nas análises de frequência respiratória e mecânica ventilatória pulmonar, nos quais não apresentou diferença estatística com o grupo controle negativo.

Sendo assim, o presente estudo sugere que a administração intra-gástrica com nanoemulsão de óleo de peixe pode auxiliar na atenuação das alterações inflamatórias, conferindo uma proteção da homeostase pulmonar.

REFERÊNCIAS

ABIDI, A. et al. Protective Effect of Tunisian Flaxseed Oil against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. **Nutrition and Cancer**, p. 1–13, 2019. doi:10.1080/01635581.2019.1622741.

ABIDI, A. et al. A comparative study of Intratracheal and aerosolization instillations of bleomycin inducing experimental lung fibrosis in rat. **Toxicology Mechanisms and Methods**, p. 1–30, 2018. doi:10.1080/15376516.2018.1512181.

AHMAD, M. Z. et al. Omega-3 fatty acids as adjunctive therapeutics: prospective of nanoparticles in its formulation development. **Therapeutic Delivery**, v. 11, n. 1, p. 851-868, 2020. doi:10.4155/tde-2019-0072.

ANCIÃES, A. M. Análise temporal da mecânica respiratória e morfometria pulmonar em camundongos após instilação nasal de papaína. **Dissertação (mestrado)**. Faculdade de Medicina da Faculdade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental. São Paulo, 2011.

AOKI, F. G. Modelos matemáticos aplicados na avaliação da mecânica respiratória em camundongos com desafios de agonista da musculatura lisa. **Dissertação (mestrado)**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle. São Paulo, 2013.

ASHCROFT, T.; SIMPSON, J. M.; TIMBRELL, V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. **J. Clin. Pathol.**, v. 41, p. 467-470, 1988.

ASK, K. et al. Comparison between conventional and "clinical" assessment of experimental lung fibrosis. **Journal of Translational Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2008. doi:10.1186/1479-5876-6-16.

AUN, M. et al. Animal models of Asthma: utility and limitations. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 10, p. 293-301, 2017. doi: 10.2147/JAA.S121092.

BALIC, A. et al. Omega-3 Versus Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Inflammatory Skin Diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 3, p. 1-26, 2020. doi:10.3390/ijms21030741.

BHARDWAJ, K. et al. Significance of Ratio of Omega-3 and Omega-6 in Human Health with Special Reference to Flaxseed Oil. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 10, p. 1-6, 2016. doi: 10.3923/ijbc.2016.1.6.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645-662, 2013. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids and inflammation: From molecular biology to the clinic. **Lipids**, v. 38, n. 4, p. 343-352, 2003. doi:10.1007/s11745-003-1068-y.

CANO-JIMÉNEZ, E.; GONZÁLEZ, F. H.; PELOCHE, G. B. Comorbidities and Complications in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Med. Sci.**, v. 6, n. 71, p. 1-13, 2018. doi:10.3390/medsci6030071.

CAPUTO, L. S. et al. Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. **International Immunopharmacology**, v. 80, 2020. doi:10.1016/j.intimp.2019.106177.

CASTILLO, D. et al. A multidisciplinary proposal for a diagnostic algorithm in idiopathic pulmonary fibrosis: The role of transbronchial cryobiopsy. **Arch. Bronconeumol.**, v. 56, n. 2, p. 99-105, 2019. doi:10.1016/j.arbr.2019.07.005.

CASTRO, C. A. C. R. Estudo das propriedades mecânicas e análise histopatológica do sistema respiratório de ratos tratados com docetaxel. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Medicina. Pós-graduação em Ciências Médicas. Universidade de Brasília. Brasília-DF, 2012.

CHEN, J. et al. Docosahexaenoic acid (DHA) ameliorates paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats possibly through up-regulation of Smad 7 and SnoN. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 330-337, 2013. doi:10.1016/j.fct.2013.03.045.

COTOGNI, P. et al. Impact of the ω -3 to ω -6 Polyunsaturated Fatty Acid Ratio on Cytokine Release in Human Alveolar Cells. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 114-121, 2011. doi:10.1177/0148607110372392

DAS, U. N. Molecular pathobiology of scleritis and its therapeutic implications. **Int. J. Ophthalmol.**, v. 13, n. 1, p. 163-175, 2020. doi:10.18240/ijo.2020.01.23.

DAVIDSON, M. H. et al. A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: The

ECLIPSE (Epanova® compared to Lovaza® in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 6, n. 6, p. 573–584, 2012. doi:10.1016/j.jacl.2012.01.002.

