

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

Paula Naomi Nonaka

“Análise das propriedades mecânicas e histologia de tecido pulmonar em modelo experimental de lesão aguda induzida pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*”

São José dos Campos

2006

Paula Naomi Nonaka

“Análise das propriedades mecânicas e da histologia de tecido pulmonar em modelo experimental de lesão aguda induzida pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*”

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestrado em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof^o Dr. Luís Vicente Franco de Oliveira

São José dos Campos

2006

N737a

Nonaka, Paula Naomi

Análise das propriedades mecânicas e da histologia de tecido pulmonar em modelo experimental de lesão aguda induzida pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* / Paula Naomi Nonaka. São José dos Campos: UniVap, 2006. 106.: il.; 31cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Pulmão/Histologia 2. Venenos de cobra 3. Venenos de crotalídeos 4. *Crotalus durissus terrificus* 5. Mecânica respiratória I. Oliveira, Luis Vicente Franco de, Orient. II. Título

CD: 611,24

Autorizo, para fins acadêmicos e científicos, a cópia total ou parcial desta Dissertação por fotocópia ou meio eletrônico, desde que citada a fonte.

Aluna:



Data: São José dos Campos, 8 de agosto de 2006.

**“ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E HISTOLOGIA DE TECIDO PULMONAR
EM MODELO EXPERIMENTAL DE INJÚRIA AGUDA INDUZIDA PELO VENENO DE
SERPENTE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*”**

Paula Naomi Nonaka

Banca Examinadora:

Profª. Dra. **STELLA R. ZAMUNÉR** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **LUIZ VICENTE FRANCO OLIVEIRA** (UNIVAP) _____

Profª. Dra. **CAROLINA FÚ** (USP) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

Á minha família que tanto me apoiou, permitindo a finalização de mais uma grande etapa.

Agradecimentos

Ao Professor e Orientador Luís Vicente Franco de Oliveira, pela confiança, paciência, ensinamentos e acima de tudo, pela amizade.

Aos meus pais, que nunca me permitiram desistir e acreditaram em mim em toda essa caminhada, sem sua ajuda e carinho, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, simplesmente por existirem e compreenderem os momentos de tensão, me ensinando que paciência sempre foi uma das melhores virtudes.

À Ana Cláudia Paneque Peres, companheira e amiga indispensável na realização deste trabalho.

Ao amigo Rodolfo de Paula Vieira que, com paciência e boa vontade, compartilhou seus conhecimentos em histologia.

Aos Professores César Melo Silva e César Amorim pela disposição e paciência.

Aos Professores José Carlos Cogo e Wellington Ribeiro, por me permitirem o uso de seus laboratórios e instrumentos, e por seus ensinamentos.

Às minhas queridas amigas de laboratório que, juntas, compartilharam os momentos de estudo, descontração, preocupação e as correrias do dia-a-dia.

Aos meus amigos pela compreensão nos momentos de ausência, pela presença nos momentos de fraqueza e pela companhia nos momentos de alegria.

Às amigas do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica pela ajuda, paciência e companhia.

Aos Professores Paulo Barja e Marco Antônio, pelas dúvidas resolvidas.

À Ivone, Valéria e Anderson, funcionários do IP&D, por toda ajuda prestada.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira, contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

**“Dê um peixe a um homem faminto e
você o alimentará por um dia. Ensine-o a
pescar, e você o estará alimentando pelo
resto da vida”.**

(Provérbio chinês)

“Análise das propriedades mecânicas e da histologia de tecido pulmonar em modelo experimental de lesão aguda induzida pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*”

Resumo

Investigações específicas sobre as repercussões do veneno de *Crotalus durissus* da espécie *terrificus*, no sistema respiratório, são escassos, portanto, o comportamento das propriedades mecânicas do sistema respiratório, a caracterização das estruturas pulmonares e a quantificação do processo inflamatório gerado são pouco conhecidos. Por isso, faz – se necessário conhecer os efeitos desta possível lesão para que, em eventual acometimento, a intervenção terapêutica seja a mais precoce e eficiente possível. O objetivo deste estudo foi analisar as propriedades mecânicas dos pulmões e sua histologia, em modelo experimental de injúria pulmonar aguda induzida pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*). Foram estudados 45 camundongos *Swiss*, analisados 3 (V3), 6 (V6), 12 (V12), e 24 (V24) horas após injeção intramuscular de solução salina, para o grupo controle, e veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* ($0,6 \mu\text{g.g}^{-1}$), para os grupos veneno. A dose sub-letal utilizada nos grupos veneno foram determinadas através da DL_{50} obtida previamente. Os parâmetros mecânicos foram coletados através do Método de Oclusão ao Final da Inspiração, posteriormente foi realizado a análise histológica. A análise estatística foi realizada através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, teste Kruskal-Wallis ANOVA e o teste de Dunn's para comparações múltiplas, para análise das variâncias. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Os valores de elastância estática e dinâmica aumentaram significativamente após 3 horas da aplicação do veneno ($p < 0,01$), mas retrocederam a partir do grupo V6, mantendo-se próximos aos valores basais, já que V6, V12 e V24 não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Os valores de $\Delta P1$, correspondentes às propriedades resistivas do tecido pulmonar, apresentaram aumento significativo após 6 horas ($p < 0,001$) em relação ao controle, voltando aos valores basais nos grupos V12 e V24. Na análise de $\Delta P2$, que corresponde à viscoelasticidade do pulmão, observou-se um aumento em V12 ($p < 0,001$), atingindo valores de controle em 24 horas. Na análise histológica a contagem de células polimorfonucleares apresentou aumento significativo após 3 horas ($p < 0,001$), mantendo-se em V6 ($p < 0,01$) e retornando a valores de controle nos grupos V12 e V24, tanto em vias aéreas como em parênquima. As células linfomononucleares apresentaram aumento em V6, diminuindo com 12 horas, não retornando a valores basais até 24 horas, em vias aéreas, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Já em parênquima, o pico apresentou-se no grupo V3 ($p < 0,01$), diminuindo em V6, V12, mas só apresentando valores basais após 24 horas. Assim, conclui-se que o veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*, apresenta repercussões pulmonares que são revertidas, quase totalmente, após 24 horas de inoculação.

Palavras-chave - mecânica respiratória, histologia pulmonar, *Crotalus durissus terrificus*, veneno.

“Analisis of lung tissue mechanical properties and histology in experimental model of acute injury induced by *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake venom”

Abstract

There are very few reports related to specific inquiries on the repercussions of the *Crotalus durissus* snakes venom in the respiratory system, therefore, the behavior of the mechanical properties of the respiratory system, the characterization of the pulmonary structures and the quantification of the generated inflammatory process are less known. It make is necessary to study the effects of this kind of injury, to make possible, the earlier and most effective therapeutic intervention. The aim of this study was to analyze the lungs mechanical properties and its histology, in an experimental model of acute lung injury induced by *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake venom. It was studied, 45 Swiss mice, analyzed 3 (V3), 6 (V6), 12 (V12) and 24 (V24) hours after intramuscular injection of saline (control group) or *Crotalus durissus terrificus* crude venom (0,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$). The sub-lethal dose used in venom group, was determined by the LD₅₀ previously found. The mechanical parameters were obtained by End Inspiratory Occlusion Method, later, the histological analyses was conduced. The statistical analysis was carried through the Kolmogorov-Smirnov test for normality, Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn's test, for variance analyses. The significance level was established in 5%. The static and dynamic elastance values increased significantly after 3 hours of venom inoculation ($p < 0,01$), but reduced at other groups, maintaining next to control values, because V6, V12 and V24 didn't present significative differences when compared to control. The $\Delta P1$ values, that corresponds to the resistance properties of lung tissue, presented a significative increase after 6 hours ($p < 0,001$) in relation to control, reducing to base values in V12 and V24 groups. In $\Delta P2$ analysis, correspondent to viscoelastic components, it is observed an increase in V12 group ($p < 0,001$), reaching control values at 24 hours. In histology analysis the polymorphonuclear cell count presented an significat increase after 3 hours ($p < 0,001$), maintaining at 6 hours ($p < 0,01$) and reducing to control values at V12 and V24 groups, in airways as much in and parenchyma. The linfomononuclear cells presented an increase in V6, decreasing with 12 hours and not reaching control values until 24 hours, in airways, but these differences were not statically significant. In parenchyma, the V3 gorup presented a significant peak value ($p < 0,01$), reducing in V6 and V12, but presenting control values only at 24 hours. In conclusion, the *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake venom present lung repercussions which are reverted, after 24 hours of inoculation.

Keywords - Respiratory mechanics, lung histology, *Crotalus durissus terrificus*, venom.

Lista de Figuras

Figura 1 – Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	9
Figura 2 – Curva volume-pressão.....	20
Figura 3- Modelo linear unicompartmental.	26
Figura 4 – Modelo linear bicompartimental paralelo	28
Figura 5 – Modelo linear bicompartimental em série.....	28
Figura 6 – Modelo linear bicompartimental de Mount.	29
Figura 7 – Modelo de Bates.	30
Figura 8 – Montagem equipamento X animal.	36
Figura 9 – Montagem do equipamento.	36
Figura 10 – Software de aquisição de dados.....	37
Figura 11 – Curvas fluxo e pressão traqueal em relação ao tempo.	40
Figura 12 – Retículo de pontos e linhas utilizado para contagem de células.	44
Figura 13 – Lâminas histológicas do grupo controle.....	60
Figura 14 - Lâminas histológicas do grupo V3.	60
Figura 15 – Lâminas histológicas do grupo V6.....	61
Figura 16 – Lâminas histológicas do grupo V12.	61
Figura 17 – Lâminas histológicas do grupo V24.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros ventilatórios.	47
Tabela 2 – Elastâncias estáticas.	48
Tabela 3 – Elastâncias dinâmicas.	49
Tabela 4 – Variações das elastâncias.	50
Tabela 5 – Valores de ΔP_1	51
Tabela 6 – Valores de ΔP_2	52
Tabela 7 – Valores de ΔP_{tot}	53

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Médias das elastâncias estáticas dos grupos estudados.	48
Gráfico 2 – Médias das elastâncias dinâmicas dos grupos estudados.	49
Gráfico 3 – Médias das variações das elastâncias dos grupos estudados.	50
Gráfico 4 – Médias de ΔP_1 nos grupos estudados.	51
Gráfico 5 – Médias de ΔP_2 nos grupos estudados.	52
Gráfico 5 – Médias de ΔP_{tot} nos grupos estudados.	53
Gráfico 6 – Células Polimorfonucleares (PMN) em vias aéreas.	54
Gráfico 7 – Células Linfomononucleares (LMN) em vias aéreas.	55
Gráfico 8 – Células LMN e PMN em vias aéreas.	56
Gráfico 9 – Células Polimorfonucleares (PMN) em parênquima.	57
Gráfico 10 – Células Linfomononucleares (LMN) em parênquima.	58
Gráfico 11 – Células LMN e PMN em parênquima.	59

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- ?E – Variação de elastância do pulmão
- ?P1 – Variação da pressão resistiva do pulmão
- ?P2 – Variação da pressão para vencer o componente viscoelástico do pulmão
- ?Ptot – Variação da pressão total do pulmão
- C.d.t.* – *Crotalus durissus terifficus*
- CK - Creatinaquinase
- CL – Complacência pulmonar
- CPT – Capacidade Pulmonar Total
- CRF – Capacidade Residual Funcional
- Edyn- Elastância dinâmica do pulmão
- Est – Elastância estática do pulmão
- i.m. – Intramuscular
- i.p. – Intraperitonal
- i.v. – Intavenoso
- IRA – Insuficiência Renal Aguda
- LMN – Linfomononucleares
- LPS – Lipopolissacarídeo
- PEEP – Pressão Positiva ao Final da Expiração
- Pel – Pressão elástica do pulmão
- Pes – Pressão esofageana
- PLA₂ – Fosfolipase₂
- Pmáx – Pressão máxima no pulmão
- PMN – Polimorfonucleares
- Ptr – Pressão traqueal
- Ptr – Pressão traqueal
- V – Volume
- V' – Fluxo

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivos Específicos.....	4
2. Ofidismo – <i>Crotalus durissus terrificus</i>	6
2.1 Aspectos Epidemiológicos	7
2.1.1 Agentes Causais.....	7
2.1.2 Distribuição, Morbidade, Mortalidade e Letalidade	10
2.2 Patogenia	11
2.2.1 Manifestações Locais.....	11
2.2.2 Manifestações Sistêmicas.....	12
2.3 Tratamento Soroterápico.....	12
2.4 Complicações.....	13
3. Mecânica Respiratória	14
3.1 Músculos Respiratórios.....	15
3.2 Propriedades Elásticas do Sistema Respiratório	19
3.2.1 Propriedades Elásticas do Pulmão	21
3.2.2 Propriedades Elásticas da Parede Torácica	22
3.2.3 Pressão Esofageana	23
3.3 Propriedades Resistivas do Sistema Respiratório das Vias Aéreas.....	24
3.3.1 Resistência Tecidual.....	24
3.3.2 Resistência da Parede Torácica	25
3.4 Viscoelasticidade.....	25
3.5 Estudos da Mecânica Respiratória	26
4. Metodologia	31
4.1 Caracterização do Estudo	32
4.2 Amostra Experimental.....	32
4.3 Aspectos Éticos e Legais	32
4.4 Caracterização dos Grupos Experimentais	33
4.5 Veneno	34
4.6 Dose Letal (DL ₅₀)	34
4.7 Protocolo Experimental.....	34

4.8	Estudo da Mecânica Respiratória pelo Método da Oclusão ao Final da Respiração.....	38
4.8.1	Análise das curvas.....	39
4.9	Estudo Histopatológico.....	42
4.9.1	Retirada dos Pulmões.....	42
4.9.2	Fixação e Preparo das Lâminas.....	42
4.9.3	Análise Histopatológica.....	43
4.10	Análise Estatística.....	45
5.	Resultados.....	46
5.1	Mecânica Respiratória.....	47
5.2	Histologia.....	54
6.	Discussão.....	63
7.	Conclusão.....	76
	Referências Bibliográficas.....	78
	Anexo A.....	88
	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP.....	89

1. Introdução

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais devido à frequência em que ocorrem e alta morbidade que ocasionam (PINHO; PEREIRA, 2001).

A composição química e as atividades biológicas dos venenos podem variar muito entre as famílias e gêneros das serpentes (DOS-SANTOS, 2005). Segundo Barraviera e Pereira (1999), a maior gravidade encontra-se nos acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus*.

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, especificamente, é composto por uma potente proteína neurotóxica, a crotoxina, responsável pela toxicidade letal do veneno bruto (SANTOS 2005).

Estudos como o de Oguiura, Boni- Mitake e Rádis-Baptista (2005), Santoro *et al.* (1999), Toyama *et al.* (2003), relatam a atividade dos componentes deste veneno no bloqueio neuromuscular, mionecrose e ação edematogênica, mas seu efeito no sistema respiratório têm sido pouco estudado.

Segundo Vital Brazil (1972) *apud* Damico *et al.* (2005), o envenenamento por serpentes do gênero *Crotalus* freqüentemente causam insuficiência respiratória aguda relacionada à paralisia neuromuscular.

Entretanto, estudos específicos sobre o comprometimento respiratório provocado por veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* são muito escassos e relatam apenas o surgimento de edema pulmonar como conseqüência respiratória.

Pesquisas envolvendo a mensuração das propriedades mecânicas elásticas, viscosas e viscoelásticas, que permitem estudar o comportamento do sistema respiratório em resposta à lesão gerada por esse veneno, não foram encontradas na literatura pesquisada.

Segundo Zin e Gomes (1999), a interpretação de variáveis ventilatórias mensuráveis tais como volume, fluxo e pressão sob condições, tanto fisiológicas como patológicas, permite avaliar o comportamento mecânico do sistema respiratório e de seus componentes isoladamente, sendo de extrema importância para o conhecimento da fisiologia respiratória.

A ventilação pulmonar envolve a movimentação do sistema respiratório, que requer a realização de um trabalho mecânico para vencer forças de oposição. Estas incluem os componentes elásticos e viscoelásticos do tecido pulmonar e da parede torácica, forças resistivas resultantes do fluxo de ar nas vias aéreas e movimentação dos tecidos da parede torácica, forças plastoelásticas responsáveis pela histerese, forças inerciais (dependentes da massa dos tecidos e dos gases), forças gravitacionais (normalmente incluídas nas medidas de forças elásticas) e forças de distorção da parede torácica (ZIN; ROCCO, 1999).

A decomposição do sistema respiratório em seus componentes pulmonar e de parede é importante, visto que apresentam propriedades mecânicas diferentes e também existem doenças capazes de comprometer um ou outro, resultando em disfunção do sistema respiratório (ZIN; ROCCO, 1999)

Segundo Alves Neto (2002), a análise das propriedades mecânicas do sistema respiratório deve ser efetuada rotineiramente em pacientes entubados, ventilados artificialmente ou não. Para isso, métodos de medida da mecânica respiratória têm sido desenvolvidos na tentativa de se compreender a mecânica ventilatória, como o método da expiração relaxada e o da oclusão ao final da inspiração, sendo este último, o mais utilizado.

O comportamento das propriedades mecânicas do sistema respiratório, a caracterização das estruturas pulmonares e a quantificação do processo inflamatório gerado pela ação do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* são pouco conhecidos. Por isso, faz – se necessário conhecer os efeitos desta possível lesão para que, em eventual acometimento, a intervenção terapêutica seja a mais precoce e eficiente possível.

1.1 Objetivos

Analisar as propriedades mecânicas e a histologia pulmonar em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.).

1.1.1 Objetivos Específicos

- Observar o comportamento das propriedades mecânicas elásticas, viscosas e viscoelásticas do sistema respiratório em resposta à lesão pulmonar aguda induzida pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.).

- Observar a histologia dos tecidos pulmonares após a aplicação do veneno.
- Correlacionar os dados obtidos sobre a mecânica do sistema respiratório com a histopatologia.

2. Ofidismo – Crotalus durissus terrificus

Os animais capazes de produzir substâncias tóxicas são denominados venenosos. Entre eles, aqueles que possuem aparelhos inoculadores especiais levam o termo peçonhento. As peçonhas são produtos de atividade de glândulas cujos canais excretórios abrem-se para o exterior ou para a cavidade bucal (FUNASA, 2001).

Os acidentes por animais peçonhentos constituem problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento, dada a incidência à gravidade e as seqüelas que causam (BARRAVIERA, 1993). Dentre os acidentes por animais peçonhentos, os ofídicos, provocados por serpentes, são considerados os principais, pela sua freqüência e gravidade (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005).

As serpentes são animais vertebrados, cujas glândulas salivares geram uma secreção especializada para a digestão dos alimentos. Esta secreção é composta por enzimas e toxinas e é injetada nas vítimas por um sistema de inoculação formada pelas presas (RUIZ DE TORRENT *et al.*, 1999).

2.1 Aspectos Epidemiológicos

2.1.1 Agentes Causais

Existem aproximadamente 3 mil espécies de serpentes em todo o mundo, sendo que apenas 410 são consideradas peçonhentas. No Brasil, estão catalogadas 256 espécies, sendo 69 peçonhentas. Destas, 32 pertencem ao gênero *Bothrops*, 6 ao gênero *Crotalus*, 2 ao gênero *Lachesis* e 29 ao gênero *Micrurus* (BARRAVIERA, 1993; PINHO; PEREIRA, 2001).

Segundo Bochner e Struchiner (2003), a epidemiologia dos acidentes ofídicos aponta para um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos cem anos no Brasil. Os acidentes ocorrem com maior frequência no início e final de ano, devido ao clima quente e úmido que ocorre neste período, são prevalentes em indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais, faixa etária de 15 a 49 anos, atingindo principalmente os membros inferiores.

Atualmente, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por uma maior morbidade humana do que qualquer outro grupo de serpentes venenosas. No Brasil, elas são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos registrados. Entretanto, são as serpentes do gênero *Crotalus*, as responsáveis pela maior gravidade, com sintomatologia sistêmica exuberante e poucas manifestações locais (ARAÚJO, 2003; BARRAVIERA; PEREIRA, 1999; GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005).

A subespécie *Crotalus durissus terrificus* é responsável por quase todos os casos que ocorrem do gênero crotálico. Estas são facilmente reconhecidas pela presença de guizo ou chocalho na extremidade da cauda e por possuírem um eficiente aparelho inoculador de peçonha (figura 1). Portanto, provavelmente inocula o veneno por via intramuscular e/ou subcutânea (RIBEIRO *et al.*, 1993).

Segundo Bancher, Rosa e Furlanetto (1973), o veneno da *Crotalus durissus terrificus* apresenta intensa ação miotóxica, hemolítica, neurotóxica, nefrotóxica e hepatotóxica.



Figura 1 – Serpente *Crotalus durissus terrificus*.
Fonte : www.serpentario.edu.uy

A composição deste veneno é muito complexa, sendo constituída de enzimas, toxinas e peptídeos. As toxinas presentes são a crotamina, crotapotina, fosfolipase A_2 , giroxina e convulxina (VARANDA; GIANNINI, 1994). A crotapotina e a fosfolipase A_2 , formam uma fração do veneno chamada crotoxina que provocam alterações anatomopatológicas após quatro a seis horas da inoculação e causam paralisia neuromuscular semelhante ao efeito causado pelos curares (BARRAVIERA, 1990).

As neurotoxinas provenientes do veneno de serpentes que causam essa paralisia neuromuscular agem tanto na junção pré-sináptica, através do bloqueio da liberação de acetilcolina, como pós-sináptica, bloqueando os receptores nicotínicos (DAMICO *et al.*, 2005).

A crotoxina da *C.d.t* é conhecida por conter grande parte da toxicidade letal do veneno bruto (SANTOS *et al.*, 2005). Ela é uma neurotoxina pré-sináptica (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO; 2003; DAMICO *et al.*, 2005).

2.1.2 Distribuição, Morbidade, Mortalidade e Letalidade

Num acidente ofídico, o prognóstico geralmente é bom, nos casos classificados como leves e moderados e nos pacientes atendidos nas primeiras seis horas após a picada (PINHO; PEREIRA, 2001).

O gênero *Crotalus* apresenta maior percentual de casos considerados graves (PINHO; OLIVEIRA; FALEIROS, 2004), com elevado índice de mortalidade, chegando a 72% nos casos não-tratados com soro anticrotálico e a 11% quando há tratamento (BARRAVIERA, 1993).

A subespécie *C.d.t* é encontrada em todo o país exceto em áreas florestais e litorâneas (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005), sendo mais comum nas zonas altas e secas do Brasil, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Esta subespécie é também conhecida como cascavel ou boiquira (BARRAVIERA, 1993).

Ainda segundo Barraviera (1993), existe estreita relação entre o número de óbitos e o tempo entre o acidente e o atendimento médico. A maioria dos doentes que falecem, em geral, são atendidos seis horas após o acidente.

Em estudos de Pinho, Oliveira e Faleiros (2004) realizado no estado de Goiás, o tempo entre a picada e os primeiros atendimentos, foi em sua maioria, menor que seis horas, sendo que 69,5% dos pacientes tiveram atendimento em menos de três horas e 13,8% entre três e seis horas. Esses dados estão de acordo

com os encontrados por Sgarbi *et al.* (1995) no estado de São Paulo, onde 78% dos casos estudados obtiveram atendimento nas primeiras seis horas após a picada.

Sgarbi *et al.* (1995) observaram ainda, que os acidentes ocorridos por serpentes do gênero *Crotalus* variaram o seu prognóstico entre moderado (58,54%) e grave (41,46%), não sendo reportado nenhum caso leve.

2.2 Patogenia

A sintomatologia decorrente dos acidentes ofídicos depende das propriedades dos componentes do veneno inoculado (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1990). As manifestações apresentadas no quadro clínico variam também, de acordo com a quantidade de veneno inoculada e o tempo que se leva para que seja realizado o atendimento adequado (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005).

A origem da serpente também é um fator relevante já que, segundo estudos de Perrone, Siles Villarroel e Furtado (1989), as serpentes da mesma espécie de localidades diferentes, podem apresentar letalidade diferentes. Para Santoro *et al.* (1999), as atividades biológicas dos venenos podem variar drasticamente, de acordo com a origem geográfica.

2.2.1 Manifestações Locais

No acidente crotálico, o quadro clínico local é pouco expressivo, não havendo edema ou dor, eventualmente sendo referida parestesia local (GUIA DE VIGILÂNCIA

EPIDEMIOLOGICA, 2005). O veneno crotálico quase não produz lesão local, habitualmente causa manifestações discretas como dor, eritema, edema e parestesia local ou regional (PINHO; PEREIRA, 2001). Segundo Pinho, Oliveira e Faleiros (2004), foi registrada recrose tecidual no local da picada em 12,9% dos casos do estudo.

2.2.2 Manifestações Sistêmicas

Entre as manifestações sistêmicas, o quadro neuromuscular é de aparecimento precoce caracterizando-se por ptose palpebral, diplopia e oftalmoplegia. Uma mialgia generalizada acompanhada de mioglobinúria se manifesta cerca de seis a doze horas após o acidente, podendo haver evolução para insuficiência renal aguda (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA, 2005).

Ainda no estudo de Pinho, Oliveira e Faleiros (2004), 1,2% dos casos de acidente crotálico evoluíram para insuficiência renal aguda.

As manifestações sistêmicas gerais incluem mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, vômitos, sonolência ou inquietação e sensação de boca seca (PINHO; PEREIRA, 2001).

2.3 Tratamento Soroterápico

A administração de soro antiofídico é o tratamento mais eficaz em casos de acidentes com serpentes (ZAMUNÉR *et al.*, 2004). Contudo, segundo Ruiz de

Torrent *et al.* (1999), o veneno de uma mesma espécie pode apresentar diferentes características químicas e farmacológicas, conforme a região em que habita.

Araújo (2003), caracteriza o soro como neutralizador do veneno, não determinando a regeneração das hemácias, do endotélio e dos tecidos em geral, apenas evitando a progressão destes fenômenos, fazendo-se necessário instituir medidas de suporte como a elevação do membro afetado, uso de analgésicos, hidratação e antibioticoterapia.

Sgarbi *et al.* (1995), afirmam em estudo que, quanto antes se administrar o soro antiofídico, mais eficiente será o tratamento e melhor o prognóstico do paciente. Em um estudo experimental com veneno de *C.d.t.*, Ribeiro *et al.* (1993), observaram que a administração do antiveneno via intraperitoneal (i.p.), ofereceu maior proteção do que aquela administrada via intramuscular (local), apresentando menor taxa de óbito em 48 horas.

2.4 Complicações

A principal complicação desse tipo de acidente é a insuficiência renal aguda, com necrose tubular, geralmente de instalação nas primeiras 48 horas (PINHO; PEREIRA, 2001).

3. Mecânica Respiratória

Com a finalidade de estudos sobre a mecânica ventilatória, dividimos o sistema respiratório em dois componentes: o pulmão e a parede torácica. A parede torácica compreende todas as estruturas que se movem durante o ciclo ventilatório, inclusive a parede abdominal que se move para fora durante a inspiração. A decomposição deste sistema em componentes pulmonar e de parede se faz necessária, pois, possuem propriedades mecânicas diferentes e existe a possibilidade de acometimento isolado, resultando em disfunção do sistema respiratório (ZIN; ROCCO, 1999).

3.1 Músculos Respiratórios

Os músculos respiratórios são músculos estriados esqueléticos que apresentam maior resistência à fadiga, possuem um fluxo sanguíneo elevado, uma maior capacidade oxidativa e grande densidade capilar. Essas características permitem à musculatura, vencer cargas elásticas da parede respiratória e pulmões e resistivas das vias aéreas (WEST, 1996).

O diafragma é uma fina estrutura músculo-tendínea que separa a parede torácica em dois compartimentos: a caixa torácica formada pelas costelas e o abdome. Suas fibras musculares são ativadas durante a inspiração, fazendo com que seu comprimento axial diminua e o músculo descenda, resultando assim, em expansão da caixa torácica no eixo crâniocaudal e no deslocamento das vísceras abdominais, com aumento da pressão abdominal (DE TROYER, 1998).

É constituído por dois músculos: o costal e o crural, inseridos em um tendão central não contrátil. O diafragma costal origina-se no tendão central e converge-se para o apêndice xifóide (fibras esternais) e o diafragma crural (ou vertebral) vai do tendão central para a porção superior da terceira vértebra lombar (ZIN; ROCCO, 1999).

Segundo Levitzky (2004), o diafragma é responsável pelo deslocamento de aproximadamente $2/3$ do ar que entra nos pulmões durante a respiração normal tranqüila em decúbito dorsal. Nas posições ereta, sentada ou em pé, esta proporção se mantém em $1/3$ a $1/2$ do volume corrente.

Durante a expiração, normalmente se considera que o diafragma está relaxado, mas é provável que algum tônus seja mantido, especialmente quando o indivíduo se encontra em posição horizontal (LEVITZKY, 2004).

Em estudos de Rowley, Mantilla e Sieck (2005), observou-se que o músculo diafragma apresenta, relativamente, menor plasticidade em resposta a perturbações de carga e/ou atividade, diferentemente dos músculos costais, nos quais mudanças estruturais e funcionais mais substanciais foram encontradas.

Os músculos interscostais são aqueles presentes nos espaços entre as costelas, nos quais a disposição das fibras determina sua função. Os interscostais externos são considerados inspiratórios, pois, em contração, provocam expansão do tórax em ambos os diâmetros lateral e antero-posterior.

Já os músculos intercostais internos, participam da expiração, quando ativa, já que esta fase ocorre passivamente devido às propriedades elásticas do sistema respiratório, provocando diminuição do volume torácico (WEST, 1996). Algumas controvérsias sobre a função de tais músculos foram encontradas em estudos eletromiográficos de De Troyer (1998), que identificou a participação dos grupos interósseos externos e internos, nas diferentes fases da inspiração e expiração, em experimentação com animais.

Segundo Rowley, Mantilla e Sieck (2005), estes músculos atendem a funções tanto respiratórias como posturais, em condições de carga e padrões de atividade completamente diferentes.

Outros músculos considerados inspiratórios são: os escalenos e os paraesternais, que provocam expansão nas costelas superiores, e os músculos acessórios (esternocleidomastóideo, trapézio, grande dorsal, peitoral maior), que usualmente são utilizados na manutenção da postura, entretanto, participam da inspiração em casos de disfunção ou quando a demanda ventilatória excede a capacidade dos músculos inspiratórios primários (ZIN; ROCCO, 1999).

Para Zin e Rocco (1999), o comprimento ótimo dos músculos paraesternais e escalenos ocorre, contrariamente ao diafragma, mais próximo da capacidade pulmonar total (CPT) do que na capacidade residual funcional (CRF), permitindo que os músculos inspiratórios, trabalhando de maneira coordenada, gerem pressão em presença de uma ampla margem de volumes pulmonares.

A ventilação efetiva depende da atividade coordenada entre os principais músculos da inspiração e os músculos das vias aéreas superiores. A ativação destes músculos, mantém a estabilidade das vias, reduz a resistência e diminui o trabalho respiratório (ZIN; ROCCO, 1999).

Durante a respiração normal tranqüila a expiração é passiva, onde a retração elástica aumentada dos alvéolos distendidos é suficiente para reduzir o volume alveolar e aumentar a pressão alveolar em relação à pressão atmosférica (LEVITZKY, 2004). A contração ativa dos músculos inspiratórios leva a distensão dos tecidos elásticos dos pulmões e da parede torácica, com conseqüente armazenamento de energia potencial nesses tecidos (ZIN; ROCCO, 1999).

O processo de expiração é suavizado pela ação de frenagem que ocorre pela desativação lenta e gradual dos músculos inspiratórios previamente contraídos. A expiração ativa ocorre durante o exercício, a fala, o canto, a fase expiratória da tosse e do espirro e em estados patológicos (LEVITZKY, 2004).

Os abdominais são os músculos expiratórios mais importantes na ventilação. Sua ação resulta em redução da pressão abdominal e deslocamento cranial do diafragma, levando à redução do volume pulmonar (CAPELLO; DE TROYER, 2004).

As mudanças na estrutura e função dos músculos podem ocorrer durante a contração e atividade ventilatória, assim como em resposta a várias condições patofisiológicas (ROWLEY; MANTILLA; SIECK, 2005).

O padrão rítmico contínuo da atividade motora associado à respiração faz dos músculos respiratórios, os mais ativos do corpo humano, com uma carga bem diferente daquela imposta aos músculos posturais e locomotores (ROWLEY; MANTILLA; SIECK, 2005).

3.2 Propriedades Elásticas do Sistema Respiratório

Os tecidos dos pulmões e tórax são constituídos por fibras elásticas, cartilagens, células epiteliais e endoteliais, glândulas, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos que possuem propriedades elásticas que permitem o retorno do sistema ventilatório à sua forma original após sofrer deformação por uma força aplicada sobre ele (ROMERO *et al.*, 1998).

Esse comportamento segue à Lei de Hooke para corpos perfeitamente elásticos como uma mola, ou seja, ao sofrer a atuação de uma unidade de força, este corpo apresentará uma modificação unitária em seu comprimento. Quando a força for de duas unidades, seu comprimento será modificado em duas unidades e assim sucessivamente, até atingir ou exceder seu limite elástico. Portanto, quanto mais intensa for a pressão gerada pelos músculos inspiratórios, maior será o volume inspirado, considerando que quando cessada a força externa, o tecido retornará à sua posição original (ZIN; ROCCO, 1999).

Durante o relaxamento dos músculos ventilatórios, a pressão gerada pelo sistema respiratório sob condições estáticas, seja qual for o volume pulmonar, resultará das forças liberadas por seus componentes elásticos (D'ANGELO, 1998).

A relação entre volume e pressão independe da velocidade com que o volume é atingido (fluxo), ou seja, são medidas em condições estáticas. Na figura 2, podemos observar que a inclinação da curva volume-pressão (VP) ou a relação entre a variação de volume gasoso mobilizado (ΔV) e a pressão motriz, diferença entre as pressões na abertura das vias aéreas e no ar ambiente, determina a complacência do sistema respiratório (C_{rs}), sendo esta, o inverso da elastância (Ers). Portanto, $C_{rs} = \frac{\Delta V}{P_{el,rs}}$, onde a $P_{el,rs}$, representa a pressão elástica do sistema respiratório. Uma maior C_{rs} indica uma maior distensibilidade dos tecidos, assim como, a diminuição (maior inclinação da curva VP), representa rigidez ou redução da complacência pulmonar, da parede ou de ambas (ZIN; ROCCO, 1999).

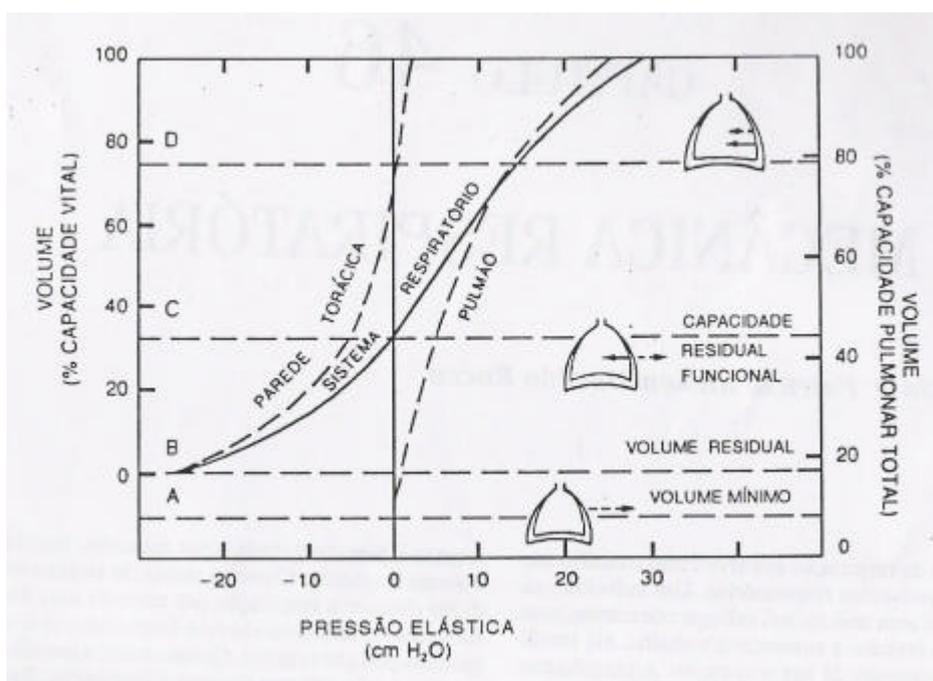


Figura 2 – Curva volume-pressão.

Fonte: (WEST, 1996)

Observa-se também, que a pressão de relaxamento se torna negativa em volume residual, ou seja, a partir da capacidade residual funcional, onde a pressão elástica é igual a zero, mostrando uma tendência da parede torácica em se expandir, maior do que a tendência do pulmão em colapsar (D'ANGELO, 1998).

A força de distensão dos pulmões é a diferença de pressão entre a pressão alveolar e a pressão pleural (pressão transpulmonar), enquanto a força de distensão da caixa torácica é a pressão pleural a qual todas as estruturas, assim como o coração e os vasos intratorácicos, estão sujeitos (GATTINONI *et al.*, 2004). A pressão motriz do sistema respiratório, que, em condições normais, é aquela gerada pela contração dos músculos inspiratórios, precisa vencer as forças elásticas e resistivas para insuflar os pulmões (ZIN; ROCCO, 1999).

3.2.1 Propriedades Elásticas do Pulmão

Duas estruturas principais contribuem para o comportamento elástico do parênquima pulmonar, as fibras teciduais e o revestimento alveolar (ROMERO *et al.*, 1998). Os pulmões tendem sempre a se retrair e colabar devido à força de retração elástica, presente devido às fibras elásticas e colágenas e à sua disposição geométrica, que tendem a trazê-los ao seu volume mínimo (ROBATTO, 1998).

Além das propriedades elásticas dos tecidos pulmonares, um outro fator importante que contribui para suas características elásticas é a tensão superficial (T) da película líquida que reveste os alvéolos (LEVITZKY, 2004).

Essa pressão interna pode ser predeterminada pela Lei de Laplace modificada, onde $P = \frac{2T}{R}$ o número 2 representa uma interface ar-líquido e R, o raio alveolar (ZIN; ROCCO, 1999).

Todas as estruturas do pulmão encontram-se interligadas pela trama de tecido conjuntivo pulmonar, assim, quando há insuflação, todos esses componentes se dilatam, constituindo um fenômeno denominado de interdependência (ZIN; ROCCO, 1995).

A presença do surfactante faz com que a tensão superficial se modifique em função do volume alveolar, contribuindo para o aumento da complacência pulmonar e para a diminuição do trabalho respiratório (ROBATTO, 1998).

A complacência pulmonar (CL), que avalia a propriedade elástica do pulmão como um todo, é determinada por $CL = \frac{\Delta V}{P_{el} - P_L}$, sendo P_{el} , a diferença entre a pressão na abertura das vias aéreas (P_{ao}) e a pressão intrapleural (D'ANGELO, 1998).

3.2.2 Propriedades Elásticas da Parede Torácica

A parede torácica inclui, além do tórax, o diafragma, a parede abdominal e o mediastino (ZIN; ROCCO, 1999). Como já descrito, a elastância é dada como inverso da complacência.

A complacência da parede torácica (C_w) é descrita pela relação entre o volume do tórax e a pressão de distensão (P_w), ou seja, a diferença entre as pressões dentro da superfície pleural e fora da superfície corporal (pressão barométrica), $P_w = P_{pl} - P_{bs}$. Logo, $C_w = \frac{\Delta V}{P_{el,W}}$, sendo $P_{el,W}$ a pressão elástica da parede torácica (D'ANGELO, 1998).

Os pulmões deslocam a caixa torácica e a pressão gerada pela interação entre o pulmão e a parede, que pode possuir propriedades elásticas diferentes, é denominada pressão pleural (GATTINONI *et al.*, 2004).

3.2.3 Pressão Esofageana

A variação da pressão esofageana é considerada um índice aceitável da variação de pressão intrapleural, devido ao fato do esôfago se localizar no tórax, entre os pulmões e a parede torácica e ser constituído por fina parede, apresentando pouca resistência à transmissão da pressão intratorácica (ZIN; ROCCO, 1999).

Segundo Baydur *et al.* (1982), a técnica do balão esofageano pode ser considerada uma abordagem adequada para mensurar tal pressão, fornecendo medidas importantes para estudos da mecânica pulmonar. O procedimento ideal para o correto posicionamento do balão no teste de oclusão baseia-se na introdução do mesmo pelo nariz até o estômago, recuando-o gradualmente até atingir um desvio negativo durante a inspiração e depois mais alguns centímetros (humanos adultos aproximadamente 10 cm), mantendo-o no nível alcançado.

A seguir realiza-se então, a interrupção da respiração ao final da expiração. A manobra é repetida diversas vezes para comparação com a pressão traqueal. Uma concordância entre tais pressões reflete em um adequado posicionamento do cateter esofageano, estando apto a fornecer medidas válidas da variação da pressão na superfície pleural.