DE VIZIA, B. et al. Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 52–57, 2003. doi:10.1177/014860710302700152.

GANAPATHY, A. et al. Cadaveric Study of Lung Anatomy: A Surgical Overview. **J. Med. Res. Innov.**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2019. doi: 10.32892/jmri.149.

GHORASHI, M. et al. The attenuating effect of aqueous extract of licorice on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Food and Agricultural Immunology**, v. 28, n. 1, p. 67–77, 2016. doi: 10.1080/09540105.2016.1203294.

GILHODES, J.-C. et al. Quantification of Pulmonary Fibrosis in a Bleomycin Mouse Model Using Automated Histological Image Analysis. **Plos One**, v. 12, n. 1, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0170561.

GLASSER, S. W. et al. Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 5, p. 1066–1077, 2016. doi:10.1016/j.ajpath.2016.01.018.

HANSSSENS, L. et al. The clinical benefits of long-term supplementation with omega-3 fatty acids in cystic fibrosis patients – A pilot study. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 108, p. 45–50, 2016. doi:10.1016/j.plefa.2016.03.014.

HÜBNER, R.-H. et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. **BioTechniques**, v. 44, n. 4, p. 507-517, 2008.

JANSSEN-HEININGER, Y.; ANATHY, V. Redox mechanisms in pulmonary disease: Emphasis on pulmonary fibrosis. **Oxidative Stress**, p. 735–758, 2020. doi:10.1016/b978-0-12-818606-0.00035-3.

KADOTA, T. et al. Extracellular vesicles in fibrotic diseases: New applications for fibrosis diagnosis and treatment. **Exosomes**, p. 307–323, 2020. doi:10.1016/b978-0-12-816053-4.00013-4.

LANGHE, L. D. et al. Quantification of Lung Fibrosis and Emphysema in Mice Using Automated Micro-Computed Tomography. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. 1-11, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0043123.

LIU, T.; SANTOS, F. G.; PHAN, S. H. **The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis**. In: RITTIÉ, L. (eds). *Fibrosis: Methods in Molecular Biology*, v. 1627. Humana Press, New York, NY, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-7113-8_2.

LONGO, J. P. F. et al. Nanomedicine for cutaneous tumors – lessons since the successful treatment of the Kaposi sarcoma. **Nanomedicine**, v. 13, n. 23, p. 2957–2959, 2018. doi:10.2217/nmm-2018-0374.

MARCHIORI, E.; ZANETTI, G.; HOCHHEGGER, B. Espessamento de septos interlobulares. **J. Bras. Pneumol.**, v. 42, n. 2, p. 161-161, 2016.

MANNER, T. Fish oils and the lung. **Clinical Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 131–146, 1993. doi:10.1016/0261-5614(93)90072-c.

MELO-SILVA, C. A. et al. Respiratory mechanics and lung tissue remodeling in a hepatopulmonary syndrome rat model. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 179, p. 326–333, 2011. doi:10.1016/j.resp.2011.10.001.

MOLFINO, A. et al. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both? **Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–6, 2017. doi:10.1155/2017/5987082.

MUKHIA, R. et al. Morphological and morphometrical studies of the human foetal lung. **Asian Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 5, p. 75-79, 2019. doi:10.3126/ajms.v10i5.22136.

MURTHA, L. A. et al. The Processes and Mechanisms of Cardiac and Pulmonary Fibrosis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1-15, 2017. doi:10.3389/fphys.2017.00777.

PARKER, Steve. **O livro do Corpo Humano**. [tradução: Prof. Dr. Esem Pereira Cerqueira, Dr. Adriano Ferreira da Silva e Prof. Claudio Fava Chagas. ed. 2. São Paulo: Ciranda Cultural, 2017.

PIPER, K.; GARELNABI, M. Eicosanoids: Atherosclerosis and Cardiometabolic Health. **Journal of Clinical & Translational Endocrinology**, 2020. doi:10.1016/j.jcte.2020.100216.

RODT, T. et al. Micro-computed tomography of pulmonary fibrosis in mice induced by adenoviral gene transfer of biologically active transforming growth factor- β 1. **Respiratory Research**, v. 11, n. 181, 1-8, 2010. doi:10.1186/1465-9921-11-181.

SADDY, F. Avaliação da Mecânica Respiratória na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. **Pulmão RJ**, v. 20, n. 1, p. 31-36, 2011.

SAINI, R. K.; KEUM, Y.-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance-A review. **Life Sciences**, v. 203, p. 255–267, 2018. doi:10.1016/j.lfs.2018.04.049.