3.3 Propriedades Resistivas do Sistema Respiratório das Vias Aéreas.

A resistência do sistema respiratório imposta ao fluxo aréreo é muito importante na determinação do comportamento mecânico do sistema (BATES, 1988). Ela é representada por $R_{e,s} = \frac{P_{res,rs}}{V'}$, onde $P_{res,rs}$ é a pressão resistiva do sistema. A R_{rs} é determinada pela resistência das vias aéreas e pela resistência à movimentação dos tecidos pulmonares (RL) e da parede torácica (R_w). A resistência pulmonar, constitui-se da resistência das vias aéreas, relação entre o gradiente de pressão total ao longo das vias aéreas e o fluxo $R_{aw} = \frac{\Delta P_{aw}}{V'}$, e resistência tecidual, (R_{ti}) (ZIN; ROCCO, 1999).

3.3.1 Resistência Tecidual

A resistência tecidual é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (atrito) pertinente à movimentação dos pulmões e depende da velocidade de deslocamento do ar, sendo importante na inspiração e na expiração. Quanto maior a força dissipada para vencer a resistência do atrito nos tecidos durante a expiração, menor será a força elástica disponível para vencer a resistência

pulmonar. Em indivíduos normais, a resistência tissular corresponde a 20% da resistência pulmonar, sendo o restante representado pela resistência de vias aéreas (ZIN; ROCCO, 1995).

3.3.2 Resistência da Parede Torácica

A resistência da parede torácica é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade pertinente à movimentação de moléculas que constituem os tecidos da parede torácica, podendo ser responsável por até 30% da resistência total do sistema respiratório (ZIN; ROCCO, 1999).

3.4 Viscoelasticidade

As propriedades viscoelásticas permitem que os tecidos, quando subitamente deformados e posteriormente submetidos à deformação constante, apresentem uma redução da tensão (*stress relaxation*) (ROMERO *et al.*, 1998). Esse comportamento é observado tanto no tecido pulmonar como em parede torácica, permitindo o intercâmbio de pressão entre o componente elástico e resistivo (SALDIVA *et al.*, 1992; BATES *et al.*, 1988a).

Segundo Kochi *et al* (1988), durante uma pausa inspiratória, a energia potencial acumulada nos componentes elásticos pode ser dissipada na forma de calor nos componentes resistivos. Afinal, a dissipação de energia por parte dos tecidos pulmonares não cessa no mesmo momento em que se interrompe o fluxo (BATES *et al.*, 1988a).

Para Bates *et al.* (1988b), a viscoelasticidade é a manifestação do comportamento de recuperação do estresse sofrido pelo tecido e pode ser geometricamente demonstrado por um modelo de resistência - elastância em paralelo.

3.5 Estudos da Mecânica Respiratória

No intuito de se entender mais detalhadamente o comportamento das propriedades mecânicas diante de situações, tanto fisiológicas como patológicas, diversos estudos foram realizados na tentativa de se criar modelos capazes de fornecer tais informações.

O modelo mais simples de estudo do sistema respiratório está representado na figura 3, formado por dois elementos, com representação de uma elastância e de uma resistência. O modelo é governado pela “equação de movimento do sistema respiratório” $P(t) = RV'(t) = EV(t)$, onde P é a pressão de abertura das vias aéreas ou a pressão transpulmonar, E e R são, a elastância e resistência, respectivamente, $V(t)$ é o volume, $V'(t)$ o fluxo e t caracteriza o tempo.

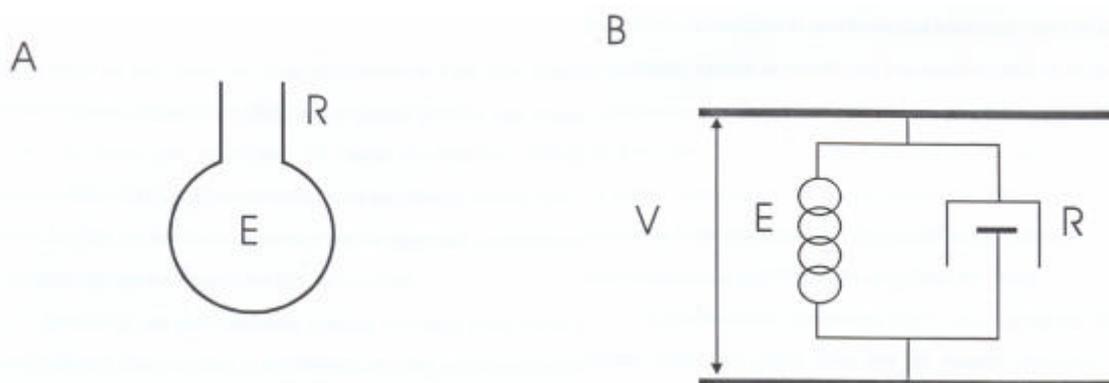


Figura 3- Modelo linear unicompartimental.

NOTA: **A** - tubo de resistência R e balão com elastância E . **B** - representação mecânica.
 V - volume.

Fonte: (ALVES NETO, 2002)

A técnica da oclusão rápida da via aérea ao final da inspiração foi inicialmente descrita por Von Neergaard e Wirz, (1927). Ao ocluir as vias aéreas, as forças dissipativas relacionadas ao fluxo deixariam de existir restando apenas as forças relacionadas à elasticidade do sistema respiratório. A resistência ao fluxo no trato respiratório poderia ser medida relacionando-se à variação de fluxo. A técnica da interrupção forneceu aos pneumologistas um meio rápido, não invasivo e conveniente para estimar a resistência do sistema respiratório. Entretanto, essa técnica caiu em desuso, porque os valores da resistência que oferecia, eram difíceis de serem interpretados fisiologicamente (MEAD; WHITTENBERGER, 1954).

Rattenborg,(1956), utilizou a técnica da oclusão rápida da via aérea submetida a uma ventilação com fluxo constante. O método consistia na insuflação do sistema respiratório previamente relaxado com um fluxo aéreo e volume constantes, registrando-se as variações de pressão traqueal. A seguir ocluía-se as vias aéreas ao final da inspiração, observando-se uma queda rápida seguida de uma queda lenta até atingir um platô. Essa queda lenta foi explicada através do conceito de “*estresse relaxation*”, das possibilidades de redistribuição de fluxo e da viscoelasticidade do sistema respiratório para explicar a existência do componente não newtoniano da resistência.

Wilhelm Weber, em 1835, observou que fios de seda obedeciam à lei da proporcionalidade entre a carga aplicada e o alongamento resultante (lei de Hooke), mas apenas por um curto período de tempo após a aplicação de carga. Quando a carga era aplicada por um período prolongado, o alongamento aumentaria continuamente (DORRINGTON,1980 *apud* ALVES NETO, 2002).

Na década de 50, Mount (1955), Otis *et al.* (1965) e Mead (1969), descreveram os primeiros modelos bicompartimentais. Eles associavam a natureza multicompartimental do sistema respiratório à heterogeneidade da distribuição de gás nos pulmões, Otis *et al.* (1965) (figura 4) e Mead (1969) (figura 5), ou à viscoelasticidade dos tecidos pulmonares Mount (1955) (figura 6).

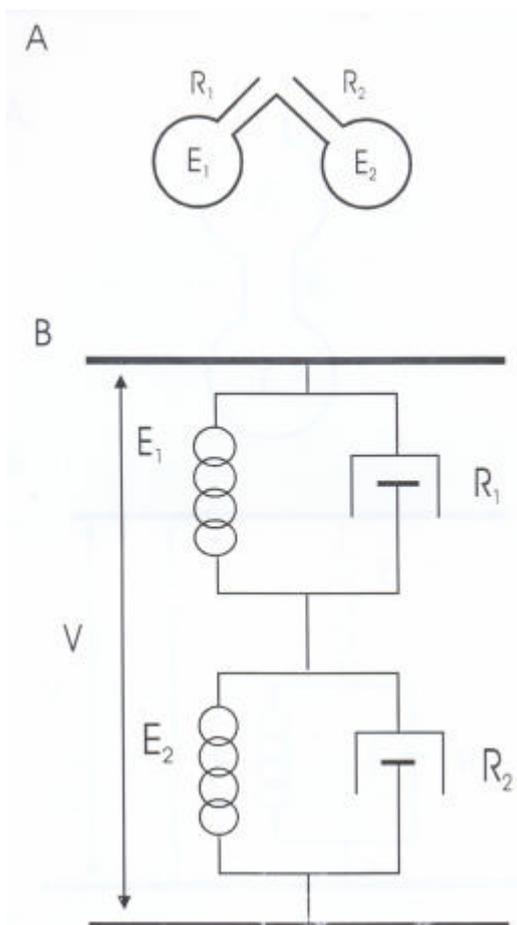


Figura 4 – Modelo linear bicompartimental paralelo. **NOTA:** **A** – dois compartimento alveolares em paralelo, apresentando resistências de vias aéreas R_1 e R_2 em série com as elastâncias E_1 e E_2 . **B** – representação mecânica. V - variação de volume.

Fonte: (ALVES NETO, 2002)

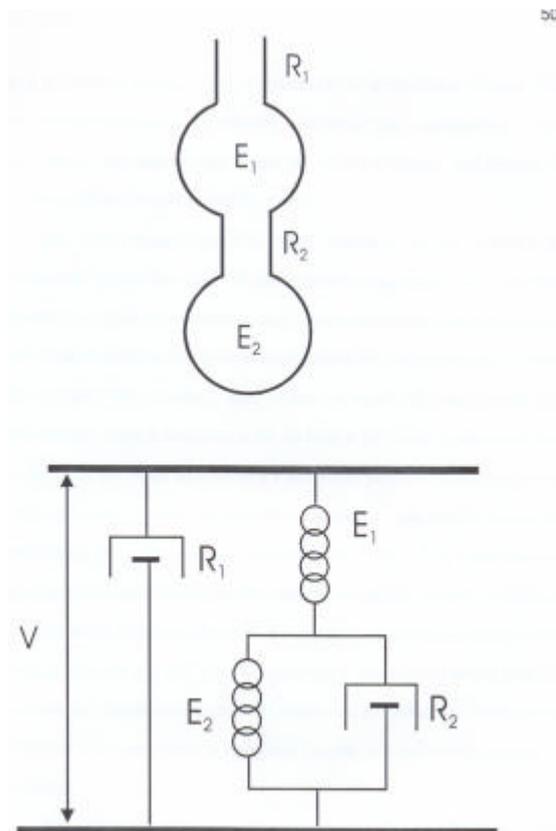


Figura 5 – Modelo linear bicompartimental em série. **NOTA:** **A** – duas regiões pulmonares, uma proximal (R_1E_1) e outra distal (R_2E_2), representando vias aéreas centrais e proximais. **B** – representação mecânica. V – variação de volume.

Fonte: (ALVES NETO, 2002)

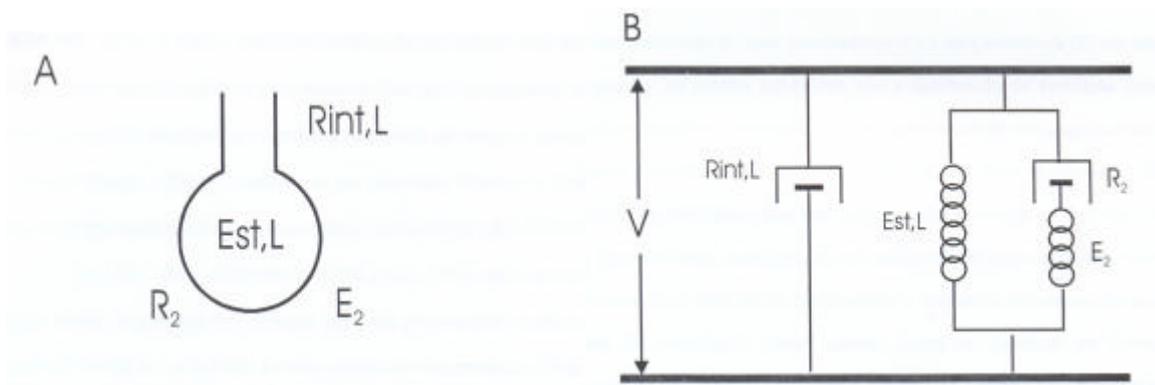


Figura 6 – Modelo linear bicompartimental de Mount.

NOTA: **A** – pulmões homogêneos com resistência de vias aéreas $R_{int,L}$ e elastância Est,L , apresentando propriedades viscoelásticas teciduais, representadas por R_2 e E_2 . **B** – representação mecânica. V – variação de volume.

Fonte: (ALVES NETO, 2002)

Sharp *et al.*, (1967), propuseram um modelo viscoelástico similar ao de Mount, entretanto, os autores incluíam a parede torácica.

Zin *et al.*, (1983), utilizaram as medidas de pressão esofageana para dividir as propriedades elásticas e resistivas do sistema em componentes de pulmão e parede torácica.

Bates *et al.*, (1985), realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido à ventilação com fluxo constante, seguida por uma rápida oclusão das vias aéreas. Foi observado um pico (valor máximo) seguido de uma queda rápida (P_1), correspondendo ao componente viscoso do sistema respiratório, até um ponto de inflexão (P_i), e posteriormente, a uma queda lenta (P_2) até atingir um platô (pressão de retração elástica do sistema respiratório), correspondendo a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou inhomogeneidades, determinadas, respectivamente, pelo “*stress relaxation*” e “*pendeluft*”.

Este modelo foi validado por Bates *et al.* (1988a), que utilizaram cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural e observaram que a pressão alveolar mostrava comportamento semelhante a P_2 , indicando que esta, ocorre em consequência a um fenômeno em tecido pulmonar, sendo uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao estresse.

Em um modelo semelhante, Bates *et al.* (1989), mostraram que em estudos com animais intactos, a mecânica pode ser estudada sob dois submodelos, pulmão e parede torácica, apresentando um arranjo em paralelo, uma vez que são submetidos a mesma variação de volume (figura 7).

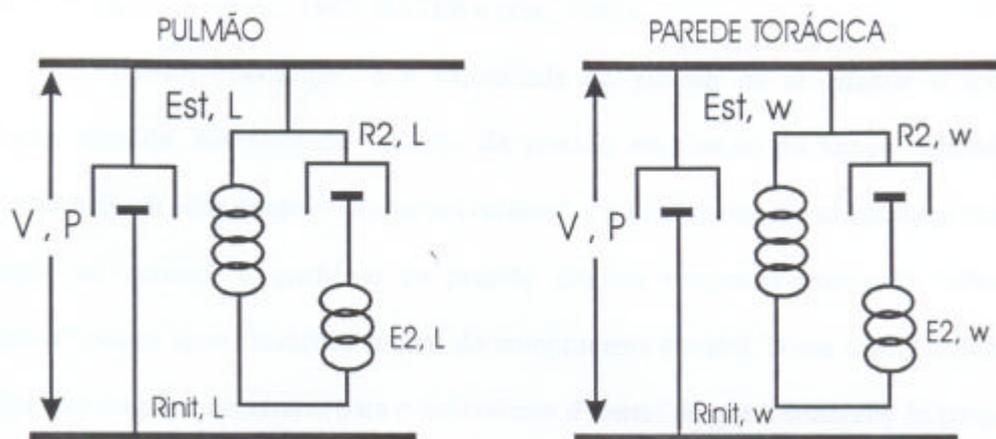


Figura 7 - Modelo de Bates.

NOTA: Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo (R_{int}), em paralelo com um corpo de Kelvin, composto por componente elástico (Est) em paralelo com um corpo de Maxwell, conjunto de amortecedores e mola em série (R_2E_2) representando o componente viscoelástico. V - variação de volume.

Fonte: (ALVES NETO, 2002)

4. Metodologia

4.1 Caracterização do Estudo

Este é um estudo controlado experimental em modelo animal, que visa estudar o comportamento das propriedades mecânicas e a histologia do parênquima pulmonar.

4.2 Amostra Experimental

Foram utilizados 45 camundongos machos da raça *Swiss*, com peso médio de 28 a 30g, fornecidos pelo biotério da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP – São José dos Campos (SP). Os animais foram acondicionados no biotério de passagem do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba e mantidos em ambiente limpo e seco, com luminosidade natural, respeitando o ciclo claro/escuro de 12h, temperatura e umidade relativa do ar adequadas. A ração e a água eram *ad libitum* e monitoramento diário para troca de palha e água.

4.3 Aspectos Éticos e Legais

Previamente, o projeto do estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Vale do Paraíba, tendo sido aprovado sob o número L057/2005/CEP. Foram seguidos os Princípios Éticos na Experimentação Animal, editados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA/Junho de 1991.

4.4 Caracterização dos Grupos Experimentais

Para a realização dos experimentos os animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos distintos:

- Grupo Controle (C): nove camundongos, submetidos à injeção intramuscular (i.m.) de solução fisiológica isotônica a 0,9% e à ventilação mecânica 3 horas após a aplicação da solução), com a finalidade de posterior comparação entre os parâmetros fisiológicos e patológicos.
- Grupo experimental 3 horas (V3): nove camundongos, submetidos à injeção intramuscular do veneno de *C.d.t* e à ventilação mecânica 3 horas após a aplicação do veneno.
- Grupo experimental 6 horas (V6): nove camundongos, submetidos à injeção intramuscular do veneno de *C.d.t* e à ventilação mecânica 6 horas após a aplicação do veneno.
- Grupo experimental 12 horas (V12): nove camundongos, submetidos à injeção intramuscular do veneno de *C.d.t* e à ventilação mecânica 12 horas após a aplicação do veneno.
- Grupo experimental 24 horas (V24): nove camundongos, submetidos à injeção intramuscular do veneno de *C.d.t* e à ventilação mecânica 24 horas após a aplicação do veneno.

4.5 Veneno

O veneno bruto de *C.d.t* foi cedido pelo Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP – São José dos Campos (SP).

4.6 Dose Letal (DL₅₀)

Para determinação da dose a ser utilizada (sub-letal) foi realizada uma curva dose-resposta, a fim de se conhecer a DL₅₀ (dose letal responsável por pelo menos 50% das mortes dentro de um grupo) (VIEIRA et al., 1989).

No cálculo da dose sub-letal DL-50, foram utilizados cinco grupos de seis camundongos *Swiss*, pesando 28-30g, nos quais foram inoculados solução salina para controle e quatro doses diferentes do veneno *C.d.t*. bruto (0,50; 0,60; 0,80 e 1.10µg/g de peso corporal, i.m.) diluídas em 50 µL de solução salina. As mortes foram observadas após uma, três, seis, doze e vinte e quatro horas após a inoculação do veneno.

4.7 Protocolo Experimental

Para a realização do protocolo, após o cálculo da DL50, inicialmente os animais foram sedados com 0,5 µl de Diazepam *COMPAZ*[®], Laboratório *CRISTÁLIA* Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, intraperitonal (i.p.).

Após a sedação, os camundongos foram pesados em balança de precisão *BEL Engineering, BEL Equipamentos Analíticos Ltda* e posteriormente anestesiados com 0,7µL, (i.p.) de Tiopental Sódico *THIONEMBUTAL⁰*, Laboratório *ABBOT Laboratórios do Brasil Ltda*.

Depois do procedimento de sedação e anestesia, foi inoculado nos camundongos do grupo C, na região da musculatura do quadríceps direito 50µL (i.m.) de solução fisiológica isotônica a 0,9%. Nos grupos V3, V6, V12 e V24, foi injetada a dose de 0.60 µg/g de peso corporal, i.m., diluído em 50 µL de solução fisiológica isotônica a 0,9%.

Posteriormente, os camundongos de todos os grupos foram mantidos em caixas de polipropileno convencionais com acesso à ração e água *ad libitum*, em ambiente tranquilo, bem ventilado, respeitando o ciclo claro/escuro de 12 horas, durante os períodos de tempo previamente estabelecidos.

Após as horas pré-determinadas para o experimento (3, 6, 12 e 24 horas), os animais foram novamente sedados e anestesiados conforme o protocolo utilizado anteriormente, sendo posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica, estabilizados através da fixação dos seus membros com fita adesiva.

Em seguida, foi realizada uma traqueostomia para a introdução de uma cânula *BD AngiocathTM*, *BECTON DICKINSON IND. CIRÚRGICAS Ltda.*, com 30mm de comprimento e 1,1 mm de diâmetro interno, sendo fixada à traquéia por meio de fios de seda 3-0 para sutura.

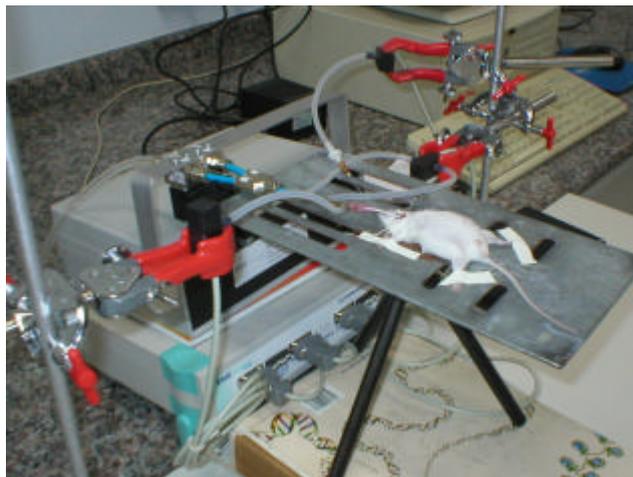


Figura 8 – Montagem equipamento X animal.

A seguir, a cânula traqueal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais, seguindo recomendações de Mortola e Noworaj (1983). O pneumotacógrafo por sua vez foi conectado a um ventilador mecânico modelo *Samay MVR16xp* (Montevideo - Uruguai). Uma das saídas laterais do pneumotacógrafo foi conectada a um transdutor de pressão para mensurar a pressão traqueal (P_{tr}), e as outras duas saídas contralaterais, ligadas a um transdutor diferencial de pressão para mensurar o fluxo das vias aéreas (V'), conforme demonstrado na figura 8.



Figura 9 – Montagem do equipamento.

Os transdutores de sinais foram conectados a um condicionador de sinais *EMGsystem do Brasil* com 8 canais de entrada analógica, amplificação de 1000 vezes, banda de frequência de 20 a 500 Hz e conversor análogo-digital de 12 bits de resolução, a uma frequência de 250 Hz, utilizado para o processamento dos sinais através de um microcomputador (figura 9), utilizando o software *Windaq™ 2.81* (*DATAQ Instruments, Akron, Ohio, USA*), conforme demonstrado na figura 10.



Figura 10 – Print – screen do software de aquisição de dados *Windaq™ 2.81*.

O fluxo do ventilador foi gerado através de um cilindro de oxigênio comprimido (*White Martins Praxair INC.*), conectado ao ventilador por uma válvula redutora de fluxo (*Narcosul Ltda, Porto Alegre, Brasil*).

Os condicionadores utilizados para o processamento dos sinais, são equipamentos eletrônicos que modificam o sinal de entrada. Através de um conversor analógico/digital (A/D), é convertido um sinal analógico, aquelas cujas medidas podem assumir uma infinidade de valores, em um dado digital. O sinal digitalizado pode então ser manipulado por programas através de um microcomputador.

A grandeza física a ser medida é convertida em tensão elétrica através de um sensor/transdutor que é então aplicada no conversor A/D que por sua vez converte um sinal analógico de tensão elétrica em uma informação digital. Esse número é proporcional à tensão elétrica na entrada do conversor.

Conhecendo-se a faixa de entrada e a resolução do conversor A/D, pode-se calcular a tensão elétrica na entrada do conversor a partir do valor digitalizado. Como a grandeza de interesse, em geral, não é tensão elétrica, a medida da grandeza não pode ser obtida diretamente, sendo necessário efetuar a conversão do dado digitalizado para o valor da grandeza (EMG SYSTEM DO BRASIL, 2003).

4.8 Estudo da Mecânica Respiratória pelo Método da Oclusão ao Final da Respiração

A mecânica respiratória foi avaliada pelas propriedades elásticas, viscosas e viscoelásticas dos pulmões, analisadas através de parâmetros obtidos pela ventilação mecânica, utilizando-se o método da oclusão ao final da inspiração, descrito por Bates *et al.* (1985).

Após a realização da traqueostomia, os animais foram curarizados com 0,7 μ l (administrado pela veia peniana) de Brometo de Pancurônio *PANCURON^o* Laboratório CRISTÁLIA.

Então, a cânula traqueal foi conectada ao pneumotacógrafo, de acordo com os seguintes parâmetros ventilatórios: volume corrente (VC) de 0,2 ml, fluxo aéreo (V') de 1 ml/s e pressão positiva final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O, constantes, seguindo protocolo utilizado por Silveira *et al.* (2004).

O tórax do animal foi aberto a partir de uma incisão abdominal e retirada do músculo diafragma e osso esterno, visando a remoção da parede torácica. Após a estabilização dos parâmetros ventilatórios os pulmões foram submetidos a pausas inspiratórias de 6s, para a realização das medidas da mecânica ventilatória.

O tempo total de coleta foi de um minuto e trinta segundos, suficiente para o registro de dez curvas de pausas inspiratórias.

4.8.1 Análise das curvas

Em um sistema onde a parede torácica se encontra intacta, a pressão traqueal (Ptr) representa as pressões dissipadas pelo sistema respiratório e a pressão esofageana (Pes) representa a pressão gerada pela parede torácica.

Ao subtrairmos a P_{es} da P_{tr} , obtém-se as pressões de pulmões. No presente estudo, devido ao fato do tórax estar aberto, com a parede torácica removida, a pressão P_{tr} representou os dados de pressão de parênquima pulmonar.

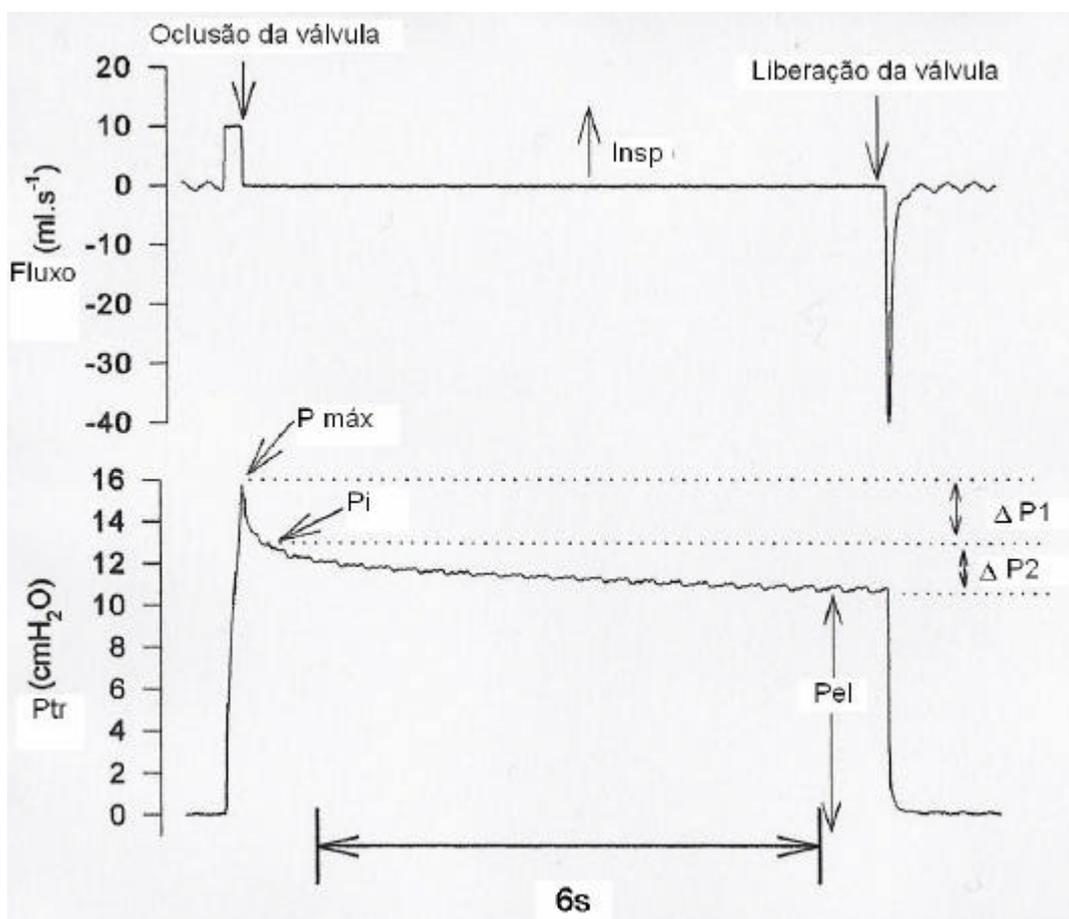


Figura 11 – Curvas fluxo e pressão traqueal em relação ao tempo.

Conforme a figura 11, após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, ocorre uma queda súbita da pressão traqueal (P_{tr}), partindo do valor máximo ($P_{máx}$) até um ponto de inflexão (P_i), a partir do qual o decaimento da pressão assume um caráter mais lento até atingir um platô. Essa fase de platô corresponde à pressão de retração elástica dos pulmões (P_{el}).

A diferença de pressão (ΔP_1) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{m\acute{a}x}$) e P_i , corresponde ao componente viscoso.

A segunda variação de pressão (ΔP_2), representada pela queda lenta, que vai de P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico. A soma de ΔP_1 e ΔP_2 fornece a variação total de pressão nos pulmões (ΔP_{tot}).

As elastâncias estática (E_{st}) e dinâmica (E_{dyn}) podem, então, ser obtidas dividindo-se P_{el} e P_i , respectivamente, pelo volume corrente, sendo ΔE a diferença entre E_{dyn} (elastância estática) e E_{st} (elastância dinâmica).

Para obtenção do P_i , foi utilizada um ajuste não-linear para decaimento exponencial de duas curvas, determinando o tempo de queda rápida e queda lenta, e a partir deste, o valor da pressão no momento da passagem de ΔP_1 para ΔP_2 . Para tal, foi utilizado o software *Microcal Origin 6.0*.

Para obtenção dos parâmetros analisados, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\Delta P_1 = P_{m\acute{a}x} - P_i$$

$$E_{st} = \frac{P_{el}}{VC}$$

$$\Delta P_2 = P_i - P_{el}$$

$$E_{dyn} = \frac{P_i}{VC}$$

$$\Delta P_{tot} = \Delta P_1 + \Delta P_2$$

$$\Delta E = E_{dyn} - E_{st}$$

Segundo Gattinoni *et al.* (2004), quando dividimos a mecânica respiratória em componentes de pulmão e parede torácica, é conveniente utilizar os parâmetros de elastância. Neste estudo, apesar da mecânica ter sido discutida anteriormente como complacência, foram utilizados os valores de elastância como parâmetro de comparação.

4.9 Estudo Histopatológico

4.9.1 Retirada dos Pulmões

Após o registro das curvas das pressões ventilatórias procedemos a retirada dos pulmões para a análise histopatológica. Os animais foram sacrificados por secção da cava abdominal, gerando hemorragia intensa com a finalidade de exsanguinar os pulmões. Um volume de 0,3 ml de formol foi instilado nos pulmões com o objetivo de evitar o colapso das vias aéreas periféricas. A traquéia foi exposta e ocluída por fio. Os pulmões foram então removidos e o lobo superior do pulmão esquerdo separado.

4.9.2 Fixação e Preparo das Lâminas

Após a retirada, o lobo pulmonar retirado foi submetido ao processo de fixação, sendo mantido em formol a 10%, por um período de 48 horas. Então, foi realizado a inclusão em parafina, sendo submetido a um processo de desidratação, permanecendo 24 horas em álcool 70% e 24 horas em álcool 96%. Por último, foram colocados em álcool absoluto (100%), por 8 mais horas

A peça pulmonar foi, então, submetida a duas passagens de 2 horas em xilol P.A. (*F. MAIA Indústria e comércio Ltda*). Posteriormente, foram realizados dois banhos de parafina (*Laboratório Qeel - Química Especializada Erich Ltda*), de 2 horas, em estufa, por mais 4 horas e depois emblocados.

Já em blocos de parafina, o material foi processado manualmente em micrótomo Leica 818 (*Leica Microsystems*) respeitando o eixo sagital, em cortes histológicos com 3 μ m de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE).

4.9.3 Análise Histopatológica

As lâminas obtidas foram submetidas à análise quantitativa de células inflamatórias polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (macrófagos e linfócitos), realizadas pela técnica de contagem de pontos e expressas em porcentagem, e qualitativa pela observação de edema, hemorragia e integridade de parede alveolar.

A técnica de contagem consiste na utilização de um sistema teste coerente e de referência composto por 100 pontos e 50 linhas com área de 62.500 μ m², denominado retículo, inserido em uma das oculares do microscópio óptico, observado sob um aumento de 1000x (Figura 12).

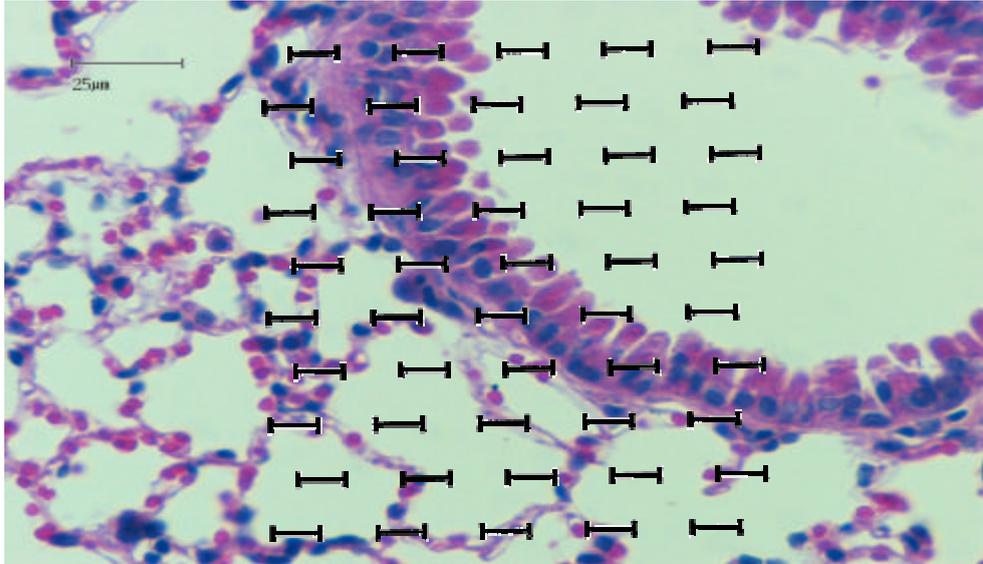


Figura 12 – Retículo de pontos e linhas utilizado para contagem de células em vias aéreas e parênquima.

A contagem em vias aéreas foi realizada em 5 campos não-coincidentes e aleatórios, da área externa (entre o limite externo do músculo liso e a adventícia) em 4 vias aéreas diferentes. Foi determinado o número de pontos coincidentes a essa área, para obter-se a proporção de células em relação à área total do retículo de contagem.

Em parênquima pulmonar, a contagem foi realizada em 15 campos não-coincidentes e aleatórios, pela mesma técnica. Os pontos considerados na determinação da área foram aqueles coincidentes ao tecido alveolar.

O número de pontos coincidentes foi multiplicado pela área total ($62.500\mu\text{m}^2$) e dividido pelo número total de pontos (100). Então, o número de células observadas nesta determinada área foi dividido pela mesma. O valor de densidade obtido foi multiplicado por 1000000 para apresentação dos resultados em número de células por mm^2 .

4.10 Análise Estatística

Para realização da análise estatística, primeiramente foi aplicado teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e de homogeneidade das variâncias (teste da média de Levene). Então os dados foram avaliados através do método de Barlett, a fim de verificar se os desvios-padrão eram semelhantes. Nos casos positivos foi utilizado o teste one-way ANOVA e o teste Tukey-Kramer para comparações múltiplas, para os dados paramétricos.

Se negativo, os dados eram considerados não paramétricos, sendo então utilizados o teste Kruskal-Wallis ANOVA e o teste de Dunn's para comparações múltiplas. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

Os cálculos e gráficos foram realizados pelo software *Newinstat 2.0* e *Microcal Origin 6.0*.

5. Resultados

5.1 Mecânica Respiratória

Para a realização da análise das propriedades mecânicas pulmonares neste estudo foram utilizados os seguintes parâmetros ventilatórios.

Tabela 1 – PARÂMETROS VENTILATÓRIOS.

N=30	Fluxo (ml/s)	Volume (ml)	PEEP (cmH₂O)
Controle	1,20 ± 0,23	0,21 ± 0,01	2,49 ± 0,08
V3	1,29 ± 0,17	0,21 ± 0,01	2,41 ± 0,12
V6	1,13 ± 0,05	0,20 ± 0,00	2,17 ± 0,06
V12	1,09 ± 0,00	0,20 ± 0,00	2,52 ± 0,00
V24	1,09 ± 0,00	0,20 ± 0,00	2,52 ± 0,00

Nota: Médias e desvios-padrão dos parâmetros de ventilação.

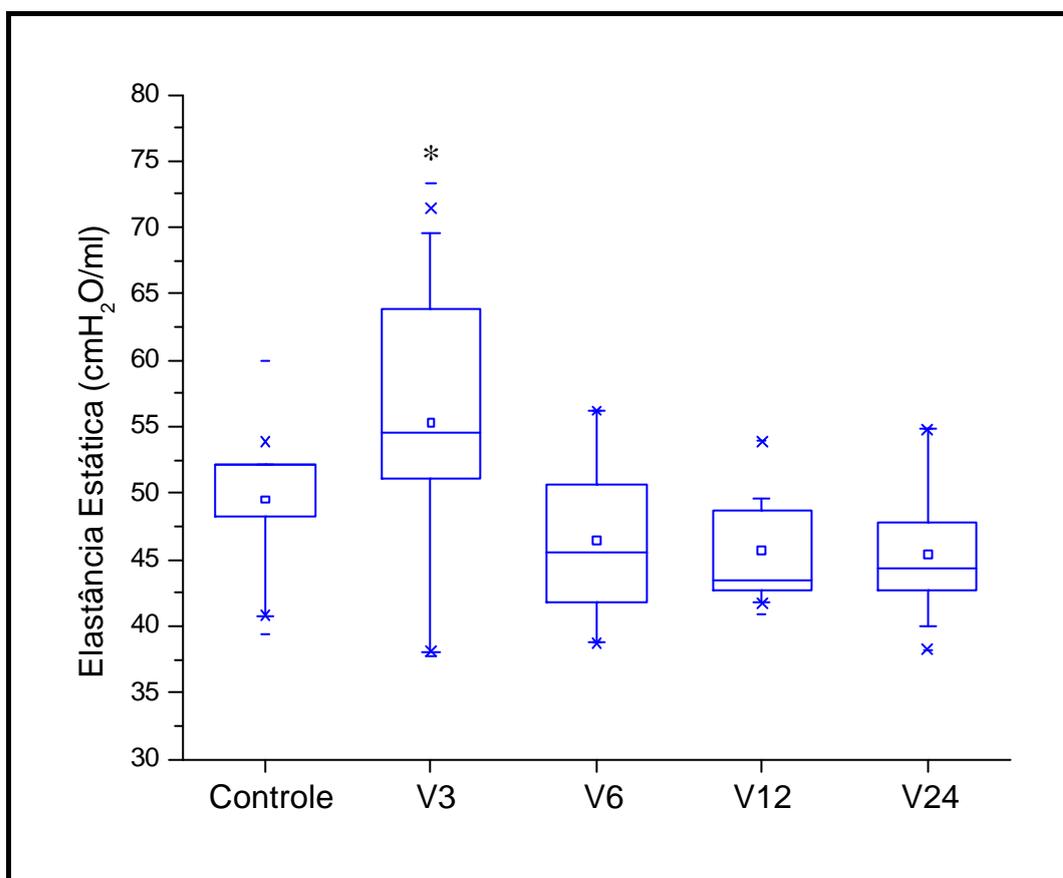
A análise de variância de fluxo, volume e PEEP, tanto entre animais como entre grupos, não foi superior a 10% e 30%, respectivamente.

Após a aplicação do veneno, os valores de elastância estática e dinâmica aumentaram significativamente no grupo V3 ($p < 0,01$), retrocedendo no grupo V6, mantendo-se próximos aos valores basais, permanecendo assim nos grupos V12 e V24. Em relação aos valores do grupo controle, não observamos diferenças significativas quando comparamos com os grupos V6, V12 e V24, conforme demonstrados nas tabela 2 e 3 e gráficos 1 e 2.

Tabela 2 – ELASTÂNCIAS ESTÁTICAS.

N=30	Controle	V3	V6	V12	V24
Média	47,50	55,27	46,41	46,02	45,36
DP	5,18	9,76	5,60	3,64	4,57

Nota: valores médios e desvio padrão.