SANTOS, D. S. Nanoformulação a base de ácidos graxos EPA (eicosapentaenoico 20:5 ω -3) e DHA (docosahexaenoico 22:6 ω -3) para administração oral e seu efeito em distúrbios inflamatórios. **Tese (Doutorado)**. Instituto de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia. Universidade de Brasília. Brasília-DF, 2019.

SMIDT, K. S. Bases moleculares da modulação da Fibrose Pulmonar e possíveis aplicações terapêuticas. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular))**. Universidade de Brasília, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Brasília-DF, 2019.

SUN, P. et al. Understanding of COVID-19 based on current evidence. **Journal of Medical Virology**, 2020. doi:10.1002/jmv.25722.

VELDHUIZEN, R. A. W. et al. The effects of aging and exercise on lung mechanics, surfactant and alveolar macrophages. **Experimental Lung Research**, v. 45, n. 5-6, p. 113–122, 2019. doi:10.1080/01902148.2019.1605633.

WALKER, R.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. **Food & Function**, v. 6, n. 1, p. 41–54, 2014. doi:10.1039/c4fo00723a.

WU, E. K. et al. Restrictive lung disease in TNF-transgenic mice: correlation of pulmonary function testing and micro-CT imaging. **Experimental Lung Research**, p. 1–13, 2019. doi:10.1080/01902148.2019.1636899.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–1040, 2012. doi:10.1038/nm.2807.

YAO, H. et al. Kangfuxin Oral Liquid Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis via the TGF- β 1/Smad Pathway. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-14, 2019. doi:10.1155/2019/5124026.

ZHAO, H. et al. Pulmonary delivery of docosahexaenoic acid mitigates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014. doi:10.1186/1471-2466-14-64.

ZOU, R. H. et al. The Role of Palliative Care in Reducing Symptoms and Improving Quality of Life for Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Review. **Pulmonary Therapy**, 2020. doi:10.1007/s41030-019-00108-2.

PRINCIPAIS ATIVIDADES DURANTE MESTRADO ACADÊMICO

-Artigos completos publicados em periódicos

1. SOARES, Adriana Cunha Lima; BRASILEIRO, Marislei; SOUZA, Danielle Galdino de. Acolhimento com classificação de risco: atuação do enfermeiro na urgência e emergência. **Revista Recien-Revista Científica de Enfermagem**, São Paulo, v. 8, n. 22, p. 22-33, 2018.
2. CÉZAR, Poliana Rodrigues; BRASILEIRO, Marislei; SOUZA, Danielle Galdino de. Relato de experiência: estresse ocupacional no serviço de urgência e emergência vivenciado no interior do Estado do Pará. **Revista Recien-Revista Científica de Enfermagem**, São Paulo, v. 8, n. 22, p. 82-92, 2018.
3. SILVA, Dejacy Dias; BRASILEIRO, Marislei; SOUZA, Danielle Galdino de. Relação entre envelhecimento da população e o risco de quedas: revisão integrativa. **Revista Recien-Revista Científica de Enfermagem**, São Paulo, v. 8, n. 23, p. 28-38, 2018.
4. SOUZA, Danielle Galdino de; SILVA, Marcia Lopes da; TOMASI, Marina; FERREIRA, Milene Maria; GUIDÃO, Nithya Deyelly Batista Neves; SILVA, Sebastião Andrade e. Assistência de enfermagem às crianças e adolescentes com insuficiência renal crônica: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Remecs-Revista Multidisciplinar de Estudos Científicos em Saúde**, São Paulo, v. 3, p. 28-37, 2018.
5. ROSA, Edmilson Fernandes; SILVA, Sebastião Andrade e; SOUZA, Danielle Galdino de. Assistência de enfermagem humanizada em emergências traumáticas: uma revisão bibliográfica. **Revista Recien-Revista Científica de Enfermagem**, São Paulo, v. 9, p. 11-17, 2019.
6. GUIDÃO, Nithya Deyelly Batista Neves; VIEIRA, Ana Paula Timóteo; ALMEIDA, Ludmila Batista de Bulhões; VASCONCELOS, Mariá de Oliveira; SILVA, Paula Viviane Peixoto da; SOUZA, Danielle Galdino de. Assistência de enfermagem no cuidado às gestantes com complicações da síndrome hipertensiva gestacional: uma revisão integrativa. **Revista Recien-Revista Científica de Enfermagem**, São Paulo, 2020; v. 10, n. 29, p. 173-179, 2020.
7. PACHECO, Thyago José Arruda; SOUZA, Danielle Galdino de; LIMA, Luiza Ianny de; LONGO, João Paulo Figueiró. Panorama mundial de estudos com a hidroxicloroquina para o tratamento da COVID-19. **J. Health Biol. Sci.**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2020.