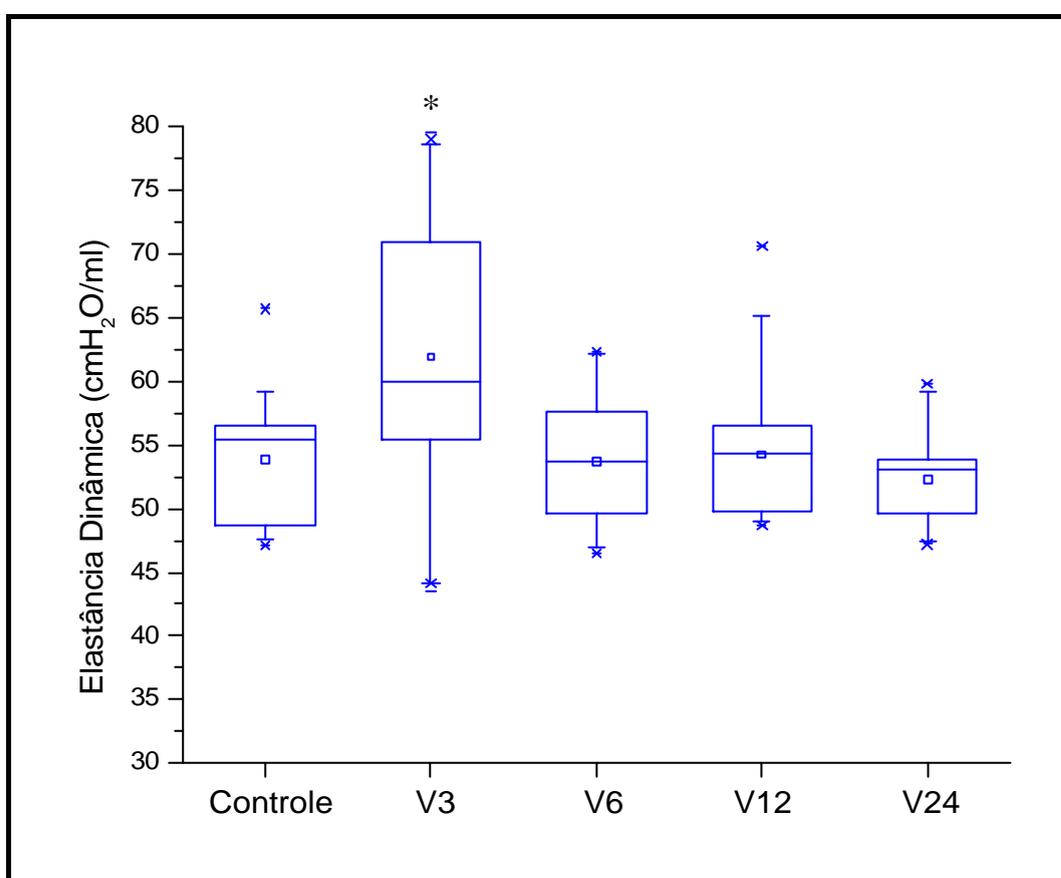
**Gráfico 1 –** Valores médios das elastâncias estáticas.

Nota: * p < 0,01 em relação aos outros grupos.

Tabela 3 – ELASTÂNCIAS DINÂMICAS.

N=30	Controle	V3	V6	V12	V24
Média	53,81	61,92	53,69	54,25	52,32
DP	4,70	10,64	5,00	4,85	3,83

Nota: valores médios e desvio padrão.

**Gráfico 2 – Valores médios das elastâncias dinâmicas.**

Nota: * $p < 0,01$.

A variação da elastância pulmonar, traduzida pela diferença entre elastância dinâmica e a elastância estática, apresentou um aumento gradual, com pico significativo em 12 horas, retornando aos valores de controle com 24 horas (tabela 4, gráfico 3).

Tabela 4 – VARIAÇÕES DAS ELASTÂNCIAS.

N=30	Controle	V3	V6	V12	V24
Média	6,31	6,65	7,28	8,23	6,96
DP	1,14	1,96	1,01	2,00	1,49

Nota: valores médios e desvio padrão.

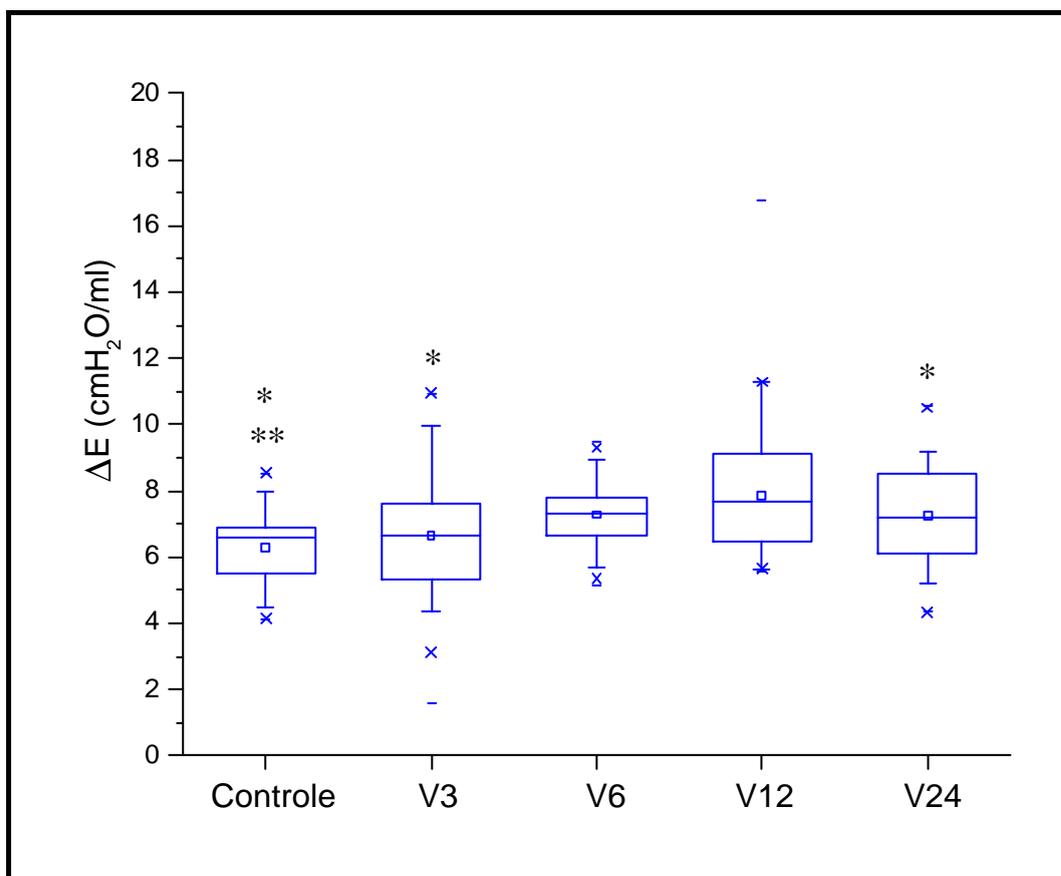


Gráfico 3 – Valores médios das variações das elastâncias.

Nota: * $p < 0,001$, $0,001$ e $0,01$ para controle, V3 e V24, respectivamente, em relação ao grupo V12; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo V6.

Em relação aos valores de $\Delta P1$, que representam as propriedades viscosas ou resistivas do tecido pulmonar, observamos um aumento significativo após 6 horas ($p < 0,001$) em relação ao controle e grupo V3, voltando aos valores basais nos grupos V12 e V24, conforme demonstrado na tabela 5 e gráfico 4.

Tabela 5 – VALORES DE $\Delta P1$.

N=30	Controle	V3	V6	V12	V24
Média	1,11	1,30	1,74	1,31	1,19
DP	0,28	0,37	0,40	0,32	0,49

Nota: valores médios e desvio padrão.

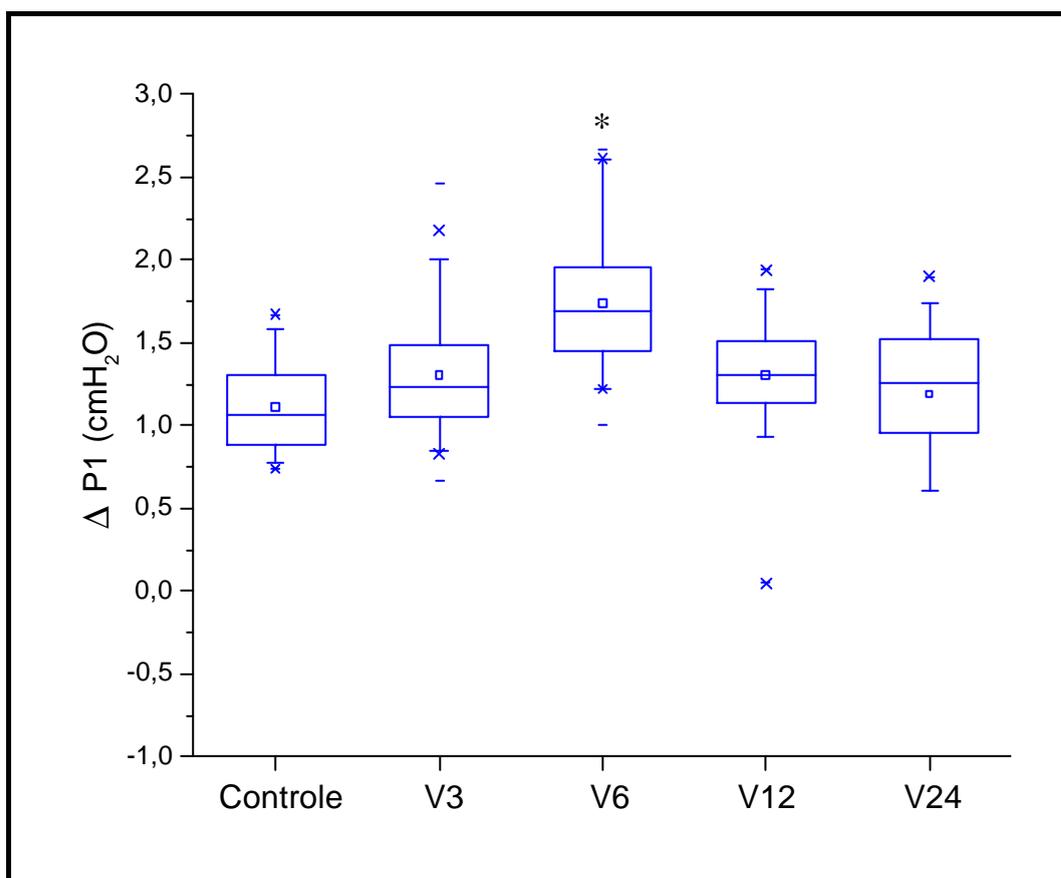


Gráfico 4 – Médias de $\Delta P1$ nos grupos estudados.

Nota: * $p < 0,001$.

Na tabela 6 e gráfico 5, observamos que os valores de ΔP_2 , referentes às propriedades viscoelásticas, apresentaram um aumento gradual, atingindo o pico em 12 horas ($p < 0,001$) e retornando a valores de controle em 24 horas.

Tabela 6 – VALORES DE ΔP_2 .

N=30	Controle	V3	V6	V12	V24
Média	1,30	1,47	1,45	1,65	1,39
DP	0,24	0,32	0,20	0,40	0,30

Nota: valores médios e desvio padrão.

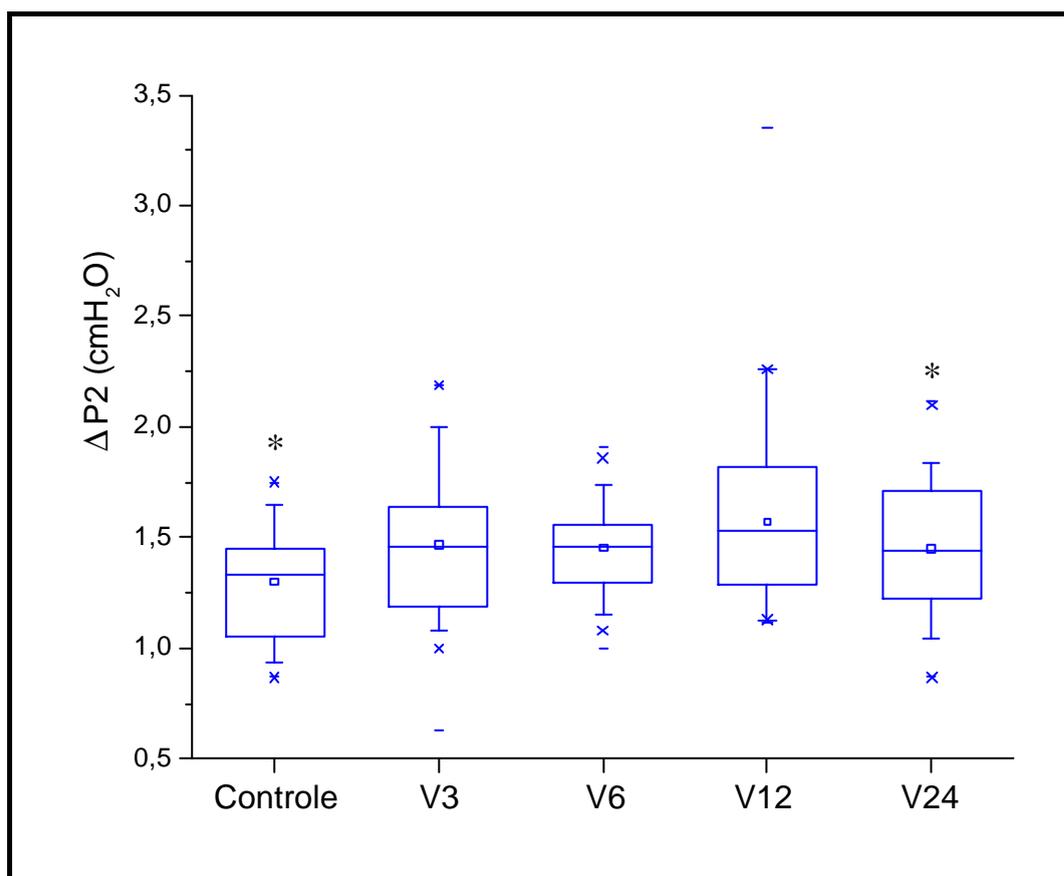


Gráfico 5 – Valores médios de ΔP_2 .

Nota: * $p < 0,01$ em relação a V12.

Na análise da variação de pressão total no pulmão, representada por ΔP_{tot} , observamos um aumento estatisticamente significativo nos valores do grupo controle em relação aos grupos V3 ($p < 0,05$), V6 ($p < 0,001$) e V12 horas ($p < 0,001$), com um pico em 6 horas, retornando a valores de controle em 24 horas (tabela 7 e gráfico 6).

Tabela 7 – VALORES DE ΔP_{tot} NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

N=30	Controle	V3	V6	V12	V24
Média	2,41	2,77	3,19	2,95	2,58
DP	0,42	0,56	0,55	0,41	0,71

Nota: valores médios e desvio padrão.

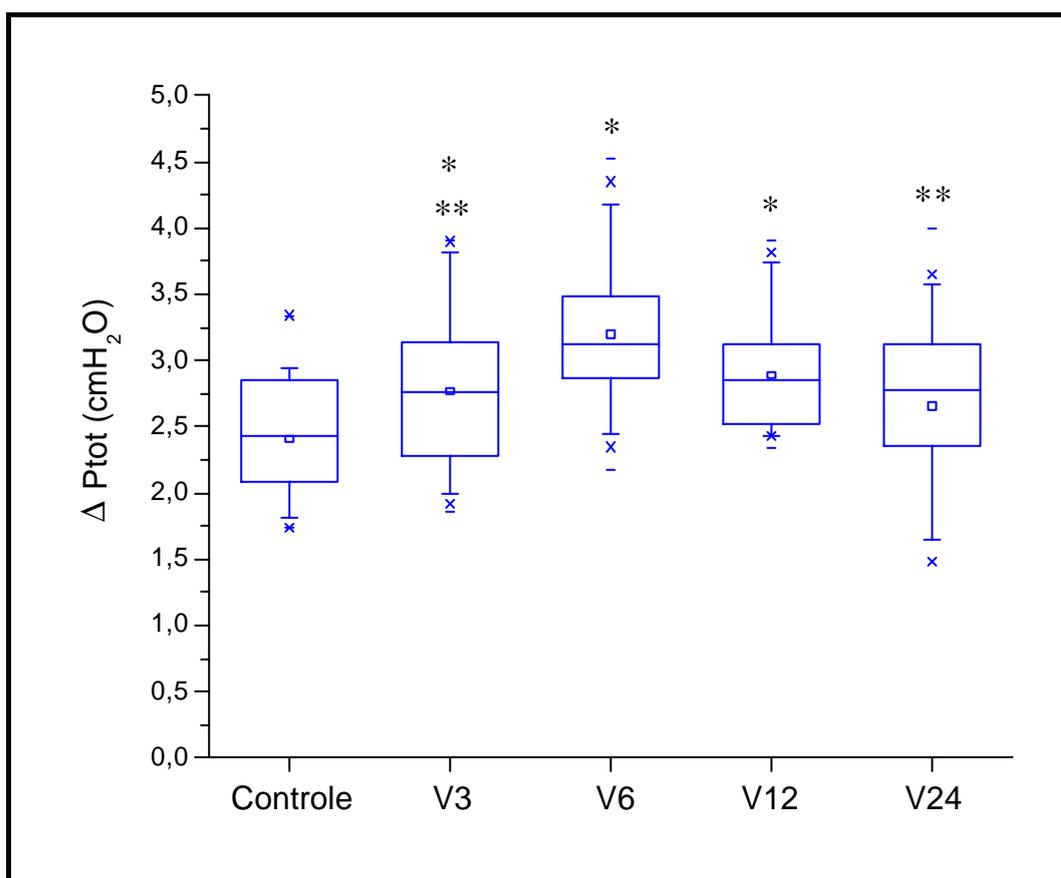


Gráfico 5 – Valores médios de ΔP_{tot} nos grupos estudados.

Nota: * $p < 0,05$, 0,001 e 0,001 para V3, V6 e V12, respectivamente, em relação ao grupo controle; ** $p < 0,01$ e 0,001 para V3 e V24, respectivamente, em relação ao grupo V6.

5.2 Histologia

No estudo histológico foi realizada a análise qualitativa e quantitativa. Na análise qualitativa do tecido pulmonar após a indução do processo de injúria foi observado a presença de edema perivascular no grupo V6 e hemorragia difusa no grupo V12.

Na análise quantitativa, a contagem de células polimorfonucleares em parede de vias aéreas, apresentou aumento significativo após 3 horas ($p < 0,001$), mantendo-se no grupo V6 ($p < 0,01$) e retornando a valores de controle nos grupos V12 e V24 (gráfico 6).

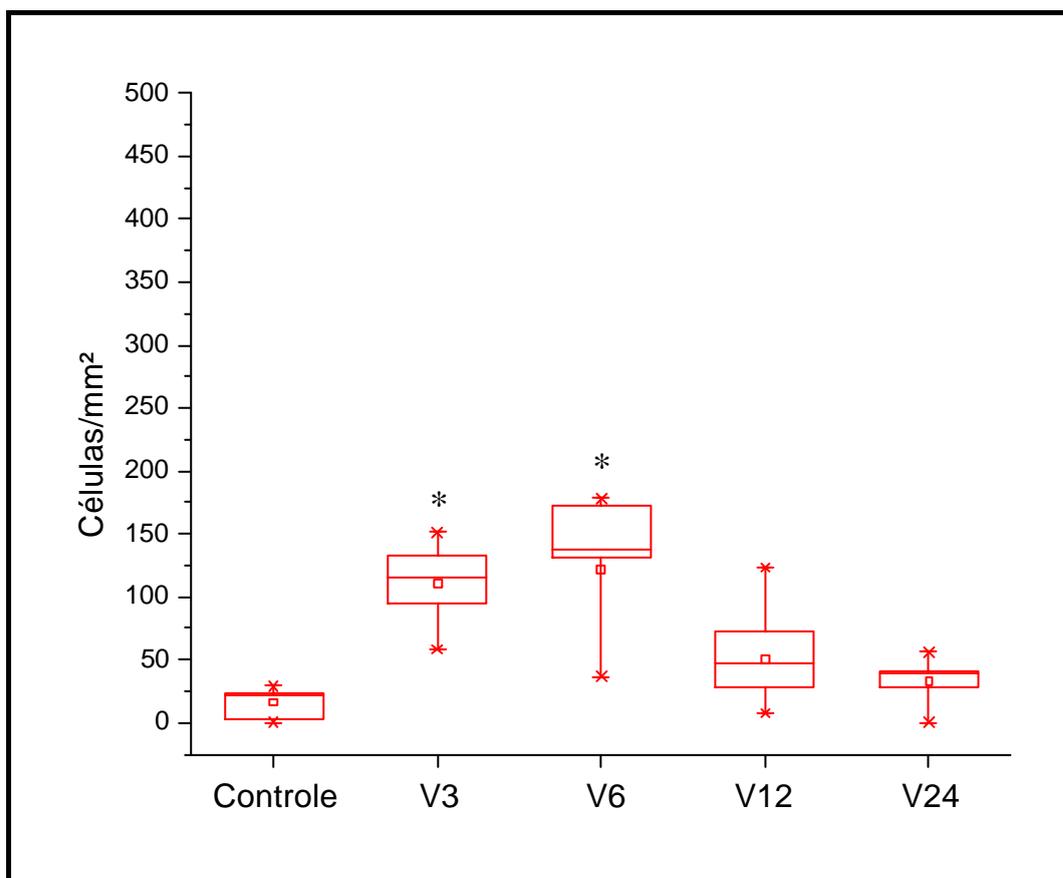


Gráfico 6 – Contagem de células Polimorfonucleares (PMN) em paredes de vias aéreas.