-Resumos publicados em Anais de Congresso

SOUZA, D. G.; NOVAIS, C. U. I. ; BORGES, M. B. S.; SILVA, S. A.; SANTOS, D. S.; LONGO, J. P. F. Relato de experiência: a importância da nanotecnologia para a área de Enfermagem. In: IX Simpósio Internacional CEEN - Unidade de Terapia Intensiva, 2019, Goiânia. **Anais 2019 IX Simpósio Internacional CEEN**. Goiânia: CEEN, 2019. v. 3. p. 1-400.

-Apresentações de trabalhos

1. SOUZA, D. G.; NOVAIS, C. U. I. ; BORGES, M. B. S.; SILVA, S. A.; SANTOS, D. S.; LONGO, J. P. F. **Relato de experiência:** a importância da nanotecnologia para a área de Enfermagem. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. SOUZA, D. G.; SILVESTRE, F. A. **Dia Mundial de Segurança do Paciente.** 2019. (Palestra)
3. SOUZA, Danielle Galdino de. **Rotinas Acadêmicas de Enfermagem.** 2018. (Palestra).

- Participação em eventos e congressos

- II Seminário Nacional de Epistemologia do romance: o estético como espaço de entendimento do humano – Carga Horária 40 h (2018)
- Encontro Nacional de Pesquisa em Oncologia - 2019
- I Congresso Internacional de Farmacologia Molecular Aplicada – 2019
- Oficina - Métodos Alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil – 2019
- IX Simpósio Internacional CEEN - Unidade de Terapia Intensiva. – Carga Horária 10 h (2019)
- Seminário Pipetas Rainin: Boas práticas de pipetagem para resultados mais consistentes – Carga Horária 2 h (2019)
- I Congresso Brasileiro de Nanomedicina – 2019
- 5ª Conferência Internacional em Nanociência. Nanotecnologia e Nanobiotecnologia – 2019

ANEXO I. Informações nutricionais do produto Ômega-3 DHA 500.**Quantidade por 3g (3 cápsulas)**

	Quantidade por porção	% VD (*)
Valor Energético	27kcal = 113kJ	1
Carboidratos	0g	0
Proteínas	0g	0
Gorduras Totais	3g	6
Gorduras Saturadas	0g	0
Gorduras Trans	0g	**
Gorduras monoinsaturadas	0,3g	**
Gorduras Poli-insaturadas, das quais:	1,8g	**
EPA (Ác. Eicosapentaenoico)	0,3g	**
DHA (Docosaheptaenoico)	1,5g	**
Fibra Alimentar	0g	0
Sódio	0mg	0
Vitamina E	6mg	60

(*) % Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

**Valores diários não estabelecidos.

Ingredientes:

Óleo de peixe, antioxidante - Vitamina E, gelificante - Gelatina Farmacêutica, umectantes - Glicerina e veículo - Água.

Contém 500mg de ácido graxo docosaheptaenoico (DHA) e 100mg de ácido graxo eicosapentaenoico (EPA) por cápsula.

Pessoas que apresentem doenças ou alterações fisiológicas, gestantes, nutrizes e crianças devem consultar o médico antes de usar o produto.

Pessoas alérgicas a peixes e crustáceos devem evitar o consumo deste produto.

O Ministério da Saúde adverte: Não existem evidências científicas comprovadas de que este alimento previna, trate ou cure doenças.

SKU: 1321041121

ANEXO II. Informações nutricionais do produto Óleo de Girassol Liza 900 mL.

Porção 13 ml (1 colher de sopa)		
	Quantidade por porção	% VD (*)
Valor energético	108 kcal= 454 kj	5
Carboidratos	0 g	0
Proteínas	0 g	0
Gorduras totais	12 g, das quais:	22
Gorduras saturadas	1,2 g	5
Gorduras <i>trans</i>	não contém	(**)
Fibra alimentar	0 g	0
Sódio	0 mg	0
Vitamina E	4,8 mg	48

*% Valores diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kj. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

**VD não estabelecido.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 30 de setembro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO A PARTIR DA NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE PEIXE NA FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA"**. Protocolo n.º 97/2019, sob responsabilidade do Professor João Paulo Figueiró Longo, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (25 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/11/2019 a 01/5/2020.

Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo

Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.