Nota: * $p < 0,001$ e $0,01$ para V3 e V6, respectivamente, em relação ao grupo controle.

A contagem de células linfomononucleares apresentou um aumento no grupo V6, diminuindo após 12 horas, entretanto esta diferença não foi significativa ($p=0,059$), conforme observamos no gráfico 7.

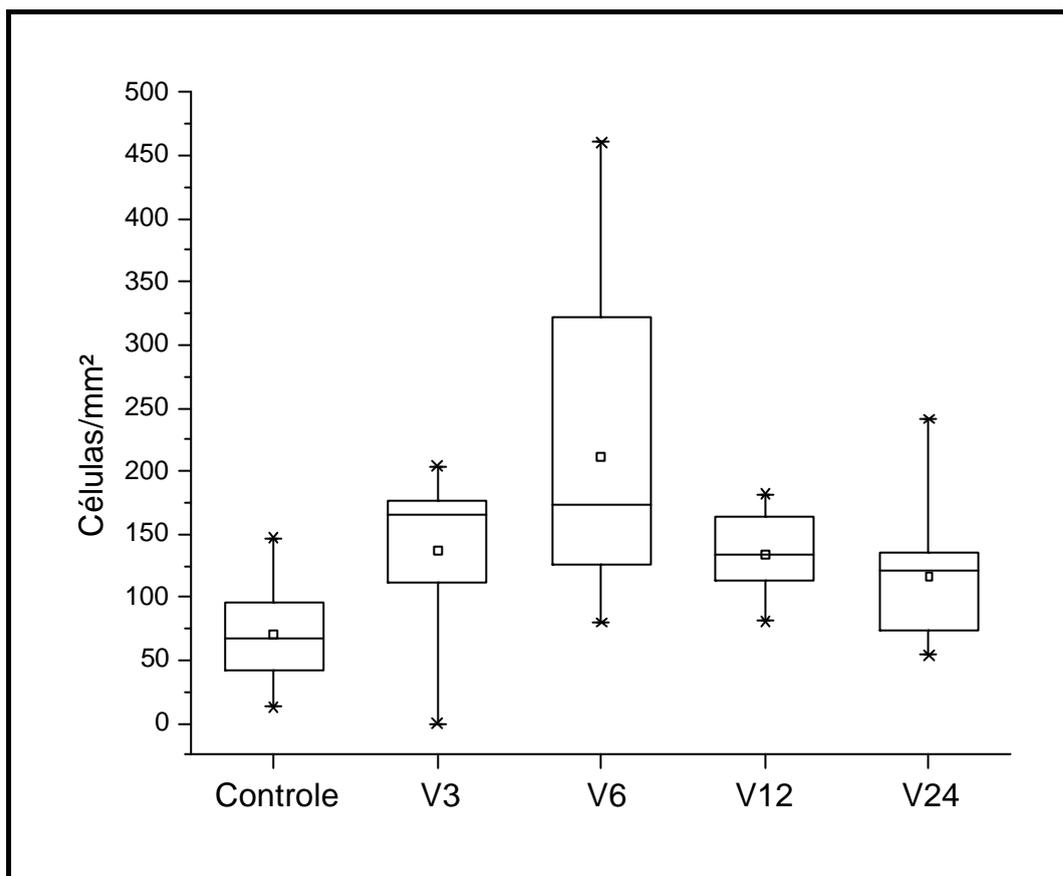


Gráfico 7 – Contagem de células Linfomononucleares (LMN) em paredes de vias aéreas.

O gráfico 8 apresenta a comparação entre a contagem de células linfomononucleares e polimorfonucleares em paredes de vias aéreas.

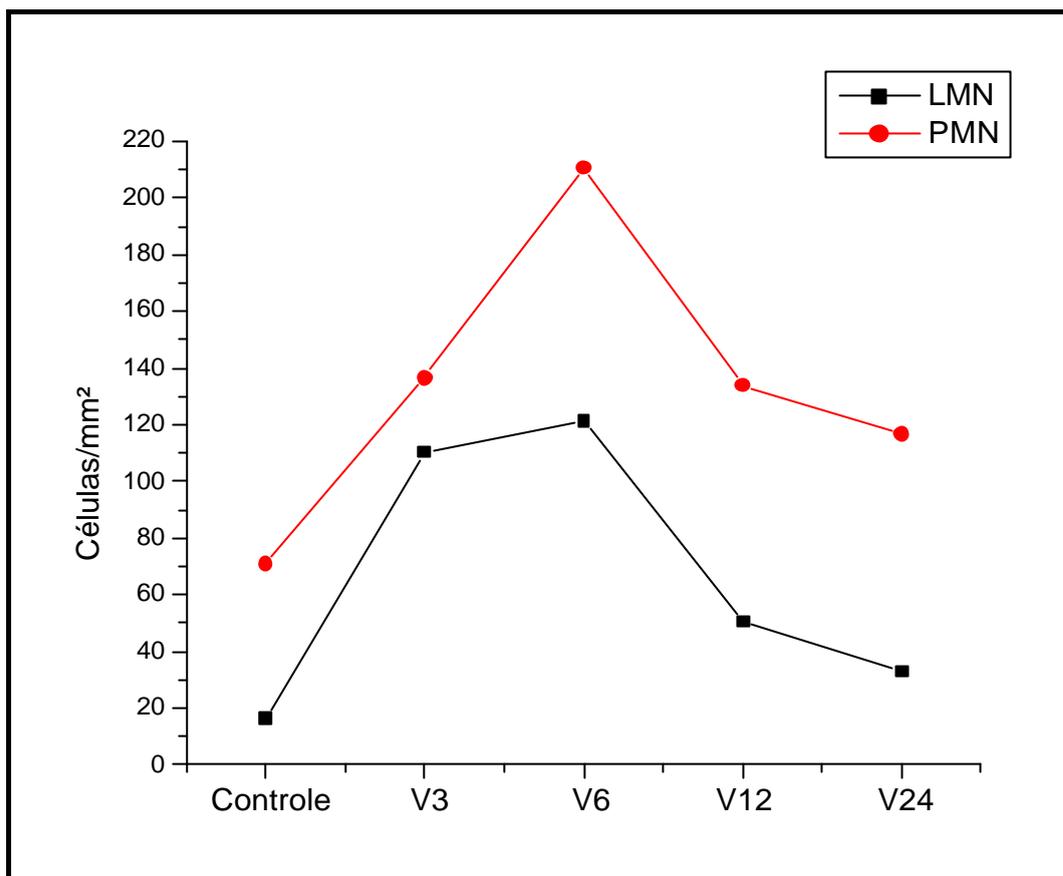


Gráfico 8 – Contagem de células Linfomononucleares (LMN) e Polimorfonucleares (PMN) em paredes de vias aéreas.

Quando analisamos o parênquima pulmonar, a contagem das células polimorfonucleares, assim como nas paredes das vias aéreas, apresentou aumento significativo com 3 horas ($p < 0,001$), mantendo-se no grupo V6 ($p < 0,001$) e retornando a valores de controle nos grupos V12 e V24 conforme o gráfico 9.

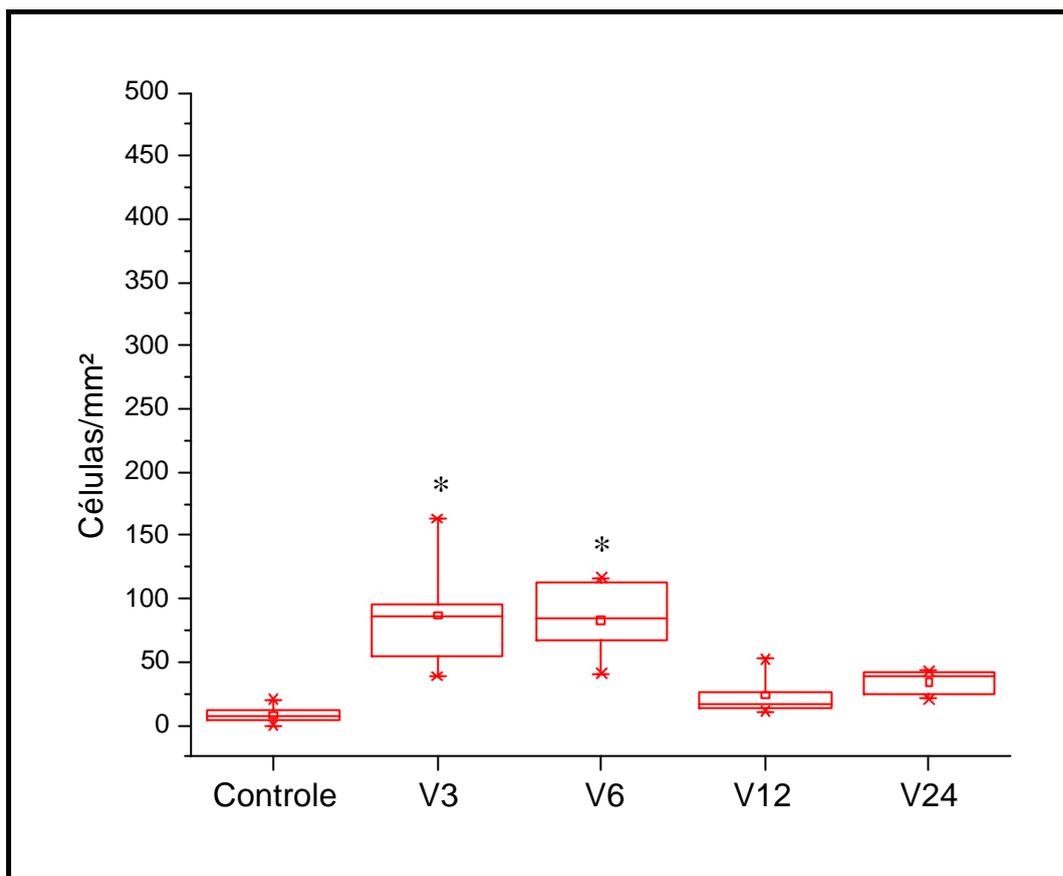


Gráfico 9 – Células Polimorfonucleares (PMN) em parênquima.

Nota: * $p < 0,001$ em relação a grupo controle.

A contagem de células linfomononucleares no parênquima pulmonar apresentou um pico em 3 horas ($p < 0,01$), voltando aos valores normais nos grupos V6, V12 e V24 de acordo com o gráfico 10.

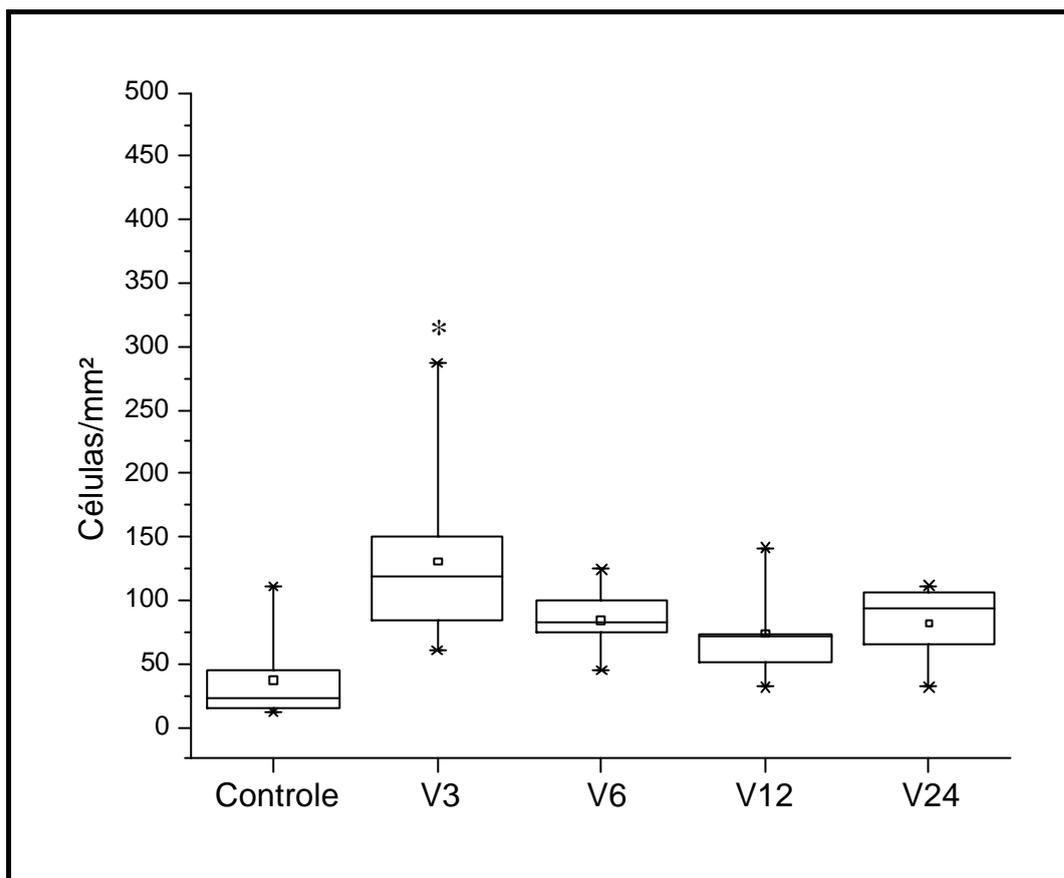


Gráfico 10 – Células Linfomononucleares (LMN) em parênquima.
Nota: * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

O gráfico 11 apresenta a comparação entre a contagem de células linfomononucleares e polimorfonucleares no parênquima pulmonar.

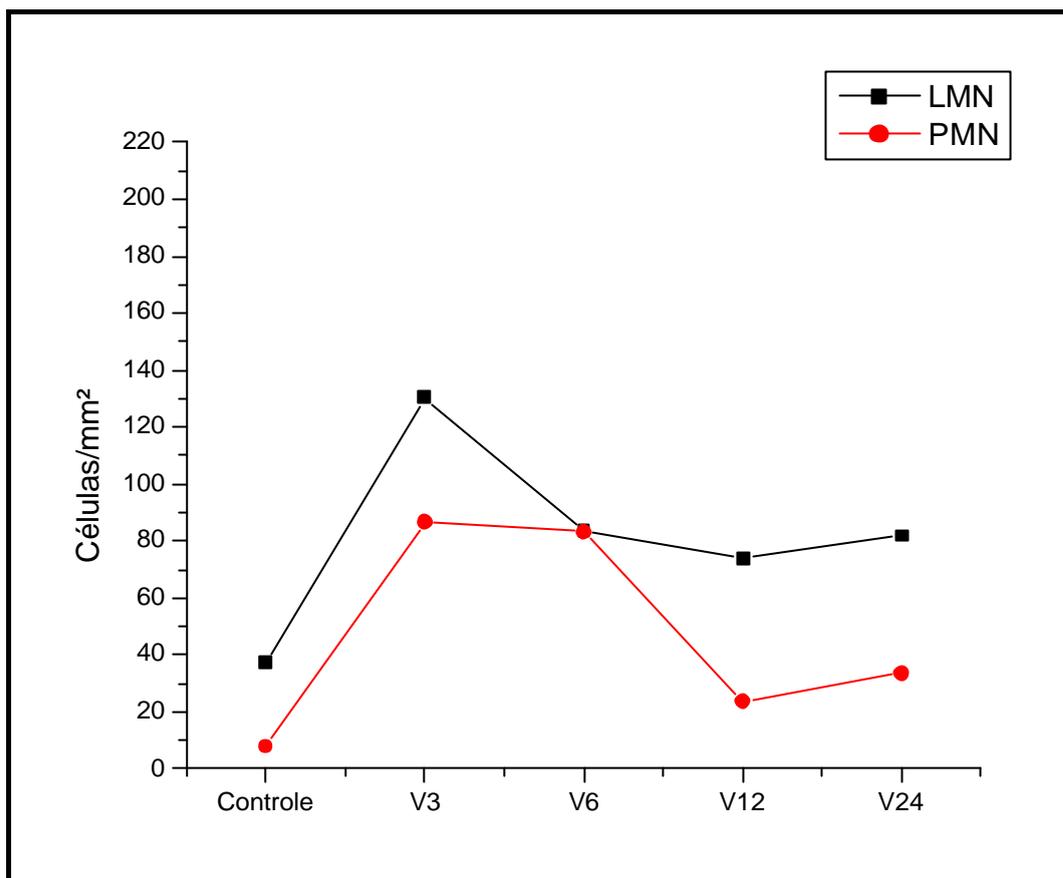


Gráfico 11 – Contagem de células linfomononucleares (LMN) e polimorfonucleares (PMN) no parênquima pulmonar.

Nas figuras a seguir, podemos observar as alterações estruturais provocadas no tecido pulmonar após a inoculação intramuscular do veneno. A figura 13 apresenta uma fotografia de lâmina histológica de parênquima pulmonar e de vias aéreas periféricas do grupo controle, onde observamos que as vias aéreas e as paredes alveolares se encontram preservadas.

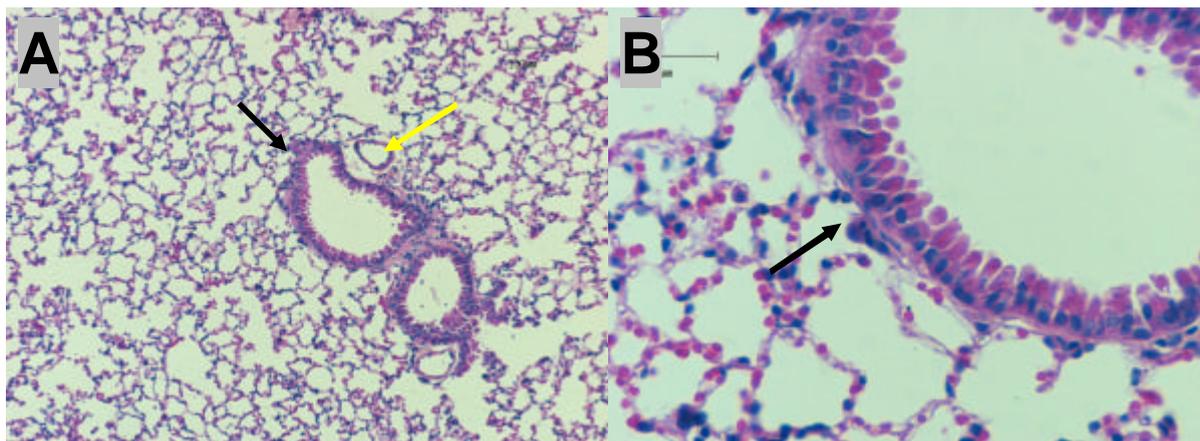


Figura 13 – Lâminas histológicas do parênquima pulmonar e vias aéreas periféricas do grupo controle. **Nota:** A-200x; B-400x. (→ via aérea; → vaso sanguíneo)

A figura 14 apresenta uma fotografia de lâmina histológica de parênquima pulmonar e de vias aéreas periféricas do grupo V3, onde observamos um infiltrado inflamatório significativo em vias aéreas e parênquima.

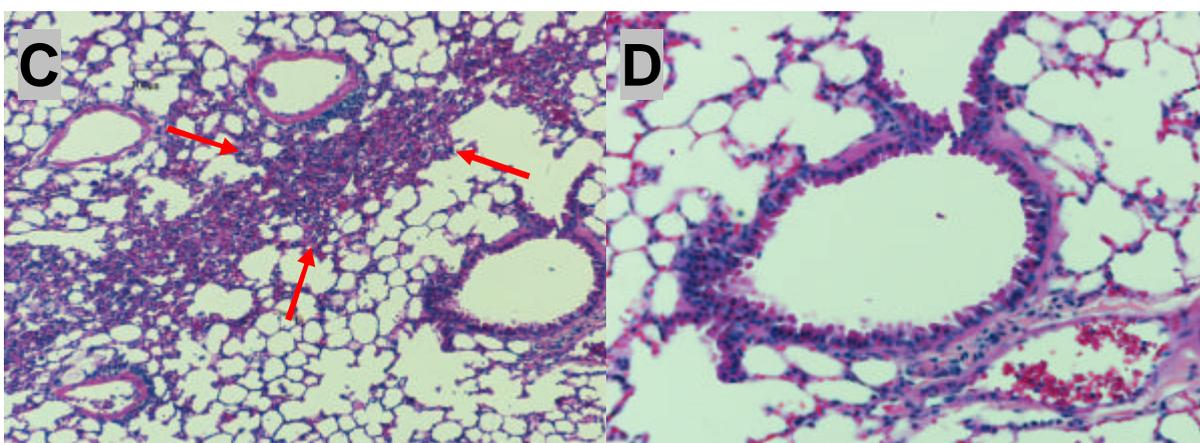


Figura 14 - Lâminas histológicas do parênquima pulmonar e vias aéreas periféricas do grupo V3. **Nota:** C-200x; D-400x.. (→ células inflamatórias).

A figura 15 apresenta uma fotografia de lâmina histológica de parênquima pulmonar e de vias aéreas periféricas do grupo V6, apresentando uma redução na contagem de células inflamatórias em parênquima quando comparado ao grupo V3. Entretanto, observamos a presença de edema perivascular.

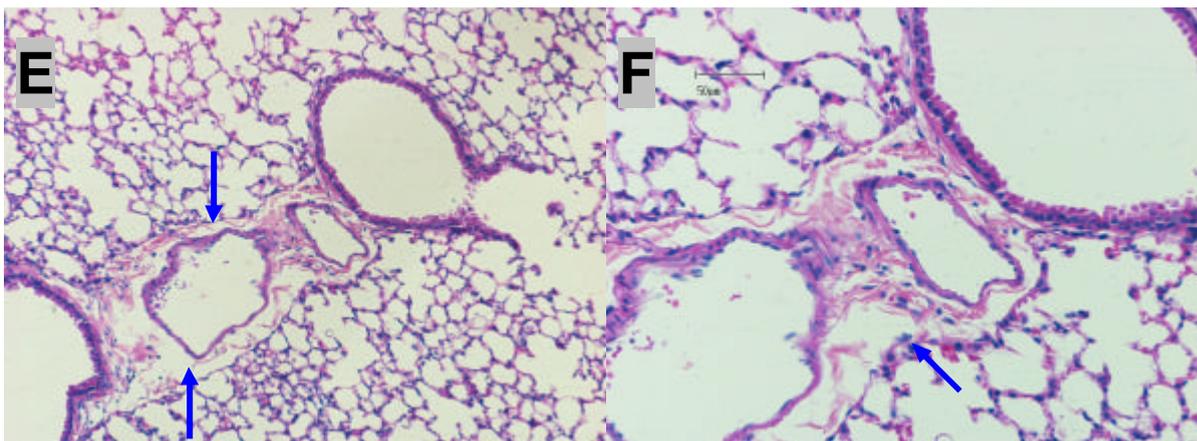


Figura 15 – Lâminas histológicas do parênquima pulmonar e vias aéreas periféricas do grupo V6.
Nota: E-200x; F-400x (→ edema perivascular).

A figura 16 apresenta uma fotografia de lâmina histológica de parênquima pulmonar e de vias aéreas periféricas do grupo V12, demonstrando hemorragia difusa no parênquima, apesar do infiltrado inflamatório estar diminuído em relação aos grupos anteriores.

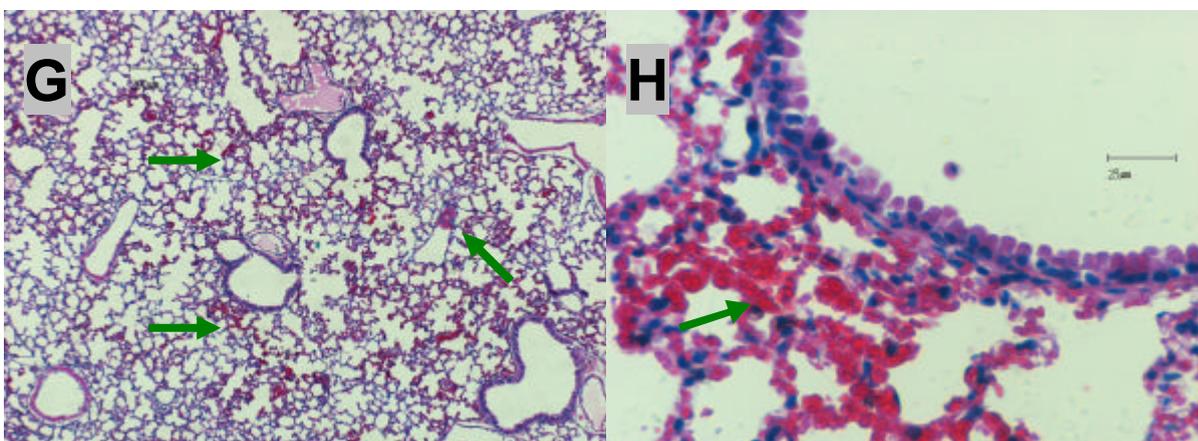


Figura 16 – Lâminas histológicas do parênquima pulmonar e vias aéreas periféricas do grupo V12.
Nota: G-100x; H-400x (→ hemorragia).

Nas lâminas de contagem de células do grupo V24, notamos uma redução da hemorragia e do processo inflamatório observados no grupo V12, aproximando-se do apresentado pelo grupo controle, conforme a figura 17.

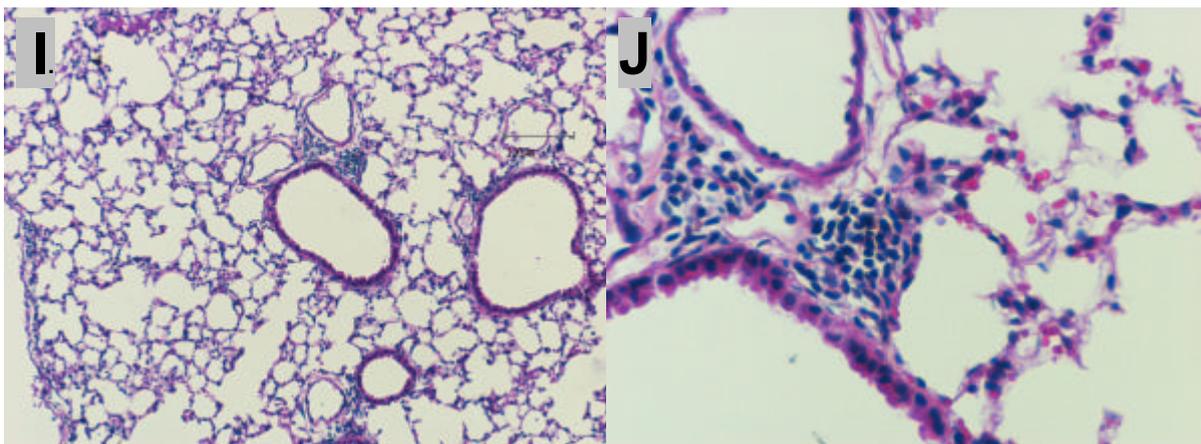


Figura 17 – Lâminas histológicas do parênquima pulmonar e vias aéreas periféricas do grupo V24.
Nota: I-200x; J-400x.

6. Discussão

Os efeitos do veneno de *C.d.t.* no bloqueio pré-sináptico da junção neuromuscular já estão bem elucidados pela literatura, assim como as alterações em rins, fígado e até mesmo a pequena ação local deste veneno sistêmico (BANCHER; ROSA; FURLANETTO, 1973; BARRAVIERA, 1990; BARRAVIERA, 1993; SANTORO *et al.*, 1999; TOYAMA *et al.*, 2003).

As conseqüências deste veneno no sistema respiratório de humanos são pouco conhecidas, apresentadas apenas por estudos de casos e suas representações como melhores referências para se estabelecer possíveis intervenções clínicas (AMARAL, 1991). Não foram encontradas referências científicas a respeito destas em modelos animais.

Segundo Silveira *et al.* (2004), em seus estudos sobre as repercussões pulmonares após aplicação de veneno de *Bothrops jararaca* por via intravenosa (i.v.), as primeiras 48 horas seguidas do acidente são decisivas no estabelecimento de lesões pulmonares.

Em geral, a complicação respiratória conseqüente ao acidente crotálico se instala nas primeiras 24 horas, podendo surgir nos casos graves, dentro de 3 a 4 horas após a picada (AMARAL *et al.*, 1991)

Nosso estudo analisou as propriedades mecânicas e a histologia do tecido pulmonar, nas primeiras 24 horas após a inoculação do veneno de *C.d.t.*, em quatro tempos diferentes.

As alterações no sistema respiratório, provocadas por picadas de serpentes *Crotalus durissus*, encontradas por Amaral *et al.* (1991), incluem a formação de atelectasias, o surgimento de um padrão ventilatório restritivo devido ao comprometimento da musculatura respiratória pela ação da crotóxina, intenso a ponto de produzir insuficiência respiratória aguda associada ao acúmulo de secreções nas vias aéreas, congestão e edema pulmonar. Tal comportamento fisiopatológico sugere uma conseqüente alteração das propriedades mecânicas elásticas e viscoelásticas.

Atelectasias em uma região segmentar do pulmão pode distorcer o parênquima e o subsegmento adjacente e assim afetar a mecânica tecidual local (CORREA *et al.*, 2001).

Cardoso *et al.* (2003), relatam como manifestações clínicas causadas por envenenamento sistêmico o surgimento de um quadro respiratório de dispnéia seguida de um padrão ventilatório misto, restritivo e obstrutivo, ocasionado respectivamente pela paralisia da musculatura torácica intercostal e acúmulo de secreções na árvore brônquica, evoluindo para paralisia diafragmática.

Para Correa *et al.* (2001), a presença de secreção nas vias aéreas periféricas pode afetar a distribuição da ventilação e aumentar a inhomogeneidade mecânica. As mudanças no tônus contrátil da musculatura lisa do parênquima pulmonar não devem ser descartadas.

Auler Jr. (1987), afirma que os componentes viscosos do tecido pulmonar, representadas por ΔP_1 , compõem as propriedades resistivas pulmonares, sendo que tanto as vias aéreas como os tecidos contribuem, mas as primeiras geram valores mais importantes. Para Saldiva *et al.* (1992), o ΔP_1 está diretamente relacionado à resistência de vias aéreas.

Em um estudo retrospectivo realizado por Brooks *et al.* (2002), dentre 214 casos de acidentes ofídicos ocorridos num período de seis anos, 8,4% (18 pacientes) das vítimas desenvolveram reações de hipersensibilidade manifestadas como comprometimento respiratório.

Em estudos de Wagers *et al.* (2002), foi observado um aumento dos parâmetros resistivos, elásticos e viscoelásticos pulmonares em modelo animal de inflamação de vias aéreas.

D'Angelo *et al.* (2004), observaram uma associação do aumento da resistência de vias aéreas com uma resposta inflamatória substancialmente aumentada.

Em nosso estudo, os valores de ΔP_1 apresentaram um aumento significativo no grupo 6 horas, o que sugere um incremento nas propriedades resistivas, principalmente em vias aéreas, com possível reação de hipersensibilidade e acúmulo de secreção, provocados diretamente ou não, pela ação do veneno estudado.

Segundo Correa *et al.* (2001), a elastância estática (Est) e a variação da elastância (ΔE) representam, respectivamente, as propriedades elásticas e viscoelásticas do tecido pulmonar. Para Auler Jr. (1987), a pressão dissipada para vencer as desigualdades mecânicas e o componente resistivo da viscoelasticidade do tecido pulmonar e das pequenas vias aéreas é representado por ΔP_2 .

Os valores de pressões viscoelásticas encontrados em nosso estudo, representados por ΔP_2 e reforçados por ΔE , apresentaram um pico com 12 horas pós inoculação do veneno, com diferença significativa em relação ao grupo controle e grupo V24. Estes resultados podem ser atribuídos às ações indiretas causadas pelo veneno de *C.d.t.*, principalmente ao processo inflamatório observado no estudo histológico.

Os valores da variação de pressão total do pulmão, representados por ΔP_{tot} , demonstram que no período de 24 horas, ocorre um aumento da pressão total necessária para deslocamento de um mesmo fluxo no pulmão, ou seja, maior pressão deve ser gerada para vencer as forças elásticas presentes. Observamos que este parâmetro retorna aos valores de controle ao final das 24 horas.

Segundo Cardoso *et al.* (2003), alguns modelos experimentais indicam que após a lesão tissular local causada por venenos, alguns processos como regeneração muscular adequada, cicatrização ou reparação do tecido sem regeneração funcional, podem ser ativados.

Os resultados encontrados em nosso estudo mostram que o veneno de *C.d.t.* provoca alterações mecânicas no tecido pulmonar do animal afetado, mas o retrocesso destes parâmetros não podem ser atribuídos a uma regeneração devido à falta de evidências.

Segundo Amaral *et al.* (1991), a rabdomiólise secundária a ação miotóxica sistêmica do veneno crotálico pode ocorrer na musculatura respiratória e também contribuir para a diminuição da eficiência mecânica do fole torácico, O aumento de P1 observado em nossos resultados também pode ser associado a esta disfunção gerada nos músculos respiratórios.

Esse quadro de rabdomiólise sistêmica pode ser acompanhado de um aumento drástico nos níveis séricos de enzimas do citosol das células musculares, tais como a Creatinaquinase (CK) (CARDOSO *et al.*, 2003).

Santoro *et al.* (1999), observaram em seu estudos que o pico da atividade miotóxica ocorreu após três horas à inoculação i.m. do veneno de *C.d.t.* e então, diminuiu progressivamente, até 24 horas.

O veneno *C.d.t.* apresentou maiores valores de CK entre três e nove horas após a injeção. Em estudos de Rodrigues-Simioni (2004), foi observado um aumento significativo de CK com 30 minutos de incubação, sendo o experimento, realizado *in vitro*.

As alterações da mecânica pulmonar causadas pelo veneno da *Bothrops jararaca*, um veneno de ação local, foram dependentes da dose e do tempo. As variações nas propriedades elásticas e viscoelásticas foram correlacionadas com a severidade da inflamação pulmonar, observada pela análise histopatológica de da lavagem do fluido broncoalveolar (SILVEIRA *et al.*, 2004).

Como descrito anteriormente, a composição do veneno de *C.d.t.* é complexa e constituída de enzimas, toxinas e peptídeos (VARANDA; GIANNINI, 1994). A crotovina, a mais importante delas, é formada pela crotapotina e a fosfolipase A₂ (BARRAVIERA, 1990).

A presença de hemorragia no grupo V12 é contraditória à literatura, pois o veneno de *C.d.t.*, possui alta atividade neurotóxica e escassa atividade proteolítica, hemorrágica e edematogênica (SANTORO, 1999), entretanto, a presença da crotamina associada a uma alta atividade de PLA₂, faz do veneno de *C.d.t.* o mais miotóxico entre as espécies, podendo ser responsável pelo processo hemorrágico encontrado.

Segundo Gutiérrez e Ownby (2003), após a distribuição pelo corpo, a PLA₂ de ação sistêmica, se liga a receptores de alta afinidade da membrana das células musculares em outras regiões anatômicas, induzindo a miotoxicidade sistêmica.

Segundo Iglesias *et al.*, (2005), as atividades inflamatórias e neurotóxicas são potencialmente dependentes da atividade catalítica do PLA₂.

A mionecrose induzida por PLA₂ é seguida pela invasão de abundante infiltrado inflamatório para o músculo afetado. Leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, são os primeiros a chegar, com 3-6 horas e os macrófagos predominam em intervalos de tempo mais tardios (HARRIS; MALTIN, 1982). A análise histológica realizada em nosso estudo demonstrou um aumento acentuado no número de células polimorfonucleares, também com pico entre 3 e 6 horas, sugerindo assim, uma ação direta do PLA₂ sobre o tecido pulmonar.

A toxicidade, neurotoxicidade ou mionecrose da atividade do PLA₂ da fração F15 do veneno de *C.d.t.* não é dependente da presença de outras moléculas como a crotapotina e envolvem mecanismos similares aos PLA₂ botrópicos (TOYAMA, 2003). Vários estudos relatam que a PLA₂ induz edema, um efeito que, em alguns casos, são dependentes da habilidade da PLA₂ em ligar-se a proteínas específicas da membrana (IGLESIAS *et al.*, 2005).

Entretanto, a resposta edematogênica induzida pelo veneno de *C.d.t.* encontrada por Santoro *et al.* (1999), não foi dose-dependente e teve um curso rápido e transitório. O máximo de edema foi observado 30 minutos após a injeção e não atingiu valores maiores que 35%.

Segundo Cardoso *et al.* (2003), os venenos das serpentes do gênero botrópico possuem uma potente ação inflamatória que se manifesta fundamentalmente por edema acentuado, dor e infiltrado leucocitário dos tecidos afetados.

Neutrófilos e macrófagos possuem um importante papel na remoção dos restos necróticos, etapa necessária para uma adequada regeneração muscular (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). Os neutrófilos possuem um importante papel na mediação dos danos microvasculares mas, também contribuem para as lesões teciduais pulmonares.(McNEE; SELBY,1993).

Segundo Meduri (1996), a fase inicial da lesão aguda pulmonar é caracterizada pelo aumento na permeabilidade endotelial e epitelial, seguidas de uma fase subaguda fibroploriferativa que pode resultar em um reparo do pulmão lesado ou em uma obliteração progressiva dos compartimentos intersticiais e alveolares.

A patogênese da lesão aguda pulmonar têm sido explicada como a presença de injúria direta ao parênquima ou indireta extrapulmonar que resulta de uma resposta inflamatória sistêmica aguda (BERNARD *et al.* 1994).

Para Pelosi *et al.* (2003), a injúria pulmonar provocada por ação direta, leva a uma ativação de macrófagos alveolares e neutrófilos e da cascata inflamatória, gerando uma inflamação intrapulmonar.

Na injúria indireta, a lesão pulmonar se origina da ação de mediadores inflamatórios liberados na circulação sistêmica por focos extrapulmonares. Nestes casos, os primeiros danos causados se encontram no endotélio vascular pulmonar, com aumento da permeabilidade vascular e edema intersticial (PELOSI *et al.* 2003).

Ao observarmos as lâminas histológicas do grupo V6, encontramos um edema perivascular, não quantificado em nosso estudo, que pode ser relacionado ao fator indireto da lesão gerada pelo veneno de *C.d.t* e atribuída à ação do PLA₂ sistêmico.

A barreira alvéolo-capilar é formada por duas estruturas diferentes, o epitélio alveolar e o endotélio vascular. Injúrias pulmonares, provocadas pelas vias aéreas ou pela circulação resultam em dano alveolar difuso (PUGIN *et al.* 1999).

No envenenamento por veneno botrópico em modelos animais, as primeiras células do infiltrado inflamatório a extravasar são os neutrófilos polimorfonucleares, que aparecem nos tecidos lesado já nas primeiras horas. Esse infiltrado celular pode alcançar o pico entre 6 e 72 horas, sendo gradualmente substituídos pelo aparecimento de células mononucleares, monócitos e linfócitos (CARDOSO *et al.*, 2003).

Nossos resultados mostram um pico, não significativo, no número de células linfomononucleares do grupo V6 em vias aéreas, apesar de Tong *et al.* (2006), relatarem a migração mononuclear em resposta à lesão aguda pulmonar.

Estudos patológicos precedentes indicam que a resposta pulmonar a injúria é estereotipada, independente do fator desencadeante (MENEZES *et al.*, 2005) Segundo Aggarwal *et al.* (2000), a lesão aguda pulmonar é a forma extrema de um espectro de injúria pulmonar causada por um mecanismo uniforme, independente da patologia inicial.

Menezes *et al.* (2005) em seus estudos, compararam as alterações mecânicas e do processo inflamatório da lesão aguda pulmonar causada diretamente e indiretamente, instilando-se lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, nos pulmões e no peritônio, respectivamente. A lesão provocada diretamente nos pulmões apresentou um processo inflamatório mais acentuado, acompanhado por um aumento nos níveis de citocina e do infiltrado neutrofílico.

Segundo Cardoso *et al.*(2003), entre os mediadores da inflamação encontram-se as citocinas, produzidas não somente pelos leucócitos do infiltrado, mas também pelas células residentes dos tecidos lesados. Foi encontrado, em pacientes picados por *C.d.t.*, uma elevação de IL-6 e IL-8 (citocina quimiotáxica).

Alguns estudos têm demonstrado aumento da concentração de IL-6 no lavado broncoalveolar de pacientes com infecção pulmonar. A IL-6 é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos e estimula a produção de células de imunoglobulina B, a proliferação de células T, a ativação do mecanismo natural de morte celular e citotoxicidade. (SCHUTTE *et al.* 1996).

Segundo Su *et al.* (2003), IL-8 se liga a receptores específicos dos neutrófilos intensificando sua migração e degranulação na participação da lesão aguda pulmonar.

A IL-8 é responsável por mais de 50 % da atividade quimiotáxica neutrofílica em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (GOODMAN *et al.*, 1996). Aggarwal *et al.* (2000), observaram que o nível elevado de IL-8 se

correlaciona com o número de neutrófilos presentes na síndrome do desconforto respiratório agudo.

Uma análise específica dos mediadores químicos presentes nos tecidos pulmonares obtidos em nosso estudo se faz necessária, a fim de se estabelecer o potencial do veneno de *C.d.t.* em desenvolver um quadro de síndrome do desconforto respiratório agudo.

Para Rocco *et al.* (2001), a lesão pulmonar aguda é caracterizada por uma fase exudativa precoce e uma fase proliferativa tardia. Na fase exudativa os alvéolos contém fluido proteináceo, células vermelhas do sangue, neutrófilos e macrófagos, podendo-se observar a presença de microatelectasias, encolhimento de células endoteliais, assim como focos de destruição destas células. A fase proliferativa, caracterizada pela hiperplasia de células epiteliais do tipo II e acúmulo de fibroblastos e numerosos monócitos no interstício, resulta da evolução da fase exudativa após aproximadamente 1 a 2 semanas.

O parênquima pulmonar pode ser explicado como uma matriz conectiva viscoelástica conectada a um sistema contrátil que modula as propriedades mecânicas (YUAN; INGENITO; SUKI, 1997).

Segundo Faffe *et al.* (2006), as pequenas vias aéreas, pequenos vasos sanguíneos e as células intersticiais contráteis são responsáveis pela resposta contrátil da periferia do pulmão, quando estimulados por tratamento com acetilcolina.

Para Fredberg et al. (1993), na ausência de estimulação, a histerese é atribuída às propriedades mecânicas passivas do tecido conectivo.

Em modelo experimental de lesão aguda pulmonar provocada por paraquat, um herbicida utilizado na provocação de lesão aguda pulmonar, foi observado um aumento dos componentes elásticos e colagenosos, caracterizando um processo de fibroelastose, já nas primeiras 24 horas após a indução da lesão. Entretanto, os autores atribuíram, como causa da disfunção mecânica encontrada, o desequilíbrio na interface líquido-ar e não as alterações teciduais, afinal, o paraquat induz lesão pela ação sobre os pneumócitos do tipo II, responsáveis pela produção do surfactante pulmonar (ROCCO *et al.*, 2001).

Portanto, o processo inflamatório encontrado no tecido pulmonar, assim como o edema perivascular observado em nosso estudo podem estar associados ao aumento de histerese e alteração na interface líquido-ar, levando as alterações das propriedades mecânicas apresentadas.

Novas investigações sobre o efeito do veneno de *C.d.t.*, nos pulmões, assim como no sistema respiratório como um todo, permitiriam uma intervenção clínica mais eficiente na prevenção do quadro de insuficiência respiratória aguda.

7. Conclusão

O veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* provocou alterações da mecânica respiratória com aumento das propriedades viscosas, elásticas e viscoelásticas do tecido pulmonar.

Os valores de propriedades viscosas apresentaram um aumento significativo com 6 horas de inoculação do veneno, as propriedades elásticas apresentaram aumento com 3 horas de inoculação do veneno e os valores de propriedades viscoelásticas foram mais altos 12 horas após a inoculação do veneno

Estas alterações variaram ao longo do tempo, revelando uma ação lesiva sobre o tecido pulmonar provocada pelo veneno de *C.d.t.*. Todos os parâmetros retrocederam até as 24 horas finais do experimento. Esses achados foram confirmados pela análise histológica realizada que apresentou aumento de celularidade de 3 a 6 horas após a inoculação do veneno, caracterizando um processo inflamatório, e também retornaram a valores basais com 24 horas.

Podemos concluir que o veneno de *C.d.t.* provoca alterações no tecido pulmonar, mas o mecanismo exato de ação deste, não pôde ser esclarecido. Estudos mais específicos sobre as repercussões pulmonares do veneno de *C.d.t* são necessários, afim de se estabelecer se o processo de provocação da injúria aguda se encontra na paralisia muscular e mionecrose sistêmica, levando à fatores desencadeantes causadores de uma inflamação, ou se há uma ação direta dos fatores tóxicos do veneno sobre o tecido pulmonar levando a alterações morfoestruturais e de propriedades mecânica.

Referências Bibliográficas

AGGARWAL, A.; BAKER, C. S.; EVANS, T. W.; HASLAM, P. L. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome **European Respiratory Journal**. v.15, p. 895 – 901, 2000.

ALVES NETO, O. **Mecânica respiratória e morfometria pulmonar e ratos normais anestesiados com cetamina**. 2002. 157f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2002.

AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 33, p. 251-255, 1991.

ARAÚJO, M. Ofidismo. In: PITTA, G. B. B.; CASTRO, A. A.; BURIHAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceió: UNICISAL/ECMAL & LAVA, 2003.

AULER Jr., J. O. C.; ZIN, W. A., CALDEIRA, M. P.; CRADOSO, W.V.; SALDIVA, P. H. Pre- and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. **Chest**. v. 92, p. 984-990, 1987.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. . cap. 8, p. 91-98.

BANCHER, W.; ROSA, R. R.; FURLANETTO, R. S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de *mus-musculus* Linnaeus, 1758. **Memórias do Instituto Butantan**.v. 37, p. 139-148, 1973.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. Revisão. **Jornal Brasileiro de Medicina**. V. 65, n. 4, p. 209-250, 1993.

BARRAVIERA, B. Acidentes por animais peçonhentos. **Arquivos Brasileiros de Medicina**. V. 64, n. 1. p. 14-20, 1990.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. P. 262-273. In: BARRAVIERA, B. **Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB. 1999.411p.

BATES, J. H. T.; ABE, T.; ROMERO, P. V.; SATO, J. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **Journal of Applied Physiology**. v. 67, n. 1, p. 488-492, 1989.

BATES, J. H. T.; BACONNIER, P.; MILIC-EMILI, J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **Journal of Applied Physiology**. v. 64, p. 2204-2214, 1988b.

BATES, J. T. H.; DECRAMER, D.; CHARTRAND, D.; ZIN, W. A.; BODDERNER, A.; MILIC-EMILI, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **Journal of Applied Physiology**. v.59, n. 3, p. 732-737, 1985.

BATES, J. T. H.; LUDWIG, M. S.; SLY, P. D.; BROWN, K.; MARTIN, J. G.; FREDBERG, J. J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **Journal of Applied Physiology**. v. 65, n. 1, p. 408-414, 1988a.

BAYDUR, A.; BEHRAKIS, P. K.; ZIN, W. A.; JAEGER, M.; MILIC-EMILI, J. A Simple method for assessing the validity of the Esophageal Ballon Technique. **American Review of Respiratory Disease**. v. 126, p. 788-791, 1982.

BERNARD, G. R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K. L.; CARLET, J.; FALKE, K.; HUDSON, L.; LAMY, M.; LEGALL, J. R.; MORRIS, A.; SPRAGG R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 149, p.818-824, 1994

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**. v 19, n. 1, p. 7-16, 2003.

BROOKS, D. E.; GRAEME, K. A.; RUHA, A. M.; TANEN, D. A. Respiratory compromise in patients with rattlesnake envenomation. **The Journal of emergency Medicine**. v.23, n.4, p. 329-332, 2002.

CAPELLO, M.; DE TROYER, A. Role of rib cage elastance in the coupling between the abdominal muscles and the lung. **Journal of Applied Physiology**.v. 97, p. 85-90, 2004.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr., V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CORREA, F. C. F.; CIMINELLI, P. B.; FALCÃO, H.; ALCÂNTARA, B. J. C.; CONTADOR, R. S.; MEDEIROS, A. S.; ZIN, W. A.; ROCCO, P. R. M. Respiratory mechanics and lung histology in noenal rats anesthetized with sevoflurane. **Journal of Applied Physiology**. v. 91, p. 803-810, 2001.

D'ANGELO, E. ; PECCHIARI, M.; SAETTA, M.; BALESTRO, E.; MILIC-EMILI, J. Dependence of lung injury on inflation rate during low-volume ventilation in normal open-chest rabbits. **Journal of Applied Physiology**. v.97, p. 260-268, 2004.

D'ANGELO, E. Statics of the respiratory system. p. 9-19. In: MILIC-EMILI, J.; LUCANGELO, U.; PESENTI, A.; ZIN, W. A. **Basics of respiratory mechanics and artificial ventilation**. Milão: Springer, 1999.

DAMICO, D. C. S.; BUENO, L. G.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; NOVELLO, J. C. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. **Toxicon**.v. 46, p. 222-229, 2005.

DE TROYER, A. Respiratory muscle function. p. 20-33. In: MILIC-EMILI, J. **Applied Physiology in Respiratory Mechanics**. Milão: Springer, 1998.

DOS-SANTOS, M. C.; ASSIS, E. B.; MOREIRA, T. D.; PINHEIRO, J.; FORTES-DIAS, C. L. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian regio. **Toxicon**. v. 46, n. 8 , p. 958-961, 2005.

FAFFE, D. .S.; D'ALESSANDRO, E. S.; XISTO, D. G.; ANTUNES, M. A.; ROMERO, P. V.; NEGRI, E. M.; RODRIGUES, N. R. D.; CAPELOZZI, V. L.; ZIN W. A.; ROCCO, P. R. M. Mouse strain dependence of lung tissue mechanics: Role of specific extracellular matrix composition. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v. 152, p. 186-196, 2006.

FREDBERG, J .J.; BUNK, D.; INGENITO, E.; SHORE, S. A. Tissue resistance and contractile state of lung parenchyma. **Journal of Applied Physiology**. v. 74, n. 3, a. 1387-1397, 1993.

FUNASA – **Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2^aed, Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120p.

GATTINONI, L.; PELOSI, P.; SUTER, P. M.; PEDOTO, A.; VERCES, I. P.; LISSONI, A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes?. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.158, n.1, p.3-11, 1998.

GATTINONI, L.; CHIUMELLO, D.; CARLESSO, E.; VALENZA, F. Bench-to bedside review: Chest wall elastance in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome patients. **Critical Care**. v.8, n.5, p. 350:355, 2004.

GOODMAN, R. M.; STRIETER, D. P.; MARTIN, K. P.; STEINBERG, J. A.; MILBERG, R. J.; MAUNDER, S. L.; KUNKEL, A.; WALZ, L. D.; HUDSON, MARTIN, T. R. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 154, p.602-611, 1996.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA / MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venous phospholipases A₂ : insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. v. 42, p. 915-931, 2003.

HARRIS, J. B.; MALTIN, C. A. Myotoxic activity of the crude venous and the principal neurotoxin, taipoxin, of Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*. **British Journal of Pharmacology**. v. 76, p. 61-75, 1982.

IGLESIAS, C. V.; APARICIO, R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CAMARGO, E. A.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D. O.; BERIAM, L. O. S.; MONTEIRO, H. S. A.; TOYAMA, M. H. Effects of morin on snake venom phospholipase A₂ (PLA₂). **Toxicon**. v. 46, p. 751-758, 2005.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W. A.; MILIC-EMILI, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **Journal of Applied Physiology**.v. 64, n. 1, p. 441-450, 1988.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M. A.; GUIMARÃES, S. M. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni* na região de São José do Rio Preto. **Arquivos Brasileiros de Medicina**. v. 64, n. 3, p.167-171, 1990.

LEVITZKY, M. G. Mecânica da Respiração. In: **Fisiologia Pulmonar**.6.ed. São Paulo: Manole, 2004, cap. 2, p. 11-53.

MACNEE, W.; SELBY, C. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 2. Neutrophil traffic in the lungs: role of haemodynamics, cell adhesion, and deformability. **Thorax**. v. 48, p. 79 – 88, 1993.

MARSHALL, R. P.; BELLIGAN, G.; WEBB, S.; PUDDICOMBE, A.; GOLDSACK, N.; McANULTY, R. J.; LAURENT, G. J. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. v. 162, p. 1783-1788, 2000.

MEAD, J. Contribution of compliance of airways to frequency-dependent behaviour of lungs. **Journal of Applied Physiology**. v. 26, n. 5, p. 670-673, 1969.

MEAD, J.; WHITTENBERGER, L. Evaluation of airway interruption technique as a method for measuring pulmonary air-flow resistance. **Journal of Applied Physiology**. v. 6, p. 408-416, 1954.

MEDURI, G. U. The role of the host defense response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. **European Respiratory Journal**. v. 9, p. 2650-2670, 1996.

MENEZES, S. L. S.; BOZZA, P. T.; NETO, H. C. C. F.; LARANJEIRA, A. P.; NEGRI, E. M.; CAPELOZZI, V. L.; ZIN, W. A.; ROCCO, P. R. M. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. **Journal of Applied Physiology**. v. 98, p. 1777 – 1783, 2005.

MORTOLA, J. P.; NOWORAJ, A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **Journal of Applied Physiology**. v.55, n. 1, p. 250-253, 1983.

MOUNT, L. E. The ventilation flow-resistance and compliance of rats lungs. **Journal of Applied Physiology**. v. 127, p. 157-167, 1955.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotoxin, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**. v. 46, n. 4, p. 363-370, 2005.

OTIS, A. B.; McKERROW, C. B.; BARTLETT, R. A.; MEAD, J.; McILROY, M. D.; SELVERSTONE, N. J.; RADFORD, E. P. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. **Journal of Applied Physiology**. v. 8, n. 4, p. 427-443, 1956.

PELOSI, P.; D'ONOFRIO, D.; CHIUMELLO, D.; PAILO, S.; CHIARA, G.; CAPELOZZI, V. L.; BARBAS, C. S. V.; CHIARANDA, M.; GATTINONI, L. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. **European Respiratory Journal**. v. 22, suppl. 22, p. 48-56, 2003.

PERRONE, M. A. L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. F. D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do estado de São Paulo e do estado do Paraná com algumas espécies morfológicamente duvidosas. **Memórias do Instituto Butantan**. v 51, n. 1, p. 25-32, 1989.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v 50, n. 1, p. 93-96, 2004.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Méd. Brasil**. v. 47, n. 1, p.24-9, 2001.

PUGIN, J.; VERGHESE, G.; WIDMER, M. C.; MATTHAY, M. A. The alveolar sapce is the site of intense inflammatory and profibrotic reaction in the early phase of acute distress syndrome. **Critica Care Medicine**. v. 27, p. 304-312, 1999.

RIBEIRO, L. A.; AGOSTINI UTESCHER, C. L.; VIEIRA, S. L. P.; FENSTERSEIFER, S.; MUKUNO, H.; JORGE, M. T. Avaliação em camundongo da eficácia do antiveneno administrado no local da inoculação intramuscular do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 35, n.1, p. 23-27, 1993.

ROBATTO, F. M. Lung tissue mechanics In: MILIC-EMILI, J. **Applied Physiology in Respiratory Mechanics**. Milão: Springer, 1998. . p. 50-56.

ROCCO, P. R. M.; NEGRI, E. M.; KURTZ, P. M.; VASCONCELLOS, F. P.; SILVA, G. H.; CAPELOZZI, V. L.; ROMERO, P. V.; ZIN, W. S. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 164, p.1067-1071, 2001.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; ZAMUNÉR, S.R.; COGO, J. C.; BORJA-OLIVEIRA, JC. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**. v. 43, n. 6, p. 619-742, 2004.

ROMERO, P. V.; CAÑETE, C.; LOPEZ AGUILAR, J.; ROMERO, F. J. Elasticity, viscosity and plasticity in lung parenchyma. In: MILIC-EMILI, J. **Applied Physiology in Respiratory Mechanics**. Milão: Springer, 1998. p. 57-72.

ROWLEY, K. L.; MANTILLA, C. B.; SIECK, G. C. Respiratory muscle plasticity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v. 147, p. 235-251, 2005.

RUIZ DE TORRENT, R.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLERT, P.; MARUÑAK, S.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M. Actividades tóxicas y enzimáticas Del veneno de *Bothrops moojeni* de Argentina. **APPTLA**. v. 49, p. 177-183, 1999.

SALDIVA, P. H. N.; ZIN, W. A.; SANTOS, R. L. B.; EIDELMAN, D. H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **Journal of Applied Physiology**. v. 72, n. 1, p. 302-306, 1992.

SANTORO, M. L.; SILVA, M. C. C.S.; GONÇALVES, L. R. C.; SANTOS, S. M. A.; CARDOSO, D. F.; FERREIRA, I. L. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; MARTINS, I. S. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C, v.122, p.61-73, 1999.

SANTOS, R. M. M.; OLIVEIRA, L. C.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; LIMA, M. E.; SANTORO, M. M.; FORTES-DIAS, C. L. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from *Crotalus durissus terrificus* (the South American rattlesnake). **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1717, p. 27-33- 2005.

SCHUTTE, H.; LOHMEYER, J.; ROSSEAU, S.; ZIEGLER, S.; SIEBERT, C.; KIELISCH, H.; PRALLE, H.; GRIMMINGER, F.; MORR, H.; SEEGER, W. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. **European Respiratory Journal**. v. 9, p. 1858 – 1867, 1996.

SGARBI, L. P. S.; ILIAS, M.; MACHADO, T.; BARRAVIERA, B. Human envenomations due to snakebites in Marília, state of São Paulo, Brazil. A retrospective epidemiological study. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. v 1, n. 2, 1995.

SHARP, J. T.; JOHNSON, F. N.; GOLDBERG N. B.; LITH, P. V. Hysteresis and stress adaptation in the human respiratory system. **Journal of Applied Physiology**. v. 23, n. 4, p. 487-497, 1967.

SILVEIRA, K. S. O.; BOECHEM, N. T.; NASCIMENTO, S. M.; MURAKAMI, Y. L. B.; BARBOZA, A. P. B.; MELO, P. A.; CASTRO, P.; MORAES, V. L. G.; ROCCO, P. R. M.; ZIN, W. A. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v 139, p.167-177, 2004.

SU, X.; BAI, C.; HONG, Q.; ZHU, D.; HE, L.; WU, J.; DING, F.; FANG, X.; MATTHAY, M. A. Effect of continuous hemofiltration on hemodynamics, lung inflammation and pulmonary edema in a canine model of acute lung injury. **Intensive Care Medicine**. v. 29, p. 2034-2042, 2003.

TONG, Q.; ZHENG, L.; KANG, Q.; DODD-O, J.; LANGER, J.; LI, B.; WANG, D.; LI, D. Upregulation of hypoxia-induced mitogenic factor in bacterial lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **FEBS Letters**. v. 580, p. 2207-2215, 2006.

TOYAMA, M. H.; OLIVEIRA, D. G.; BERIAM, L. O. S.; NOVELLO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA₂ isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**. v. 41, p. 1033-1038, 2003.

VARANDA, E. A., GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARR AVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, p. 205-224, 1994.

VIEIRA, S. L. P.; UTESCHER, C. L. A.; RIBEIRO, L. A. JORGE, M. T. Determinação da dose letal 50% (DL50) do veneno padrão de *Crotalus durissus terrificus* inoculado por via intramuscular. **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**. Supl. 2, 1989.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. **Journal of the Formosan Medical Association**. V. 71, p. 394-400, 1072. In: DAMICO, D. C. S.; BUENO, L. G.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; NOVELLO, J. C. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. **Toxicon**.v. 46, p. 222-229, 2005.

WAGERS, S.; LUNDBLAD, L.; MORIYA, H. T.; BATES, J. H. T.; IRVIN, C. G. Nonlinearity of respiratory mechanics during bronchoconstriction in mice with airway inflammation. **Journal of Applied Physiology**. v. 92, p. 1802-1807, 2002.

WEST, J. B. **Fisiologia Respiratória**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2002.

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

ZÁMUNER, S. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**. v. 44, p. 259-271, 2004.

ZIN, W. A.; GOMES, R. F. M. Mechanical models of the respiratory system: linear models. p.87-94. In: MILIC-EMILI, J.; LUCANGELO, U.; PESENTI, A.; ZIN, W. A. **Basics of respiratory mechanics and artificial ventilation**. Milão: Springer, 1999.

ZIN, W. A.; ROCCO, P. R. M. Mecânica Respiratória Normal. In: AULER JR, J. O. C.; AMARAL, R. V. G. **Assistência Ventilatória Mecânica**. São Paulo: Atheneu, 1995, cap.1, p.3-39.

ZIN, W. A.; ROCCO, P. R. M. Movimentos Respiratórios e Mecânica Respiratória. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. cap. 44 - 45, p.503-525.

a. Anexos

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L057/2005/CEP, intitulado “*Análise das propriedades mecânicas do sistema respiratório, da histologia pulmonar e lavado broncoalveolar em modelo experimental de injúria pulmonar aguda induzida pelo veneno de serpente Bothrops moojeni*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Vicente F. de Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 06 de maio de 2005.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP