

MAIRA DE CASTRO LIMA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA TOXINA
TX3-4 DA ARANHA *PHONEUTRIA NIGRIVENTER* NA
ISQUEMIA CEREBRAL EM RATOS**



BELO HORIZONTE

2010

MAIRA DE CASTRO LIMA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA TOXINA
TX3-4 DA ARANHA PHONEUTRIA NIGRIVENTER NA
ISQUEMIA CEREBRAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, ICB-UFMG, como requisito parcial à obtenção do grau de doutor.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. André Ricardo Massensini
Co-Orientador: Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BELO HORIZONTE
2010

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Programa Institutos do Milênio 2005-2008. Instituto do Milênio para o desenvolvimento de fármacos baseados em toxinas peptídicas.

Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG – PRPq/UFMG

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Rafael e Imaculada,
aos meus irmãos,
Maurício, Marcelo e Marcus
e às minhas sobrinhas
Lívia e Larissa

... porque sem o amor e o apoio incondicional de cada um, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que abençoa meus sonhos e todos os dias me dá a chance de realizá-los.

Aos animais experimentais que perderam a própria vida para a geração de novos conhecimentos. Que o sacrifício de vocês não tenha sido em vão!

Ao meu orientador Prof. André Ricardo Massensini, meu pai científico, por ter me acompanhado por tantos anos e me ensinado tantas coisas. Seu voto de confiança foi o que tornou tudo possível.

Ao Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes por colocar toda sua brilhante inteligência a favor da educação e da ciência. Obrigada pelas grandes discussões científicas e filosóficas que recebemos no dia a dia do laboratório.

À Mariele, à Suellem e ao Dudu que me fizeram tão feliz ao longo desses anos de convivência e me ensinaram o verdadeiro sentido da vida.

À Dani, pela dedicação e competência na realização dos testes funcionais. Esse trabalho também é seu! E por sua adorável amizade.

À Luciana e à Patrícia, pela amizade que já se estende por alguns anos, pelo carinho e apoio.

Ao Daniel, meu primo, pelas horas intermináveis de conversas agradáveis. O mundo passou pelas nossas conversas.

Ao Guilherme, pelo empenho em aprender e gerar nossas rotinas de MATLAB.

Aos “*Lords NNC*”, pela ajuda em tudo o que foi necessário para a realização desse trabalho. Pela simples presença que tornou sempre melhor o nosso ambiente de trabalho.

Às “*Ladies NNC*”, pela amizade e pelo apoio. Por formarem um grupo de pessoas nobres que foram o meu apoio durante todos esses anos.

Ao Michel e à Diana, meu ponto de apoio em um país distante.

À Londres, essa cidade maravilhosa e ímpar, que me ensinou lições preciosas, que me mostrou o quanto o mundo é grande.

Ao Taquinho pela ajuda técnica nos trabalhos do laboratório.

Às minhas amigas de infância Camila, Fernanda, Renata Miranda e Renata Lacerda por terem me feito tão feliz em momentos de descanso. Por me mostrarem que amizades verdadeiras nunca morrem.

Aos meus padrinhos, Petrônio, Gorett e Leonor por serem exemplos de pessoas competentes profissionalmente e mais competentes ainda no serviço ao próximo.

A todos os meus familiares que entenderam minha ausência em inúmeros momentos e que torcem pelo meu sucesso profissional e pessoal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 205/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Investigação do efeito neuroprotetor de toxinas de aranha *P. Nigriventer* na isquemia cerebral em ratos**", que tem como responsável **André Ricardo Massensini**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 02/2008**.

Este certificado expira-se em **13/ 02 / 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 205/2007**, related to the project entitled "**Neuroprotetor effect of the *P. Nigriventer* spider toxin against cerebral ischemia in rats**", under the supervision of **André Ricardo Massensini**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 13, 2008**.

This certificate expires in **February 13, 2013**.

Belo Horizonte, 19 de Fevereiro de 2008.

Humberto A.M. Oliveira
PI **Prof. Humberto Pereira Oliveira**
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@orpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC _ artéria carótida comum

ACE _ artéria carótida externa

ACI _ artéria carótida interna

ACM _ artéria cerebral média

AMPA _ 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionate

AVE _ acidente vascular encefálico

Ca²⁺ _ íons cálcio

ECG _ eletrocardiograma

EEG _ eletroencefalograma

GE _ gradient-echo

ICV _ intracerebroventricular

NMDA _ N-methyl-D-aspartato

PAM _ pressão arterial média

RF _ radiofrequência

RM _ ressonância magnética

SE _ spin-echo

TE _ tempo de eco

TR _ tempo de repetição

CPE _ córtex parietal esquerdo

CPD _ córtex parietal direito

PBS _ phosphate buffered saline

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletrodos de registro de ECG.....	21
Figura 2. Animal experimental após cirurgia de implantação de cânula guia e de eletrodos de EEG e ECG.	23
Figura 3. Microinjeção de toxina ou PBS no ventrículo lateral esquerdo.	24
Figura 4. Registro de EEG do Córtex Parietal Esquerdo e Direito, ECG e PAM.	25
Figura 5. Registro de EEG durante oclusão da ACM.	28
Figura 6. Cérebro de animal perfundido com o corante Azul de Evans após oclusão da ACM.....	29
Figura 7. Visão ventral de cérebro de animal perfundido com o corante Vermelho Neutro após oclusão da ACM.....	29
Figura 8. Foto de animal durante o Teste do Passo em Falso	32
Figura 9. Foto de animal durante o Teste das Barras Paralelas.....	33
Figura 10. Protocolo de investigação do efeito neuroprotetor da toxina Tx3-4 na dose de 0,75µg/animal em diferentes tempos de injeção após o início da isquemia.	36
Figura 11. Imagem de ressonância magnética estrutural 24 horas após insulto isquêmico e contorno da área de lesão.....	38
Figura 12. Valores de frequência cardíaca antes e após injeção central da toxina Tx3-4.	41
Figura 13. Valores de pressão arterial média antes e após a injeção central da toxina Tx3-4.....	42
Figura 14. Energia total do EEG do hemisfério direito após injeção central da toxina Tx3-4.....	43
Figura 15. Energia total do EEG do hemisfério esquerdo após injeção central da toxina Tx3-4.....	44
Figura 16. Energia total do EEG do hemisfério direito e valores normalizados (Energia banda/Energia Total EEG) das bandas de frequência após injeção central da toxina Tx3-4.....	45
Figura 17. Energia total do EEG do hemisfério direito e valores normalizados (Energia banda/Energia Total EEG) das bandas de frequência após injeção central da toxina Tx3-4.....	46
Figura 18. Porcentagem de contatos das patas anteriores dos animais isquemiados com a parede do cilindro 7 dias após lesão.	49
Figura 19. Porcentagem de contatos das patas anteriores dos animais isquemiados com a parede do cilindro 14 dias após lesão.	50

Figura 20. Tempo (segundos) gasto para perceber a presença da fita adesiva na pata direita (contralateral à lesão).	51
Figura 21. Tempo (segundos) gasto para retirar a fita adesiva da pata direita (contralateral à lesão).....	52
Figura 22. Número de erros cometidos pelos animais isquemiados no teste do passo em falso 7 dias após lesão.	53
Figura 23. Número de erros cometidos pelos animais no teste do passo em falso.	54
Figura 24. Erros cometidos pelos animais isquemiados no teste das barras paralelas (valor em escala) 7 dias após lesão.	55
Figura 25. Erros cometidos pelos animais isquemiados no teste das barras paralelas (valor em escala) 14 dias após lesão.	56
Figura 26. Peso corporal dos animais isquemiados ao longo dos dias de experimento.	58
Figura 27. Registros de EEG dos animais dos grupos Sham e Isquemia injetados com toxina ou PBS.	59
Figura 28. Integridade do tecido neural após oclusão transitória da ACM.	60
Figura 29. Imagem de ressonância magnética estrutural, grupo Isquemia/PBS/2horas, 24 horas após lesão.	62
Figura 30. Imagem de ressonância magnética estrutural, grupo Isquemia/tox/2horas, 24 horas após lesão.....	63
Figura 31. Volume de infarto (mm ³) dos animais isquemiados tratados com toxina ou PBS 30 minutos após oclusão da ACM direita.	64
Figura 32. Volume de infarto (mm ³) dos animais isquemiados tratados com toxina ou PBS 2 horas após oclusão da ACM direita.	65
Figura 33. Teste de assimetria bilateral dos animais isquemiados tratados com toxina ou PBS ao longo das 5 semanas de experimento.	66
Figura 34. Peso corporal dos animais isquemiados ao longo das 5 semanas de experimento.....	67

RESUMO

Os acidentes vasculares encefálicos são a principal causa de morte e incapacidade funcional no Brasil e na América do Sul. A busca por uma droga neuroprotetora que evite a morte neuronal e conseqüente dano neurológico é intensa na comunidade científica. O objetivo desse estudo foi investigar o potencial neuroprotetor da toxina Tx3-4, antagonista de canais para cálcio voltagem dependente, em casos de isquemia cerebral em ratos. Foi investigado o efeito da injeção central da toxina através de registros eletroencefalográficos, eletrocardiográficos e de pressão arterial nas doses de 0,16 μ g; 0,32 μ g; 0,75 μ g e 1,5 μ g por animal. O modelo de isquemia cerebral focal e transitória utilizado foi o de oclusão da artéria cerebral média. Para investigação do efeito neuroprotetor da toxina foram utilizadas as doses 0,16 μ g; 0,32 μ g; 0,75 μ g por animal. Registros de EEG foram realizados para confirmar a interrupção do fluxo sanguíneo para o hemisfério submetido à isquemia. Testes sensoriais e motores foram utilizados para avaliar desempenho funcional dos animais. Imagens de ressonância magnética foram feitas para o acompanhamento do volume de infarto ao longo de 5 semanas. Foram testadas doses e tempos de tratamento diferentes. A injeção central da toxina não alterou os valores de freqüência cardíaca. No entanto, todas as doses causaram alterações significativas na pressão arterial e em parâmetros do EEG. Essas alterações não induziram sérias alterações fisiológicas ou morte dos animais. Todas as doses de toxina utilizadas no estudo de isquemia promoveram neuroproteção funcional e estrutural. Imagens de ressonância magnética confirmaram que a toxina é capaz de proteger o tecido neural quando injetada 30 minutos e 2 horas após o início da lesão isquêmica. A

toxina Tx3-4 apresenta baixa toxicidade, promove neuroproteção funcional e estrutural. Essa proteção é mantida a longo prazo e obtida com a toxina sendo injetada 2 horas após o início de lesão isquêmica.

ABSTRACT

Stroke is the leading cause of death and disability in adults in South America and Brazil. Lots of research groups in the world try to find a neuroprotective drug that avoid neuronal death and consequent functional incapacity after stroke. The main objective of this study was investigating the neuroprotective effect of the toxin Tx3-4, antagonist of calcium channel voltage dependent, after cerebral ischemia in rats.

The effect of central injection of toxin was studied using electroencephalographic, electrocardiographic and arterial pressure records to the doses 0.16 μ g; 0.32 μ g; 0.75 μ g e 1.5 μ g per animal. The focal and transient experimental ischemic model used was the middle cerebral artery occlusion (MCAo). Doses 0.16 μ g; 0.32 μ g; 0.75 μ g were used to investigate the neuroprotective effect of the toxin Tx3-4 after cerebral ischemia in rats. Electroencephalographic records showed the interruption of blood to the left hemisphere after MCA left occlusion. Sensorial and motor tests were done to evaluating functional status of the animals after lesion. Magnetic resonance images were used to assessing infarct volume and functional status for 5 weeks. Different doses and time treatment were evaluated.

Central injection of toxin did not change the heart rate of the animals. However, all studied doses changed mean arterial pressure and total energy of EEG, though these changes have not leaded the rats to death. All tested doses could protect cerebral tissue of death. Functional and structural protections were seen in all doses. Magnetic resonance images showed strutuctural protection by Tx3-4 injected 30 minutes e 2 hours after the beginning of

ischemia. Tx3-4 toxin showed low toxicity, functional and structural neuroprotective effect injected 30 minutes or 2 hours after beginning of cerebral ischemia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PATOFISIOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL	1
1.2. NEUROPROTEÇÃO FARMACOLÓGICA	4
1.3. NEUROPROTEÇÃO E PEPTÍDEOS DE VENENOS	7
1.4. ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL	10
1.5. IMAGEM DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	13
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. EFEITOS DA INJEÇÃO CENTRAL DA TOXINA TX3-4 SOBRE PARÂMETROS DO EEG, DO ECG E DO REGISTRO DA PAM.	19
3.1.1. Animais	19
3.1.2. Grupos Experimentais	19
3.1.3. Confecção de cânula-guia, agulha de implantação e agulha injetora	19
3.1.4. Confecção de Eletrodo para Registro de ECG	20
3.1.5. Confecção de Eletrodo para Registro de EEG	21
3.1.6. Cirurgia de Implantação de Cânula Guia e de Eletrodos para Registro de EEG e de ECG	21
3.1.7. Canulação da Artéria Femoral	23
3.1.8. Registro dos Efeitos da toxina Tx3-4 sobre as ondas do EEG e do ECG e sobre a PAM	24
3.2. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA TOXINA TX3-4 NAS DOSES DE 0,16µG, 0,32µG E 0,75µG POR ANIMAL	26
3.2.1. Grupos Experimentais	26
3.2.2. Cuidados Pré-operatórios	26
3.2.3. Procedimentos Cirúrgicos	26
3.2.4. Cuidados Pós-operatórios	30
3.2.5. Testes Funcionais	30
3.2.6. Teste do Cilindro	30
3.2.7. Assimetria Bilateral	31
3.2.8. Passo em falso	31
3.2.9. Barras Paralelas	32
3.2.10. Medida do Volume de Infarto	34
3.3. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA TOXINA TX3-4 NA DOSE DE 0,75µG/ANIMAL. EM DIFERENTES TEMPOS DE INJEÇÃO APÓS O INÍCIO DA ISQUEMIA.	35
3.3.1. Animais	35
3.3.2. Grupos Experimentais	35
3.3.3. Protocolo Experimental	35
3.3.4. Imagens de Ressonância Magnética Estrutural	37
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. Introdução

Os acidentes vasculares encefálicos (AVEs) são clinicamente definidos como uma síndrome neurológica caracterizada pela rápida progressão dos sintomas e sinais de perda de função neuronal focal resultante de alteração isquêmica ou hemorrágica (Feuerstein and Wang 2000). Ocorrem como resultado de hemorragia ou de isquemia no tecido encefálico. Hemorragia ocorre quando uma artéria perde sua elasticidade e se rompe, causando um extravasamento de sangue dentro ou ao redor do tecido encefálico. Isquemia, por outro lado, refere-se a uma restrição do suprimento sangüíneo para o encéfalo, conseqüente de um bloqueio, determinado pela presença de trombo ou êmbolo nas artérias que irrigam determinada área (Brown 2002; Nudo and Nelson 2003).

AVEs são a principal causa de morte e incapacidade funcional entre adultos na América do Sul (Saposnik and Del Brutto 2003). Nos Estados Unidos, são registrados 750.000 novos casos, o que corresponde a 1 AVE a cada 45 segundos. Cerca de 25% desses indivíduos morrem e 75% deles sobrevivem. Dentre os sobreviventes, de 50 a 75% recuperam alguma independência funcional, mas cerca de 15 a 30% desses permanecem completamente incapacitados (Fisher 2008).

1.1. Patofisiologia da Isquemia Cerebral

A isquemia corresponde de 61% a 81% dos casos de AVE, onde a maioria resulta de infartos da circulação anterior que envolve as artérias cerebrais anterior e média (Winstein, Merians, and Sullivan 1999). A oclusão da

artéria cerebral média (ACM) representa a forma mais prevalente de AVE e corresponde à aproximadamente 60% das isquemias em humanos (Modo et al. 2000). Mais do que qualquer outro órgão do corpo, a integridade cerebral depende de um contínuo fornecimento de oxigênio e glicose através do sangue para suprir as necessidades energéticas do tecido. Redução severa ou completa do fluxo sanguíneo promove déficits funcionais e bioquímicos instantâneos e irreversíveis em neurônios (Hossmann 1998). Um breve período de privação de energia induz plasticidade sináptica patológica que pode contribuir para a morte de neurônios no hipocampo e no núcleo estriado após isquemia global e para a conversão da área de penumbra isquêmica no centro do infarto em casos de isquemia focal (Calabresi et al. 2003). Os processos de isquemia e reperfusão envolvem múltiplos mecanismos letais (perda de integridade de membrana no transporte de íons, ativação proteolítica, indução de apoptose, incapacidade de monitorar os próprios mecanismos de sobrevivência celular) que levam a morte neuronal pós-isquemia (White et al. 2000). Os íons cálcio (Ca^{2+}) e o neurotransmissor glutamato, tão importantes em inúmeras funções celulares, estão envolvidos no processo de morte celular após evento isquêmico (Sattler and Tymianski 2000).

Os íons Ca^{2+} são mensageiros intracelulares onipresentes que desempenham inúmeras funções celulares, tais como: controle de crescimento e diferenciação, excitabilidade de membrana, excitose e plasticidade sináptica. Os neurônios possuem mecanismos homeostáticos especializados para manterem um rigoroso controle sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} . Aumentos pequenos ou localizados desses íons no meio intracelular podem

disparar eventos fisiológicos tais como ativação de uma enzima ou de um canal iônico (Sattler and Tymianski 2000; Arundine and Tymianski 2003; Arundine and Tymianski 2004).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (Danbolt 2001). Respostas pós-sinápticas ocorrem através de receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Há três tipos de receptores de glutamato ionotrópicos: N-methyl-D-aspartato (NMDA), 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) proprionato (AMPA) e kainato. A ativação desses receptores conduz a uma permeabilidade ao sódio, potássio e/ou cálcio. Os receptores metabotrópicos agem através da proteína G e causam mobilização dos estoques de Ca^{2+} intracelulares (Sattler and Tymianski 2000; Arundine and Tymianski 2003; Arundine and Tymianski 2004; Meldrum 2000). O glutamato é liberado de vesículas no terminal pré-sináptico por mecanismos dependentes de Ca^{2+} . Após a entrada de Ca^{2+} para o meio intracelular via canais sensíveis à voltagem, vesículas sinápticas se ligam às zonas ativas na membrana celular para conseqüente exocitose de seu conteúdo (Meldrum 2000).

Lucas e Newhouse, em 1957, descobriram que injeções de L-glutamato destruíam camadas de células da retina de camundongos, mostrando que o glutamato poderia atuar como uma neurotoxina (Lucas 1988). Aproximadamente duas décadas depois, Olney mostrou que o kainato, um composto estruturalmente relacionado ao glutamato, produzia lesões cerebrais em animais imaturos que não possuíam uma barreira hematoencefálica madura (McGeer and McGeer 1978; McGeer, McGeer, and Singh 1978). Em

1969, Olney cunhou o termo excitotoxicidade para definir degeneração de neurônios mediada por aminoácidos excitatórios (Olney 1969). Lesão neuronal induzida por isquemia após oclusão de artérias cerebrais pode ser mediada por ativação excessiva de receptores de glutamato (Nishizawa 2001). A toxicidade do glutamato é primariamente dependente de Ca^{2+} . Massiva ativação dos receptores de glutamato pode resultar em um grande aumento de Ca^{2+} citoplasmático (Mody and Macdonald 1995). Excessiva concentração intracelular de Ca^{2+} , além da capacidade dos mecanismos regulatórios dos neurônios para manterem em estreitas concentrações a quantidade desses íons, pode inapropriadamente ativar processos que levam à morte celular (Arundine and Tymianski 2003). Duas hipóteses tentam explicar a relação entre excesso de Ca^{2+} no citoplasma celular e toxicidade. A “Hipótese do Ca^{2+} ” defende a idéia de que a neurodegeneração é simplesmente uma função da quantidade de Ca^{2+} que entra na célula em grandes quantidades. Enquanto a “Hipótese da especificidade da fonte” apóia o argumento de que a morte celular é desencadeada pelo Ca^{2+} que entra na célula via canal associado ao receptor NMDA (Sattler and Tymianski 2000; Arundine and Tymianski 2003; Arundine and Tymianski 2004). A apoptose celular ou morte celular programada, também é desencadeada pela hiperestimulação dos receptores de glutamato (Love 2003; Charriaut-Marlangue et al. 1998).

1.2. Neuroproteção Farmacológica

A maioria dos eventos que culmina com a morte celular acontece no centro do infarto, área diretamente privada de sangue onde não há recursos para se impedir a necrose. No entanto, a área em volta do centro do infarto,

denominada penumbra isquêmica, é uma zona de isquemia cerebral incompleta, na qual os neurônios estão funcionalmente inativos, mas ainda viáveis. É uma zona dependente de tempo, no qual dentro de minutos, horas ou dias o parênquima cerebral vai sendo destruído como consequência de uma complexa sucessão de alterações bioquímicas. Farmacologicamente, há pouco o que se fazer pelo centro do infarto, por isto, a área de penumbra é o grande alvo para a intervenção neuroprotetora (Castillo et al. 2003).

Tem sido bem documentado que a abrupta privação de oxigênio e glicose para tecidos neurais desencadeia uma série de cascatas patológicas conduzindo à morte celular. Excessiva ativação de receptores de glutamato, acúmulo de cálcio no meio intracelular, recrutamento anormal de células inflamatórias, excessiva produção de radicais livres e início de apoptose patológica são algumas das vias identificadas que desempenham papel fundamental no dano isquêmico, especialmente na área de penumbra. Assim, se um desses processos puder ser interrompido na propagação dessas cascatas, uma região do tecido cerebral poderá ser protegida (Castillo et al. 2003; Cheng, Al Khoury, and Zivin 2004). Estudos experimentais demonstrando que o neurônio pode não morrer imediatamente após lesão isquêmica tem encorajado o desenvolvimento de agentes neuroprotetores. Vários antagonistas de canais para Ca^{2+} têm sido testados por sua habilidade de neuroproteção, através da melhora da circulação sanguínea cerebral ou inibição do aumento no influxo de Ca^{2+} induzido por excessiva liberação de glutamato (Kobayashi and Mori 1998). A hiperexcitação causada por ativação dos receptores de glutamato, acoplada à sobrecarga de Ca^{2+} , pode ser

prevenida ou modulada pelo uso de antagonistas do receptor de glutamato e de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Miljanich and Ramachandran 1995; Yenari et al. 1996; Oneill et al. 1997; Tamura et al. 2001; Tanaka et al. 2002; Kobayashi and Mori 1998).

SNX-111, um antagonista sintético de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo N, derivado de um ω -conopeptídeo (ω – conotoxina MVIIA) do veneno do caramujo *Conus Magnus*, tem se mostrado ser um agente neuroprotetor em modelos experimentais de isquemia cerebral focal e global. Em estudo realizado com ratos Sprague-Dawley submetidos à oclusão transitória da artéria cerebral média por 105 minutos, a droga foi administrada via intravenosa (5mg/Kg), 30 minutos após início da reperfusão. A análise de imagens obtidas através de ressonância magnética 30, 90 minutos e 24 horas após oclusão mostrou redução no volume de infarto dos animais tratados (Yenari et al. 1996).

NS-7, um bloqueador sintético inespecífico dos canais para Ca^{2+} e Na^+ , tem se mostrado um agente neuroprotetor eficiente. Por meio de estudos de isquemia experimental, esta droga tem se revelado capaz de reduzir o volume de infarto e minimizar seqüelas motoras e cognitivas em animais tratados (Tamura et al. 2001; Tanaka et al. 2002).

Embora inúmeras drogas neuroprotetoras, bloqueadores de canais para cálcio sensíveis à voltagem e antagonistas de glutamato, apresentem sucesso em estudos experimentais, elas falham em estudos clínicos. Uma das hipóteses para esse fracasso é o fato de que os estudos experimentais são

realizados sob condições muito controladas (modelo experimental, tempo de lesão, momento de administração da droga), sendo que as mesmas não podem ser conseguidas na clínica (Hunter et al. 2000; Corbett and Nurse 1998; Castillo et al. 2003; Cheng, Al Khoury, and Zivin 2004).

1.3. Neuroproteção e Peptídeos de Venenos

Recentemente, tem se investigado muito sobre peptídeos de venenos, devido ao exponencial aumento de evidências farmacológicas de sua potencial aplicação em vários tipos de desordens neurológicas agudas e crônicas. A seletividade desses peptídeos de venenos por subtipos de canais iônicos e receptores é a característica fundamental para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de uma ampla variedade de desordens neurológicas. O veneno de escorpiões, aranhas, caramujos, cobras e diversos animais peçonhentos são investigados devido á sua constituição heterogênea e rica em inúmeras proteínas, enzimas, polipeptídeos, ácido nucléico, aminoácidos livres, monoaminas, sais inorgânicos e toxinas poliaminas (Rajendra, Armugam, and Jeyaseelan 2004).

As denominadas ω -conotoxinas derivadas de caramujos marinhos predadores são inúmeras e agem sob diferentes canais para Ca^{+2} . Muitas substâncias foram sintetizadas em laboratório como réplica dessas conotoxinas e são utilizadas em inúmeros estudos que envolvem canais para Ca^{+2} . As toxinas ω – conotoxina GVIA, ω – conotoxina MVIIA e ω – conotoxina MVIIC também foram descritas como agentes neuroprotetores em casos de isquemia cerebral (Olivera et al. 1994; Rajendra, Armugam, and Jeyaseelan 2004).

Em casos de isquemia cerebral, toxinas do veneno da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer* podem ser estudadas como potenciais agentes neuroprotetores (Rajendra, Armugam, and Jeyaseelan 2004). Essa aranha, conhecida como “armadeira”, é extremamente agressiva e possui hábitos noturnos. Caça e come uma vasta variedade de animais incluindo muitas espécies de insetos, outras aranhas e pequenos roedores. Ela não constrói teias e seu sucesso como predadora é em parte explicado pela diversidade de potentes toxinas presentes em seu veneno. Sua picada causa dor intensa e irradiada, além de vários sintomas tóxicos, caracterizados por câimbras, tremores, convulsões tônicas, paralisias espásticas, priapismo, arritmias, distúrbios visuais e sudorese fria (Lucas 1988). Em ratos anestesiados, administração intravenosa do veneno evocou uma resposta bifásica sobre a pressão arterial média, caracterizada por uma breve hipotensão, seguida por uma longa e sustentada hipertensão por longos períodos (Costa et al. 1996). Hipertensão também foi observada em coelhos anestesiados que receberam o veneno via injeção intracerebroventricular e em grandes doses via intravenosa (Estate et al. 2000). Em preparação de coração isolado de rato, o veneno foi capaz de ativar fibras nervosas autonômicas (Costa et al. 1998).

Em 1991, o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* foi dividido em frações de acordo com seu peso molecular: PhTx1, PhTx2, PhTx3, PhTx4 e PM (Rezende et al. 1991). Em 1993, a fração PhTx3, foi separada em 6 neurotoxinas diferentes: Tx3-1, Tx3-2, Tx3-3, Tx3-4, Tx3-5 e Tx3-6 (Cordeiro et al. 1993). Desde então, inúmeros trabalhos foram publicados a cerca da ação dessas toxinas sobre canais iônicos, sobretudo canais para Ca^{2+} . A toxina Tx3-

3 mostrou-se capaz de bloquear a liberação de glutamato dependente de Ca^{2+} (Prado et al. 1996), eficaz em inibir canais para Ca^{2+} acoplados à exocitose (Guatimosim et al. 1997), bloqueou o influxo de Ca^{2+} induzido pela titystoxina em sinaptosomas (Miranda et al. 1998), inibiu a ativação de canais para Ca^{2+} neuronais ativados por alta voltagem (Leao et al. 2000). Outros estudos demonstraram que a toxina Tx3-6 bloqueou a liberação de Ca^{2+} intracelular induzida por potássio e a liberação de glutamato dependente de Ca^{2+} em sinaptosomas (Vieira et al. 2003) e inibiu a ativação de canais para Ca^{2+} ativados por alta voltagem avaliados através de patch-clamp celular (Vieira et al. 2005).

A toxina Tx3-4 (anteriormente denominada ω -phonetoxin-IIA), um peptídeo com 76 resíduos de aminoácidos, 14 Cys formas, 7 pontes dissulfeto e massa molecular de 8362,7 Da, foi capaz de bloquear canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo N e L em neurônios da raiz dorsal de ratos e em células β pancreáticas (Cassola et al. 1998). Esse mesmo peptídeo foi capaz de diminuir a liberação evocada de glutamato em sinaptosomas através da inibição da entrada de Ca^{2+} via canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Reis et al. 1999). Estudo utilizando a metodologia de patch-clamp mostrou que esse peptídeo se liga predominantemente aos canais para cálcio do tipo $\text{Ca}_v2.1$ e $\text{Ca}_v2.2$ (Dos Santos et al. 2002). Esse peptídeo também se mostrou capaz de bloquear a neurotransmissão na junção neuromuscular de sapos atuando sobre o terminal pré-sináptico (Troncone et al. 2003) e bloquear a exocitose induzida por KCL em sinaptosomas (de Castro et al. 2008).

Mediante evidências de que toxinas da fração PhTx3 atuam sobre a liberação de glutamato através do bloqueio de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem, essa fração foi investigada sob a hipótese de ser um agente neuroprotetor. Tal hipótese foi testada utilizando-se fatias de cérebros da região hipocampal e células SN56. As fatias foram privadas de oxigênio e glicose por 10 minutos, sendo que as fatias tratadas foram expostas à ação da fração de toxinas 30 minutos antes do insulto ou durante os 10 minutos de isquemia. Posteriormente, as células foram avaliadas com um marcador que diferenciava as células vivas das mortas e analisadas por microscopia confocal. A morte celular, nas fatias expostas à PhTx3, foi reduzida em 80% (Pinheiro et al. 2006). Em estudos posteriores, realizados utilizando-se a mesma metodologia, a toxina Tx3-4 mostrou-se eficaz em reduzir o número de células mortas em 86% quando comparada a fatias não tratadas com a toxina, mesmo quando injetada 60 minutos após a isquemia (Pinheiro et al. 2009). Mediante o sucesso da toxina Tx3-4 como agente neuroprotetor *in vitro*, estudos de isquemia cerebral experimental *in vivo* são encorajados.

1.4. Isquemia Cerebral Experimental

Durante os últimos anos, houve uma explosão no conhecimento sobre lesão neurológica e recuperação. A pesquisa animal foi a grande responsável por esse avanço, uma vez que importantes achados se originaram de pesquisas com células isoladas *in vitro* e também estudos comportamentais complexos envolvendo animais (Turkstra, Holland, and Bays 2003). No entanto, para que se possa chegar a grandes resultados, um modelo de isquemia cerebral experimental deve ser relevante para a situação clínica, fácil de ser

executado, altamente reprodutível e deve evitar efeitos colaterais. Além disso, a interpretação das informações experimentais sobre isquemia cerebral requer íntimo conhecimento dos modelos utilizados e das condições em que os dados foram coletados. As três maiores categorias de redução de fluxo sanguíneo, em modelos experimentais são a isquemia global transitória, a isquemia focal transitória ou permanente e o microembolismo. A isquemia global transitória é obtida através da indução de parada cardíaca ou oclusão das quatro artérias que irrigam o encéfalo. O modelo de microembolismo mais comum é a injeção de micro esferas no interior da artéria carótida (Hossmann 1998).

Modelos experimentais de isquemia têm sido desenvolvidos em muitas espécies animais (camundongos, ratos, gatos, primatas) usando-se numerosos procedimentos. Estudos têm surgido a favor de modelos de isquemia focal em animais de grande e pequeno porte, com preferência pela oclusão da ACM (Feuerstein and Wang 2000). Em ratos, a ACM irriga o córtex motor primário e sensorial (Paxinos 1995).

O modelo experimental de oclusão da ACM em ratos além de ser o mais utilizado para estudos de lesão isquêmica e para teste da eficácia de drogas neuroprotetoras (Reglodi, Tamas, and Lengvari 2003), é também o mais relevante clinicamente, uma vez que a maioria das isquemias cerebrais em humanos envolve o território dessa artéria (Hossmann 1998). Como permite a sobrevivência do animal por longos períodos, esse modelo é utilizado em vários tipos de estudos, inclusive para investigar a eficácia de determinados testes em detectar melhoras funcionais (Riek-Burchardt et al. 2004), o efeito do treinamento motor na recuperação de funções (Ding et al. 2004b; Bland et al.

2001), aprendizado motor após lesão (Ding et al. 2002a; Ding et al. 2002b; Winstein, Merians, and Sullivan 1999) e efeito neuroprotetor do exercício antes e após isquemia (Lee et al. 2003; Ding et al. 2004b). Dentre as várias técnicas cirúrgicas que resultam em oclusão permanente ou transitória dessa artéria, aquela que não utiliza a craniotomia é uma das mais eficientes (Longa et al. 1989; Memezawa, Smith, and Siesjo 1992). Nos últimos anos, a exposição cirúrgica da ACM tem sido substituída pela introdução de um filamento intraluminal via artéria carótida externa (Hossmann 1998). A cirurgia sem craniotomia não altera a pressão intracraniana e é considerada uma técnica simples e pouco invasiva (Longa et al. 1989; Memezawa, Smith, and Siesjo 1992). O tempo de isquemia tolerado pelo cérebro depende, entre outros fatores, do tipo de oclusão da artéria (parcial ou completa), do conteúdo energético, da velocidade de consumo de energia, da temperatura, do grau de atividade funcional e da ausência ou presença de anestésicos e outras drogas (Hossmann 1998). Em ratos anestesiados, a oclusão da ACM por 60 minutos foi suficiente para que 100% dos animais apresentassem infarto cortical e o tamanho do infarto aumentou progressivamente com o aumento do tempo de oclusão (Memezawa, Smith, and Siesjo 1992).

São inúmeros os testes funcionais para avaliação de déficits motores e sensoriais em ratos submetidos à oclusão transitória e permanente da ACM. Esses testes avaliam o desempenho do animal em vários aspectos, como alterações posturais, distúrbios de marcha, atividade exploratória espontânea, disfunções sensoriais e motoras (Hunter et al. 2000; Zausinger et al. 2000; Zhang et al. 2000; Ashioti et al. 2007; Modo et al. 2000; Ashioti et al. 2007;

Reglodi, Tamas, and Lengvari 2003). O teste de assimetria bilateral é eficiente em avaliar déficit sensorial (Ashioti et al. 2007). Para avaliação do desempenho motor do animal, o teste do passo em falso e o das barras paralelas são muito utilizados. Enquanto o passo em falso avalia a coordenação motora das patas anteriores, o teste das barras paralelas mensura a habilidade das patas posteriores. Esses dois testes são bem descritos, com parâmetros bem definidos para a classificação do animal e apresentam grande reprodutividade de resultados entre os avaliadores (Ashioti et al. 2007; Modo et al. 2000; Ding et al. 2002b).

1.5. Imagem de Ressonância Magnética

A Ressonância Magnética (RM) é uma técnica de aquisição de imagens que se utiliza das propriedades magnéticas intrínsecas dos átomos de hidrogênio dos tecidos do corpo humano para formar imagens diagnósticas. Objetiva obter e integrar informações anatômicas e funcionais, permitindo um estudo não invasivo *in vivo* dos tecidos em estados fisiológicos e patológicos. O desenvolvimento desta complexa técnica recebeu contribuições de pesquisadores das mais diversas áreas de conhecimento (Mesquita 2004).

As imagens de RM baseiam-se nas propriedades magnéticas dos núcleos dos átomos de hidrogênio, que são os átomos mais abundantes do corpo humano, em função da quantidade de água presente nos organismos vivos. Enquanto cada molécula de água possui dois átomos de hidrogênio, cada átomo de hidrogênio possui apenas um próton em seu núcleo. Os prótons apresentam movimentos de rotação e de precessão ao redor de seu próprio eixo, agindo como pequenos magnetos com seu próprio dipolo. Normalmente,

os prótons são direcionados aleatoriamente, sem nenhum dipolo resultante. Entretanto, quando expostos a um campo magnético, os eixos de rotação desses átomos, denominados *spins*, tendem a se alinhar com esse campo. Estatisticamente, uma parte ligeiramente maior desses prótons se alinha no mesmo sentido do campo magnético principal (estado de baixa energia), enquanto uma parte menor se alinha no sentido oposto (estado de alta energia). Assim, a resultante é um pequeno vetor com componente principal na mesma direção e sentido que o campo magnético principal. A frequência de precessão desses prótons é diretamente proporcional à magnitude do campo magnético principal, e essa frequência é conhecida como frequência de Larmor (McRobbie et al. 2007).

Quando um segundo campo magnético formado por um pulso de radiofrequência (RF) é aplicado ao tecido, os prótons saem do seu estado de alinhamento em relação ao campo magnético principal e adquirem um novo alinhamento de acordo com esse novo campo, além de iniciarem o movimento de rotação ao redor de seus próprios eixos. Nesse estado de equilíbrio mantido pelo pulso de RF, esses prótons acumulam energia. Quando o pulso de RF é desligado, os prótons voltam ao seu estado de alinhamento com o campo magnético principal, liberando a energia que acumularam na forma de RF.

No processo de realinhamento com o campo magnético principal, dois processos de relaxamento podem ser medidos, sendo caracterizados pelas constantes de tempo T1 e T2. A constante de tempo T1 refere-se ao tempo que os prótons levam para voltar ao seu estado de equilíbrio com o campo magnético original. E também chamado de relaxamento longitudinal (ou *spin-lattice*). Já a constante de tempo T2 refere-se ao tempo gasto para que ocorra

a defasagem no movimento de precessão dos prótons, ou a perda de coerência de fase. É também conhecido como relaxamento transversal (ou *spin-spin*). Apesar dos efeitos de T1 e T2 ocorrerem simultaneamente no registro, os prótons apresentam tempos de relaxamento longitudinal e transversal variados, dependendo do tecido do qual fazem parte. Esta diferença pode ser melhor ponderada para T1 ou T2 dependendo da metodologia utilizada para avaliar o contraste nos tecidos. Assim, o processo de formação de imagens é resultante de uma decodificação espacial, onde a aplicação controlada de campos magnéticos nos três eixos ortogonais sobre um tecido induz grupos de *spins* com frequências ligeiramente diferentes. O sinal liberado por estes e então analisado através de transformada rápida de Fourier (FFT), decompondo os componentes de frequência e fase presentes no sinal.

Por sua vez, a aplicação de campos magnéticos nos eixos ortogonais representa as diferentes seqüências de imagens. As seqüências mais utilizadas são as de *spin-echo* e *gradient-echo*. Enquanto as técnicas de SE usam os pulsos de RF para manipular as propriedades dos *spins* e liberar energia, as de GE usam gradientes magnéticos com essa mesma finalidade. A liberação de energia pelos *spins* é conhecida como decaimento de indução livre (*free induction decay*).

Referente às técnicas utilizadas para avaliar o contraste nos tecidos (ponderado para T1 ou T2), duas constantes de tempo são importantes. A primeira delas é o tempo de repetição, ou TR, que se refere ao intervalo de tempo entre duas estimulações consecutivas de um mesmo grupo de prótons. A segunda é o tempo de eco, ou TE, que se refere ao tempo entre a estimulação de um grupo de prótons e a medida do FID. A variação destas 2

constantes nos permite obter imagens com diferentes tipos de contraste. Assim, TR longos propiciam um completo retorno de um grupo de spins ao seu estado de equilíbrio, estando susceptíveis a uma nova estimulação e resultando em uma maior intensidade do sinal. Por outro lado, TE longos resultam em menor intensidade do sinal, já que a maior parte deste já foi emitido pelos prótons antes do tempo de aquisição do FID. Desta forma, podemos formar imagens a partir de 3 tipos básicos de contraste de RM: imagens mais sensíveis a T1, que possuem TR e TE curtos; imagens mais sensíveis a T2, que possuem TR e TE longos; e imagens de densidade de prótons, que possuem TR longo e TE curto (McRobbie et al. 2007).

Imagens de ressonância magnética têm sido usadas em inúmeros trabalhos que envolvem lesão isquêmica cerebral. Esses estudos incluem análise de processos inflamatórios pós-lesão (Wiert et al. 2007), monitoramento de lesão por reperfusão (Fau et al. 2007), análise da penumbra isquêmica (Lovblad et al. 2003), estudos comparativos entre potenciais agentes neuroprotetores (Marshall, Green, and Ridley 2003), caracterização do tecido neural após lesão isquêmica aguda (Gass et al. 2004). Essa moderna técnica de imagen permite que o dano isquêmico seja descrito e analisado ao longo do tempo, permitindo acompanhamento detalhado da evolução da lesão cerebral e status funcional (Jiang et al. 1997; Neumann-Haefelin et al. 2000).

2. Justificativa e Objetivos

Muitos grupos de pesquisa buscam uma droga que possa conferir proteção ao tecido neural em casos de isquemia cerebral. No entanto, apesar de todos os esforços dispensados a essa tarefa, ainda não existe um agente neuroprotetor eficiente para o uso clínico. Tendo em vista a rica fonte de peptídeos presentes no veneno de animais da fauna brasileira, é de extrema importância investigar o papel desses em conferir neuroproteção em diversas injúrias neurológicas. A grande motivação desse estudo é investigar o potencial terapêutico da toxina Tx3-4 em proteger neurônios da morte em casos de isquemia cerebral.

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo desse estudo é investigar se a toxina Tx3-4, proveniente do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, exerce ação neuroprotetora sobre função motora e sensorial e sobre o volume de infarto de ratos Wistar machos submetidos à isquemia cerebral.

2.2. Objetivos Específicos

Verificar os efeitos da injeção central da toxina Tx3-4 sobre o registro do eletroencefalograma (EEG), do eletrocardiograma (ECG) e sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos.

Testar um método indireto de detecção de interrupção do fluxo sanguíneo para o tecido neural irrigado pela artéria cerebral média dos animais, através do registro de EEG.

Estudar o efeito da injeção central de diferentes doses da toxina Tx3-4 sobre as alterações eletroencefalográficas induzidas pela oclusão da artéria cerebral média, seguida de sua reperfusão, e acompanhar essas mudanças por até 14 dias após a indução do processo isquêmico.

Avaliar o desempenho funcional (motor e sensorial) dos animais após lesão isquêmica e/ou injeção central da toxina.

Acompanhar a evolução do volume de infarto induzido pelo processo isquêmico até a quinta semana após a indução do mesmo, através de imagens de ressonância magnética estrutural.

3. Materiais e Métodos

3.1. Efeitos da injeção central da toxina Tx3-4 sobre parâmetros do EEG, do ECG e do registro da PAM.

3.1.1. . Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 250 e 300 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos em um ciclo de 14 horas (6:00 às 20:00) claro e 10 horas escuro, com livre acesso à água e à comida, a uma temperatura controlada entre 22 e 23°C. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.1.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=8 cada), de acordo com a dose de toxina microinjetada (0,16µg/animal; 0,32µg/animal; 0,75µg/animal; 1,5µg/animal) e grupo controle (PBS).

3.1.3. Confeção de cânula-guia, agulha de implantação e agulha injetora

A cânula-guia i.c.v. foi confeccionada utilizando-se agulha 25x6, cortada com 13 mm de comprimento e, posteriormente, ajustada até o comprimento de 10 mm, através do processo de eletrocorrosão. Depois de implantada sobre o ventrículo esquerdo, a cânula permaneceu obstruída até o dia da microinjeção com agulha G30, num arranjo que denominamos mandril.

Para a confecção da agulha de implantação, foram utilizadas duas agulhas: a G30, que se encaixa na cânula-guia, e a 25x6, usada para fixar a

agulha de implantação na torre do estereotáxico. Depois de cortada, a agulha G30 foi introduzida parcialmente dentro da agulha 25x6 e colada nessa posição, de forma que a extremidade livre da G30 ficou com 10 mm, o que corresponde ao comprimento da cânula-guia.

A agulha injetora foi confeccionada a partir da agulha G30, para seringa anestésica odontológica, cortada com 15 mm de comprimento e, posteriormente ajustada, através de processo de eletrocorrosão, a 13 mm. Assim, no momento da injeção, ao ser introduzida na cânula-guia, a extremidade da injetora permaneceu 3 mm abaixo da extremidade da cânula, correspondendo ao sistema ventricular, de acordo com as coordenadas utilizadas.

3.1.4. Confeção de Eletrodo para Registro de ECG

Os eletrodos para registro do ECG, mostrados na figura 1, foram confeccionados utilizando-se um fio AWG 26 (Eletrônica General Ltda., São Paulo, Brasil). Os fios foram desencapados em seus 10cm iniciais e os filamentos de cobre ficaram expostos. Esses filamentos foram divididos em dois feixes, enrolados entre si e em seguida posicionados para formar uma argola. Os filamentos de cobre que restaram da formação da argola foram cobertos com isolante termoretrátil. Em seguida, os filamentos de cobre (da argola) foram recobertos por solda comum de estanho.

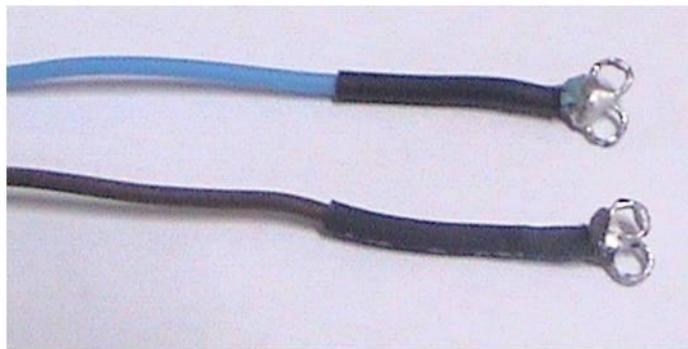


Figura 1. Eletrodos de registro de ECG.

Eletrodos de registro de ECG foram confeccionados com fios AWG 26. Os filamentos de cobre do interior do fio foram expostos e em seguida enrolados para assumir a forma de uma argola. Os filamentos restantes foram cobertos com isolante termorretrátil (cobertura preta do fio logo abaixo da argola formada pelos filamentos de cobre). A argola de filamentos de cobre foi coberta por solda comum de estanho.

3.1.5. Confeção de Eletrodo para Registro de EEG

Os registros de EEG foram realizados através de eletrodos superficiais posicionados nos córtex parietal esquerdo e direito. Os eletrodos superficiais foram confeccionados com microparafusos cirúrgicos (Fine Science Tools, Nº19010-00), soldados a fios de aço revestidos com Teflon (mod. 7916, A&M Systems).

3.1.6. Cirurgia de Implantação de Cânula Guia e de Eletrodos para Registro de EEG e de ECG

Para a cirurgia de implantação de cânula-guia no ventrículo lateral esquerdo e dos eletrodos periféricos para registro de EEG e de ECG os animais foram anestesiados com Ketamina 10% e Xylazina 2%, administradas via intramuscular (0,1ml por 100g). Após a anestesia, foi injetada atropina diluída em salina a 2% (0,1ml por rato) via intra peritoneal para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à administração do anestésico. Foi também administrado Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte

(Fort Dodge, São Paulo, Brasil) (0,1 ml por rato) via intra muscular para cobertura antibiótica profilática. Os animais foram mantidos, durante toda a cirurgia, sobre uma manta térmica para manutenção da temperatura corporal entre 36 e 38°C.

Um eletrodo de registro de ECG foi implantado na região do apêndice xifóide e outro na região infra escapular esquerda. Os eletrodos foram suturados em músculos utilizando-se uma linha de nylon para minimizar registro de eletromiografia. Através de um trocáter, os fios dos eletrodos foram conduzidos até a porção superior da cabeça do animal sob o tecido subcutâneo. Em seguida, o animal foi fixado no aparelho estereotáxico. Após a limpeza de todo o tecido sobre o crânio, foi implantada a cânula guia sobre o ventrículo lateral esquerdo utilizando-se coordenadas estereotáxicas (AP: - 0,9mm, LL: +1,5mm e DV: -2,5mm) e os eletrodos superficiais para registro do EEG foram fixados nos córtex parietais direito e esquerdo. Os fios dos eletrodos para EEG e ECG foram desencapados e soldados em um conector RJ11 fixado ao osso nasal. Logo em seguida, o conector foi fixado ao crânio do animal com acrílico odontológico. A figura 2 mostra foto de animal após cirurgia.



Figura 2. Animal experimental após cirurgia de implantação de cânula guia e de eletrodos de EEG e ECG.

Os animais foram submetidos à cirurgia para implantação de cânula guia sobre o ventrículo lateral esquerdo e eletrodos de EEG e ECG. Os eletrodos de EEG foram implantados na região do córtex parietal direito e esquerdo e os eletrodos de ECG na região do apêndice xifóide e infra escapular esquerda. Posteriormente, os eletrodos foram soldados em um conector RJ11, mostrado na figura e fixados ao crânio do animal com acrílico dentário.

3.1.7. Canulação da Artéria Femoral

Para confecção das cânulas arteriais foram utilizados tubos de polietileno PE-50 e PE-10. Elas foram compostas por 15 cm do tubo de polietileno PE-50 soldado por aquecimento a 4 cm do tubo de polietileno PE-10. Tais cânulas foram preenchidas com solução salina (NaCl, 0,9%) e a extremidade livre do PE-50 foi ocluída com um pino de metal. A canulação arterial foi realizada 5 a 6 dias após a primeira cirurgia e 24 horas antes da realização dos experimentos com a toxina Tx3-4.

Os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália, Itapira, Brasil) através de uma máscara facial (indução anestésica com 4% Halotano e oxigênio, manutenção com 2-1% Halotano e oxigênio) e colocados na posição

supina em uma mesa cirúrgica. As patas anteriores e posteriores foram imobilizadas, os pêlos da região inguinal direita foram retirados e foi realizada a assepsia da pele com álcool iodado. Foi feita uma pequena incisão na pele e a musculatura foi divulsionada para visualização e dissecação do feixe vâsculo-nervoso femoral. Através da artéria femoral, a região proximal das cânulas (PE-10) foi introduzida para registro da PAM. Em seguida, o ponto de junção entre o PE-10 e o PE-50 foi fixado na região logo abaixo da incisão no vaso para fixação das cânulas através de nós com fios de sutura.

3.1.8. Registro dos Efeitos da toxina Tx3-4 sobre as ondas do EEG e do ECG e sobre a PAM

Um dia após a canulação da artéria femoral foi realizado um registro basal da atividade eletroencefalográfica, eletrocardiográfica e da PAM por 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma microinjeção de 3 μ L de toxina, por um período de 8 minutos, através de uma agulha injetora (Hamilton), como mostrado na figura 3.



Figura 3. Microinjeção de toxina ou PBS no ventrículo lateral esquerdo.

Animal experimental durante procedimento de microinjeção de toxina ou PBS no ventrículo lateral esquerdo. A agulha injetora foi conectada à agulha Hamilton por um PE 50. Foram injetados 3 μ l de toxina ou PBS em um período de 8 minutos, 1 μ l/min e mais 2 minutos sem retirar a agulha injetora para certificar que o conteúdo foi injetado adequadamente.

Após a injeção da toxina, foram realizados os registros dos três parâmetros avaliados por 60 minutos. Os parâmetros utilizados para registro do EEG/ECG estão descritos trabalho de Guidine, P.A.M. (Guidine et al. 2008). Para análise dos registros foram utilizados 3 minutos anteriores e 60 minutos posteriores à injeção da toxina. Após o registro, os animais foram mantidos vivos em gaiolas individuais por dois dias. Os registros são mostrados na figura 4. A análise de todos os registros foi realizada utilizando-se algoritmos de MATLAB© feitos em nosso laboratório. Foi calculada a energia total do EEG para cada hemisfério cerebral e a densidade dos componentes espectrais individuais (delta=0.5-4.0 Hz; theta=4.0–8.0 Hz; alpha=8.0–13.0 Hz; beta=13.0–30 Hz and gamma=36–44 Hz) que foram normalizados pela energia total do EEG.

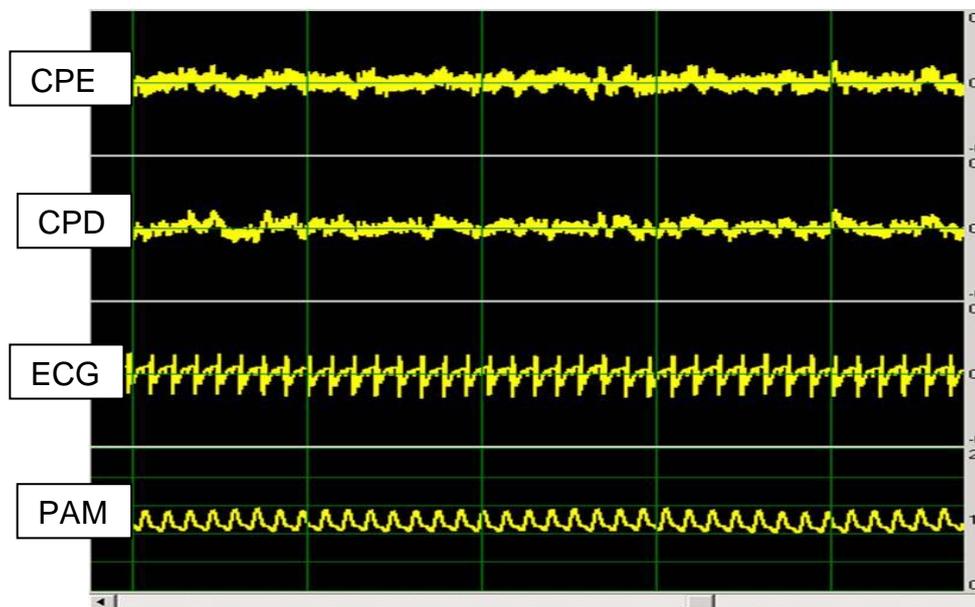


Figura 4. Registro de EEG do Córtex Parietal Esquerdo e Direito, ECG e PAM.

Primeiramente, cânula guia, eletrodos de EEG e ECG foram implantados nos animais, seguido de canulação da artéria femoral. Os registros foram realizados por 15 minutos, para medição dos parâmetros basais. Logo após a injeção central da toxina Tx3-4, os registros foram feitos por mais 60 minutos. A figura mostra os quatro canais de registro, o primeiro é o EEG do córtex Parietal E, o segundo, o registro de EEG do córtex Parietal D. O terceiro é o ECG e o quarto o registro da PAM.

3.2. *Investigação do Efeito Neuroprotetor da Toxina Tx3-4 nas Doses de 0,16µg, 0,32µg e 0,75µg por animal.*

3.2.1. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 8 grupos. Grupos sham (n=4) e isquemiado (n=7) de acordo com a dose de toxina microinjetada (0,16µg/animal; 0,32µg/animal; 0,75µg/animal) e grupo controle (PBS).

3.2.2. Cuidados Pré-operatórios

Os animais foram mantidos em um ciclo de 14 horas (06: 00 às 20:00) claro e 10 horas escuro, com livre acesso à água e à comida, a uma temperatura controlada entre 22 e 23°C. Antes das cirurgias, os animais foram submetidos aos testes funcionais, sensoriais e motores.

3.2.3. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália, Itapira, Brasil) através de uma máscara facial (indução anestésica com 4% Halotano e oxigênio, manutenção com 2-1% Halotano e oxigênio). Após a anestesia, foi injetada atropina diluída em salina a 2% (0,1ml por rato) via intra peritoneal para a prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundária à estimulação mecânica do nervo Vago durante o procedimento cirúrgico. Foi também administrado Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®, São Paulo, Brasil) (0,1 ml por rato) via intra muscular para cobertura antibiótica profilática. Primeiramente, os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de cânula-guia e de eletrodos superficiais para registro de EEG com fixação do conector RJ11 com acrílico odontológico. Em seguida, foram submetidos à cirurgia de indução de isquemia cerebral.

O procedimento cirúrgico utilizado para a realização da oclusão transitória da ACM foi descrito em 1989 (Longa et al. 1989). Foi realizada uma incisão sagital mediana. Os tecidos foram divulsionados até a bifurcação da artéria carótida comum (ACC) esquerda ser visualizada. Logo após, o ramo da artéria carótida interna (ACI), pterigo palatino, foi clipado junto a sua origem. A artéria carótida externa (ACE) foi ligada com um fio de seda em sua porção distal da bifurcação da ACC. Após a ACC também ter sido ligada e a ACI ter sido clipada, a ACE foi seccionada. O fio de oclusão (Doccol Corporation, MCAo suture PK10) foi introduzido através da ACE esquerda no interior da ACI até o local em que se encontra o clipe colocado anteriormente. Nesse momento, foi feito um sorteio para se determinar em qual grupo o animal foi incluído, sham ou isquemiado. Para o animal sham, o fio de oclusão foi retirado da ACI e o fluxo sanguíneo liberado para o SNC. Para o isquemiado, o fio continuou a ser introduzido. Foram utilizados dois critérios para determinar se o fio de oclusão estava na origem da ACM: a inserção do fio a uma distância de 20-21mm da bifurcação da ACC e/ou se houve uma discreta resistência à passagem do fio nessa determinada distância. O fio de oclusão foi mantido nessa posição através de uma ligadura à parede da ACE. O animal foi suturado, retirado do aparato de anestesia e da mesa cirúrgica e encaminhado para a sala de registro. Foi realizado registro da atividade eletroencefalográfica dos hemisférios cerebrais esquerdo e direito. Foram incluídos no experimento aqueles animais que apresentaram achatamento nas ondas do EEG no hemisfério cerebral esquerdo, como mostrado na figura 5. Com 30 minutos de isquemia, foi realizada a microinjeção de 3 μ L de toxina ou PBS, por um período de 8 minutos, através de uma agulha injetora (Hamilton). Após os 60 minutos

de isquemia, o animal foi reanestesiado e o fio de oclusão retirado. O grupo sham também foi reanestesiado e suturado, embora não houvesse a necessidade de retirada do fio de oclusão para promover a reperfusão. Os registros de EEG foram realizados por 10 minutos antes e após a injeção da toxina ou PBS, no período de reperfusão e nos dias 1, 2, 3, 7 e 14 pós-cirúrgico. A temperatura corporal dos animais foi mantida a 36-38°C durante todo o procedimento cirúrgico.

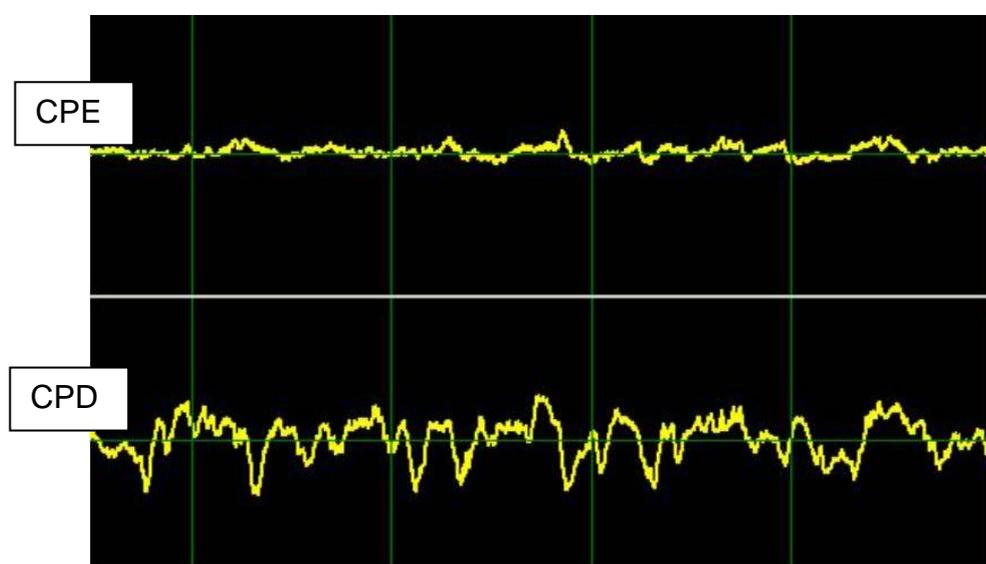


Figura 5. Registro de EEG durante oclusão da ACM.

A cirurgia de isquemia cerebral experimental foi realizada e o fio de oclusão foi colocado na origem da ACM esquerda. Em seguida o animal foi suturado, retirado da mesa de cirurgia e encaminhado para a sala de registro. O primeiro canal mostra registro de EEG do córtex parietal E durante oclusão da ACM, o segundo canal refere-se ao córtex parietal D. O eletrodecremento visível no primeiro canal, permite à conclusão de que o fluxo sanguíneo foi interrompido para a ACM esquerda devido à presença do fio de oclusão na origem dessa artéria. Uma vez que os neurônios não receberam mais a glicose e o oxigênio necessários à sua função, os mesmos foram silenciados. Foram incluídos no estudo os animais isquemiados que apresentaram esse resultado no registro de EEG feito por 10 minutos antes da injeção da toxina ou PBS.

Com o objetivo de verificar a eficiência do fio de oclusão em obstruir o fluxo sanguíneo para a ACM, testes de perfusão foram realizados com os corantes Azul de Evans e Vermelho Neutro. O fio foi colocado cirurgicamente na origem da ACM esquerda, em seguida os animais foram submetidos à

perfusão transcárdica e os corantes Azul de Evans ou Vermelho Neutro foram injetados. No teste com o Azul de Evans, foi possível visualizar toda a arborização da ACM direita (Figura 6A), o mesmo resultado não visto na ACM esquerda (Figura 6B), provando que o fio de oclusão foi capaz de impedir a passagem do corante para o interior da artéria. O mesmo resultado positivo foi adquirido no teste com o Vermelho Neutro. Em uma visão ventral do encéfalo do animal, figura 7, é possível a visualização da origem da ACM direita, mas não da ACM esquerda.

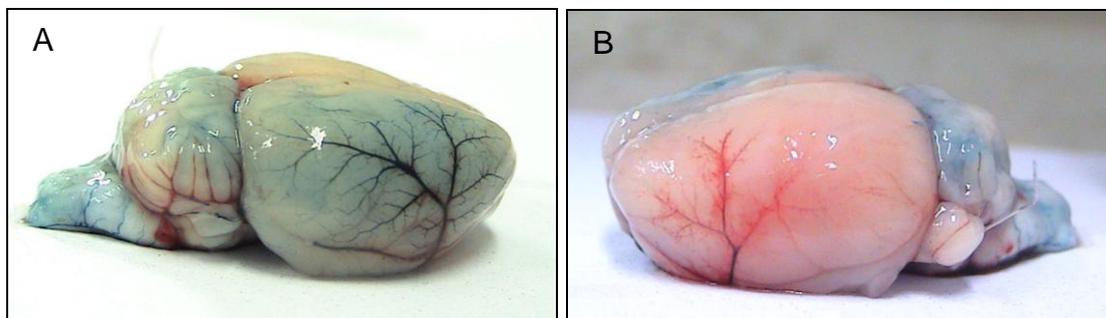


Figura 6. Cérebro de animal perfundido com o corante Azul de Evans após oclusão da ACM.

Após perfusão transcárdica com o corante Azul de Evans, na presença do fio de oclusão na origem da ACM esquerda, podemos visualizar a ACM direita corada. (A). O corante Azul de Evans não foi capaz de penetrar a ACM esquerda devido à presença do fio de oclusão na origem proximal dessa artéria (B).

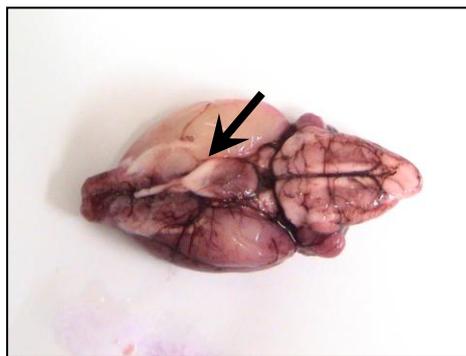


Figura 7. Visão ventral de cérebro de animal perfundido com o corante Vermelho Neutro após oclusão da ACM.

Após perfusão transcárdica com o corante Vermelho Neutro, na presença do fio de oclusão na origem da ACM esquerda, podemos visualizar a origem da ACM direita corada. O corante não foi capaz de penetrar a ACM esquerda devido à presença do fio de oclusão na origem proximal dessa artéria (indicado pela seta).

3.2.4. Cuidados Pós-operatórios

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em uma sala de recuperação por cerca de duas horas sob luz quente para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38^oC. Também foram monitorados quaisquer efeitos adversos. Água e ração umedecida foram disponibilizadas. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente por até 12 horas após o fim da cirurgia, em seguida os animais foram transferidos para caixas forradas com maravalha. Os ratos receberam duas doses diárias de 10 ml de salina intra peritoneal para a reposição de líquidos até o quarto dia pós-operatório ou até começarem a recuperar peso. Os animais foram pesados todos os dias, desde o dia da cirurgia até o sacrifício.

3.2.5. Testes Funcionais

São inúmeros os testes propostos para avaliação do desempenho motor dos animais após oclusão da ACM. Os animais foram submetidos a testes funcionais antes, 7 e 14 dias após os procedimentos cirúrgicos. A avaliação funcional foi realizada através do teste do cilindro, teste de assimetria bilateral (sensoriais), passo em falso e barras paralelas (motores).

3.2.6. Teste do Cilindro

O teste do cilindro avalia assimetria no uso espontâneo da pata anterior. O animal é colocado em um cilindro de 20cm de raio e 35cm de altura por 5 minutos. Durante esse tempo, conta-se o número de contatos da pata do animal com a parede do cilindro, levando-se em conta se o contato foi feito com

a pata direita, esquerda ou ambas. Posteriormente, calcula-se a porcentagem de cada uma dessas categorias de toque na parede do cilindro (Farr et al. 2007; Hicks et al. 2007).

3.2.7. Assimetria Bilateral

O teste de assimetria bilateral tem como objetivo avaliar negligência sensório-motora. Uma fita adesiva é colocada em cada uma das patas anteriores do animal, que é então colocado na caixa de teste. A ordem de colocação das fitas deve ser alternada pelo pesquisador para evitar a habituação do animal. Conta-se o tempo de latência para que o animal perceba a presença da fita em cada uma das patas e o tempo gasto para a remoção completa da fita em ambas as patas. Se o animal não remover a fita em até 180 segundos, o teste é encerrado (Ashioti et al. 2007).

3.2.8. Passo em falso

Esse teste, utilizado em inúmeros trabalhos que avaliam desempenho funcional após isquemia cerebral, mensura habilidade em integrar respostas motoras. A preensão precisa e o posicionamento das patas anteriores são necessários.

Os animais são colocados sobre uma grade (3x3cm) de arame (50 x 100cm) suspensa a 50cm de altura e a correta colocação das patas é analisada por 3 minutos, figura 8. É considerado um erro toda vez que o animal falha em pegar a grade e a pata anterior passar por entre o espaço vazio de 9cm² (Modo et al. 2000).



Figura 8. Foto de animal durante o Teste do Passo em Falso

Esse teste mensura habilidade em integrar respostas motoras. A preensão precisa e o posicionamento das patas anteriores são necessários. Os animais são colocados sobre uma grade (3x3cm) de arame (50 x 100cm) suspensa a 50cm de altura e a correta colocação das patas é analisada por 3 minutos. É considerado um erro toda vez que o animal falha em pegar a grade e a pata anterior passar por entre o espaço vazio de 9cm²

3.2.9. Barras Paralelas

Esse teste é utilizado para avaliar coordenação motora de patas posteriores. O aparato consiste de duas plataformas de madeira (30x40cm com 50 cm de altura) unidas por duas barras de metal de 1 cm de diâmetro e 115 cm de comprimento. A distância entre as barras é de 2,5cm.

O animal é estimulado a se deslocar de uma plataforma para outra, atravessando as barras, através de um estímulo aversivo (choque). Caso o animal permaneça por 30 segundos recebendo o estímulo e não atravesse, o teste é interrompido e o animal classificado como incapaz de deixar a plataforma de teste. Para avaliar a coordenação motora, o número de erros cometidos pelo animal é contado, considera-se erro quando o animal coloca as

duas patas posteriores na mesma barra, deixa uma ou as duas patas para fora ou entre as barras, figura 9. O valor final do teste é 0 - para os animais que atravessam as barras sem cometer erros; 1 - 1 erro cometido por metro percorrido; 2 - mais de 1 erro cometido por metro percorrido; 3 - mais de 2 erros cometidos por metro percorrido, 4 - mais de 4 erros cometidos por metro percorrido; 5 - mais de 6 erros cometidos por metro percorrido ou incapacidade de atravessar as barras (Ding et al. 2002b; Ding et al. 2004a).



Figura 9. Foto de animal durante o Teste das Barras Paralelas

O teste das barras paralelas é utilizado para avaliar coordenação motora de patas posteriores. O aparato consiste de duas plataformas de madeira (30x40cm com 50 cm de altura) unidas por duas barras de metal de 1 cm de diâmetro e 115 cm de comprimento. A distância entre as barras é de 2,5cm. O animal é estimulado a se deslocar de uma plataforma para outra, atravessando as barras, através de um estímulo aversivo (choque). Caso o animal permaneça por 30 segundos recebendo o estímulo e não atravesse, o teste é interrompido e o animal classificado como incapaz de deixar a plataforma de teste. Para avaliar a coordenação motora, o número de erros cometidos pelo animal é contado, considera-se erro quando o animal coloca as duas patas posteriores na mesma barra, deixa uma ou as duas patas para fora ou entre as barras.

3.2.10. Medida do Volume de Infarto

A medida do volume de infarto é um dado importante para estudos de recuperação após isquemia, porque está relacionado com o desempenho funcional do animal (Lyden et al. 1997). Após fixação, o cérebro dos animais foi fatiado no vibratome (Series 1000, Technical Products International, Inc., Saint Louis, EUA) em uma espessura de 200 μm . As fatias foram coradas com Vermelho Neutro para que os núcleos dos neurônios pudessem ser visualizados. As fatias já coradas foram então visualizadas em uma lupa (Stemi 2000-C, Zeiss, Alemanha) e fotografadas por uma câmera CCD (TCZ-984P, Fujitsu, Japão). Essas fotos foram analisadas no programa Image Tool for Windows (versão 3.0, The University of Texas Health Science Center in San Antonio, EUA). Para cada fatia do cérebro do animal foi traçado um contorno envolvendo o tecido íntegro de cada um dos hemisférios cerebrais. Todo o tecido cerebral em que não havia neurônios foi incluído na área de infarto. A partir desse contorno, o programa foi capaz de mensurar a área, em mm^2 , daquele hemisfério cerebral. Em seguida, a área do hemisfério direito (não lesado) foi dividida pela do hemisfério esquerdo (lesado). As fatias foram agrupadas de acordo com sua referência de localização em relação ao Bregma. Os intervalos determinados foram os seguintes de 4,2 a 3,2mm; 3,2 a 2,2mm; 2,2 a 1,2mm; 1,2 a 0,2mm; 0,2 a -0,3mm; -0,3 a -1,3mm; -1,3 a -2,3mm, -2,3 a -3,3mm de distância do Bregma (Paxinos and Watson 1998). Todas as fatias que pertenciam ao mesmo intervalo foram reunidas e foi calculada a média das razões entre a área do hemisfério direito e esquerdo. A

partir dos valores da razão entre o hemisfério D/E foi calculada a porcentagem de integridade do tecido neural, através da fórmula:

$$\text{Porcentagem de integridade neural} = 1/(\text{RazãoD/E}) \times 100$$

3.3. Investigação do Efeito Neuroprotetor da Toxina Tx3-4 na Dose de 0,75µg/animal. em Diferentes Tempos de Injeção após o Início da Isquemia.

3.3.1. Animais

Foram utilizados ratos Sprague dawley machos, com pesos entre 260 e 310 gramas, fornecidos pela Harlan UK Ltda. Todos os procedimentos animais foram realizados de acordo com a legislação da Inglaterra.

3.3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, Isquemia/tox/30min (n=10) e Isquemia/PBS/30min (n=8) (submetidos à microinjeção 30 minutos após o início da lesão isquêmica) e Isquemia/tox/2horas (n=10) e Isquemia/PBS/2horas (n=7) (microinjeção 2 horas após o início da isquemia).

3.3.3. Protocolo Experimental

O procedimento cirúrgico de isquemia cerebral experimental foi realizado para colocação do fio de oclusão na origem da ACM direita como descrito anteriormente. Os animais foram anestesiados com uma mistura gasosa composta por Isoflurano (4% indução e 1,8% manutenção; Abbott Laboratories Ltd), ar (0,8ml/l) e oxigênio (0,2ml /l). Todos foram mantidos anestesiados durante o período de obstrução do fluxo sanguíneo (60 minutos).

Os animais foram submetidos à microinjeção i.c.v. de toxina ou PBS posicionados no estereotáxico. Não foi utilizada cânula guia, pois o metal dessa não pode ser introduzido no aparelho de ressonância magnética. A porção superior da cabeça do animal foi tricotomizada e uma incisão foi realizada. O crânio foi limpo e perfurado sobre a região do ventrículo lateral esquerdo de acordo com as coordenadas estereotáxicas utilizadas anteriormente. Uma seringa injetora (Hamilton-5 μ l) foi introduzida 5mm até que o ventrículo fosse alcançado. Após a microinjeção o animal foi suturado. Os animais dos grupos isquemia/tox/2horas e isquemia/PBS/2horas foram recuperados da anestesia após o período de oclusão da ACM (60 minutos) e reanestesiados 45 minutos após o início da reperfusão para serem submetidos à microinjeção 2 horas após o início do processo isquêmico, como mostrado na figura 10.

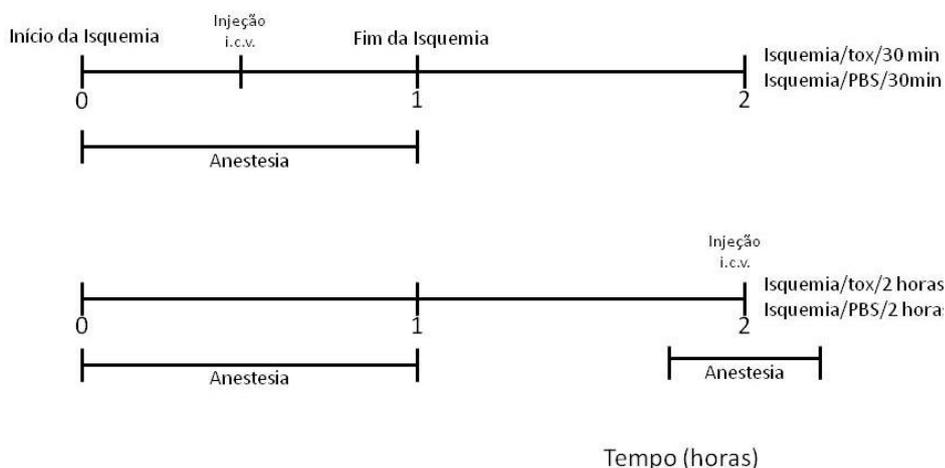


Figura 10. Protocolo de investigação do efeito neuroprotetor da toxina Tx3-4 na dose de 0,75 μ g/animal em diferentes tempos de injeção após o início da isquemia.

Todos os animais dos 4 grupos experimentais permaneceram anestesiados durante os 60 minutos de oclusão transitória da ACM direita. Os animais dos grupos Isquemia/tox/30min e Isquemia/PBS/30min foram submetidos à microinjeção de toxina ou PBS 30 minutos após início do insulto isquêmico. Enquanto os animais dos grupos Isquemia/tox/2horas e Isquemia/PBS/2horas foram reanestesiados cerca de 45 minutos após a início da reperfusão e submetidos à microinjeção de toxina ou PBS 2 horas após início da isquemia. As microinjeções foram realizadas através de cirurgia estereotáxica, sem colocação de cânula guia.

Após procedimento cirúrgico, os animais receberam cuidados especiais com relação à manutenção da temperatura corporal e alimentação. Foram submetidos ao teste de assimetria bilateral, antes e após isquemia (uma vez por semana, por 5 semanas) e pesados todos os dias por 14 dias após isquemia e posteriormente, uma vez por semana até a quinta semana.

3.3.4. Imagens de Ressonância Magnética Estrutural

As imagens de RM foram adquiridas através de um aparelho de RM de 7T (Varian Inc Palo Alto) utilizando-se o programa de aquisição de imagens Vnmrj versão 2.3A, no Instituto de Psiquiatria, King`s College London.

Antes da aquisição das imagens propriamente ditas, com as seqüências apropriadas, foram realizados os procedimentos padrões prévios da técnica de RM para cada um dos ratos como ajuste da homogeneidade do campo magnético (*'shimming'*), calibração dos pulsos de RF e o posicionamento correto das fatias no encéfalo das quais foram realizadas as imagens. Foram obtidas imagens seqüenciais, sensíveis a T2 (TR=4s; TE=60ms) através de seqüência de *'spin-echo'*, 24 fatias de 1mm de espessura, matriz=128x128 pixels, campo visual=32 x 32 mm, em 8 minutos.

Foram obtidas imagens de ressonância magnética estrutural de todos os animais 24 horas após a cirurgia de oclusão da ACM direita. Foram incluídos no estudo aqueles animais que apresentaram lesão cerebral isquêmica, caracterizada por área clara na imagem (edema). Essas imagens também foram obtidas 2 e 5 semanas após lesão. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Jim versão 5.0 (Jim Image Analysis Package, Xinapse Systems Ltd, Northants, UK). Foi utilizado o recurso de contorno automático do

programa para selecionar a área de lesão, como mostrado na figura 11. O programa forneceu o número de fatias utilizadas na análise, a área de cada uma delas, a média dos valores das áreas e o resultado final do volume de lesão em mm³.

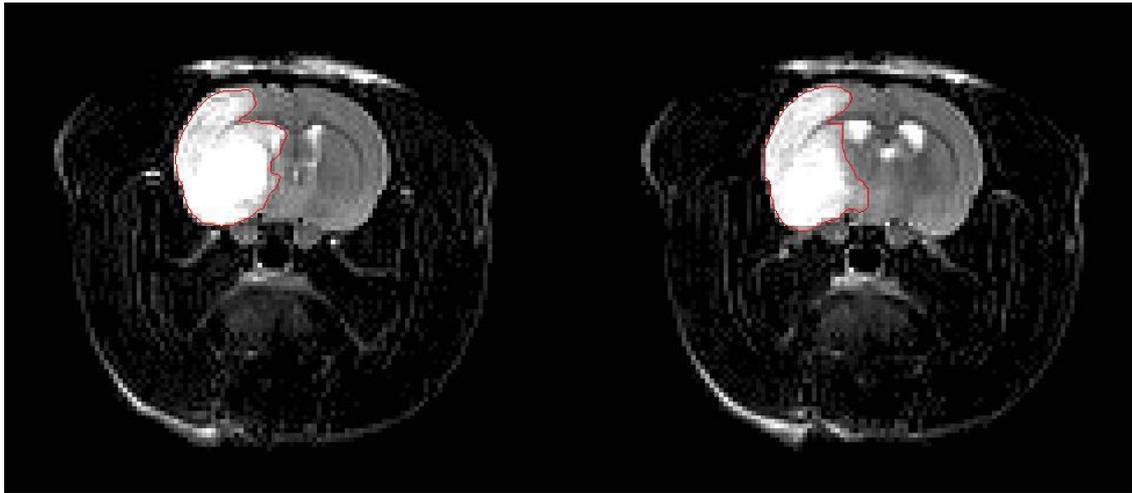


Figura 11. Imagem de ressonância magnética estrutural 24 horas após insulto isquêmico e contorno da área de lesão.

Foram obtidas imagens de ressonância magnética estrutural de todos os animais 24 horas após a cirurgia de oclusão da ACM direita. Foram incluídos no estudo aqueles animais que apresentaram lesão cerebral isquêmica, caracterizada por área clara na imagem (cheia de líquidos). Essas imagens também foram obtidas 2 e 5 semanas após lesão. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Jim versão 5.0 (Jim Image Analysis Package, Xinapse Systems Ltd, Northants, UK). Foi utilizado o recurso de contorno automático do programa para selecionar a área de lesão. Baseado no contorno da lesão realizado pelo examinador o programa forneceu o volume de lesão em mm³.

4. Resultados

O experimento da injeção central da toxina mostrou que a mesma não causou alteração estatisticamente significativa da frequência cardíaca em nenhuma das doses estudadas na comparação dos valores ao longo do tempo, Two way Anova, pós-teste de Bonferroni, figura 12.

Houve aumento nos valores da PAM dos animais que receberam a dose de 1,5 μ g, quando comparados ao longo do tempo com o grupo PBS a partir do intervalo 15 (45 minutos pós-injeção), Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, ($p < 0,05$) figura 13.

A energia total do EEG do hemisfério direito foi diminuída para as doses 1,5 μ g (175 μ V) e 0,75 μ g (174 μ V), com relação ao PBS (212 μ V) e aumentada para a dose 0,16 (258,7 μ V) ($p < 0,01$), figura 14. A energia total do EEG do hemisfério esquerdo foi aumentada para as doses 0,16 μ g (319 μ V) e 0,32 μ g (304 μ V), com relação ao PBS (227 μ V) ($p < 0,01$), One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey, figura 15.

A energia das bandas de frequência do EEG: Delta, Theta, Alpha, Beta e Gamma foram calculadas e normalizadas para análise estatística (Energia da banda/Energia Total EEG). Os valores normalizados foram comparados para cada banda de frequência, utilizando-se One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey, ($p < 0,05$). No hemisfério direito, as bandas Alpha e Beta diminuíram nas doses 0,75 μ g e 1,5 μ g, figura 16. No hemisfério esquerdo, a variação das bandas de frequência foi maior, Delta aumentou para a dose de 1,5 μ g, Theta aumentou para as doses 0,16 μ g e 0,32 μ g, Alpha e Beta diminuíram para as doses de 0,75 μ g e 1,5 μ g e Gamma aumentou para a dose de 1,5 μ g, figura 17.

Os animais foram sacrificados dois dias após o experimento, durante esse período não foi registrada nenhuma morte.

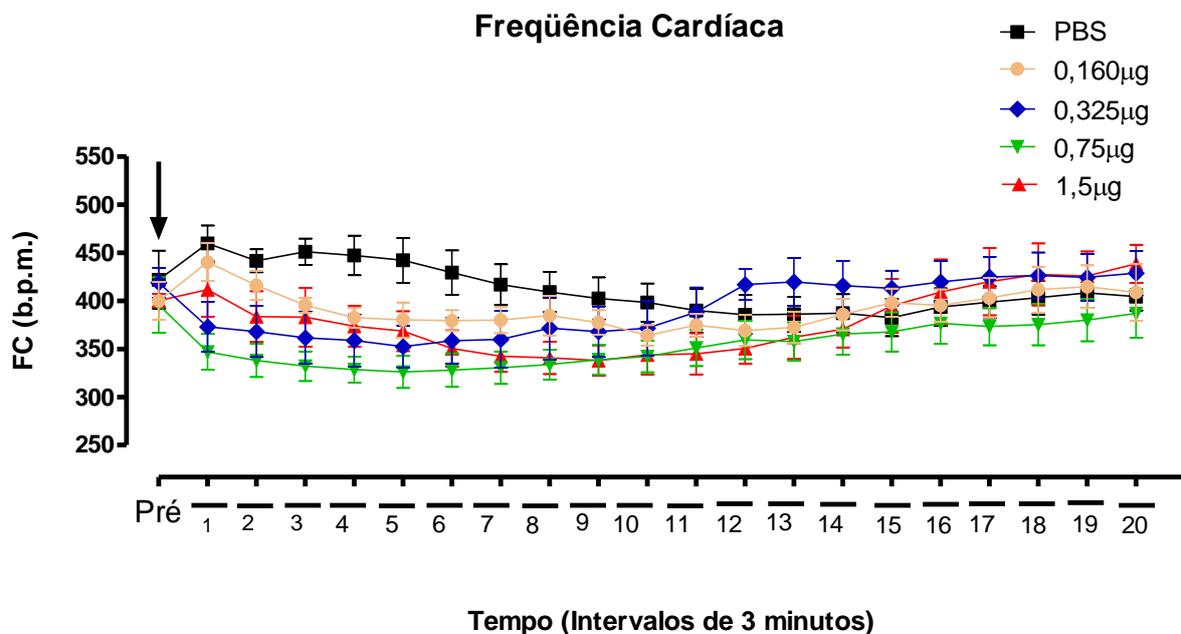


Figura 12. Valores de frequência cardíaca antes e após injeção central da toxina Tx3-4.

Foram colocados eletrodos de registro de ECG na região do apêndice xifóide e região infra escapular esquerda dos animais. Esses eletrodos de ECG foram passados sob tecido subcutâneo e fixados no crânio a um conector RJ11 para posterior registro. Os parâmetros foram registrados por 15 minutos, para determinação de valores basais, indicados pela seta. E após injeção da toxina, os registros foram feitos por mais 60 minutos. Esse tempo foi dividido em 20 intervalos de 3 minutos cada para análise e demonstração gráfica. A toxina Tx3-4 não causou alteração estatisticamente significativa da frequência cardíaca em nenhuma das doses estudadas na comparação dos valores ao longo do tempo, Two way Anova, pós-teste de Bonferroni.

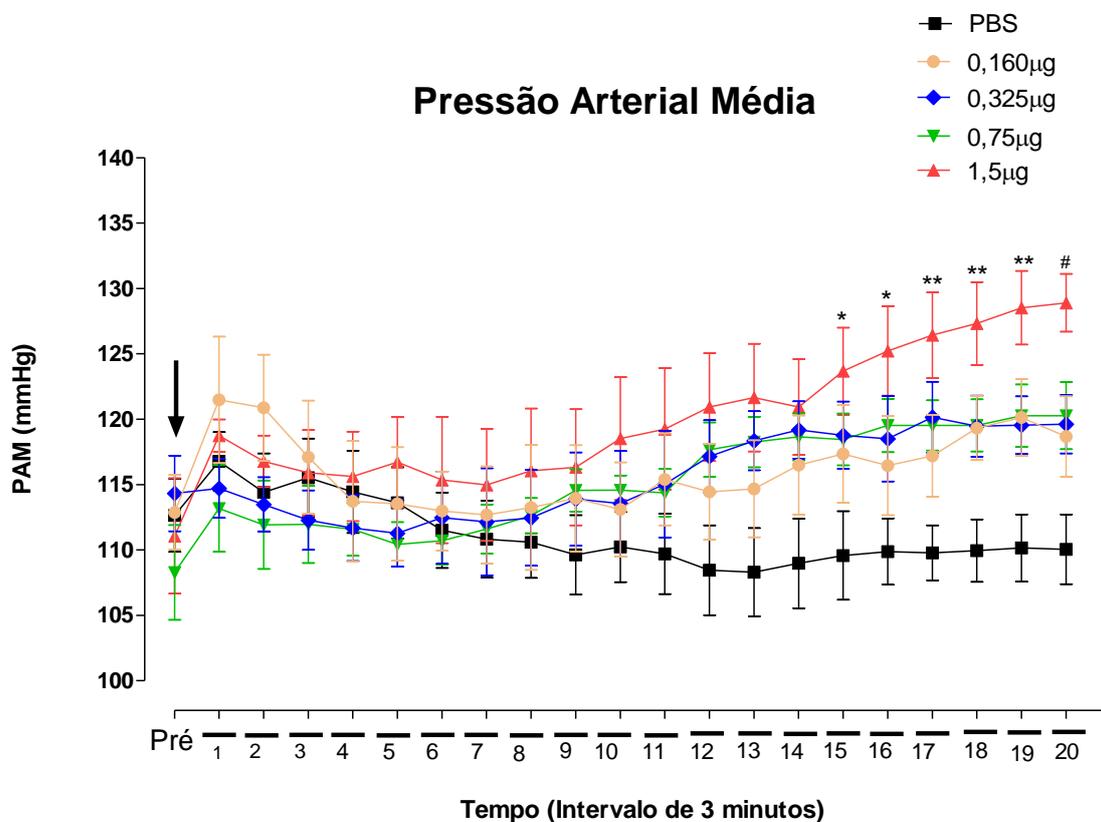


Figura 13. Valores de pressão arterial média antes e após a injeção central da toxina Tx3-4.

Os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral esquerda e os registros de PAM foram realizados no dia seguinte. Os parâmetros foram registrados por 15 minutos, para determinação de valores basais, indicados pela seta. E após injeção da toxina, os registros foram feitos por mais 60 minutos. Esse tempo foi dividido em 20 intervalos de 3 minutos cada para análise e demonstração gráfica. Houve aumento da PAM nos animais que receberam a dose de 1,5µg, quando comparados ao longo do tempo, com o grupo PBS a partir do intervalo 15 (45 minutos após injeção), Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e #($P < 0,001$).

Energia Total EEG (Hemisfério D)

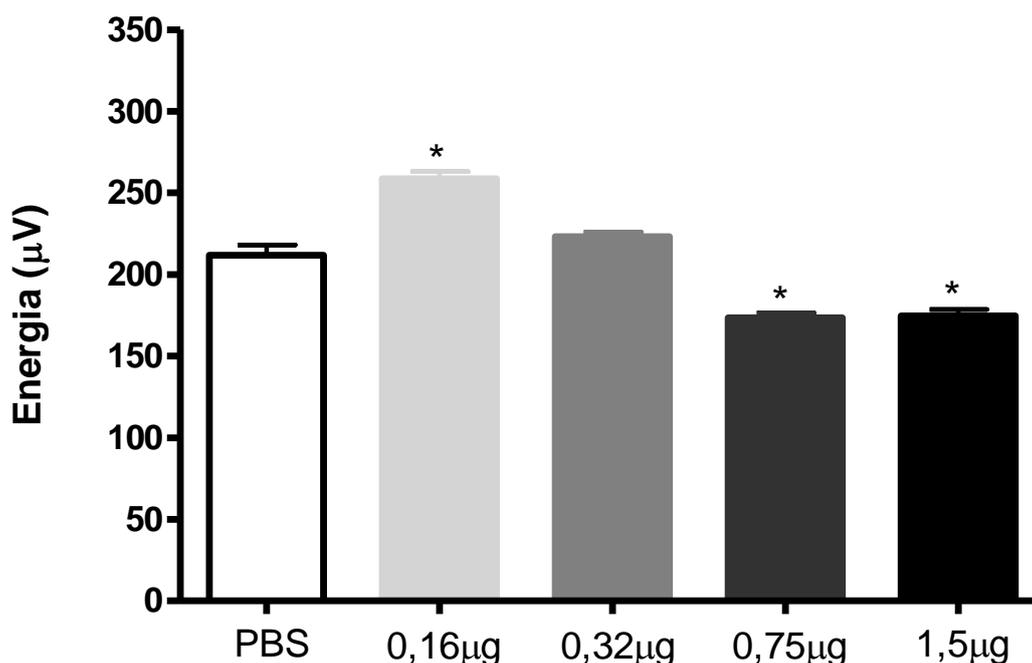


Figura 14. Energia total do EEG do hemisfério direito após injeção central da toxina Tx3-4.

Elétrodos para registro superficial de EEG foram implantados sobre a região dos córtex parietal direito e esquerdo. Os registros foram realizados por 15 minutos, para determinação de valores basais. E após injeção da toxina, foram feitos por mais 60 minutos. A injeção central da toxina Tx3-4 no ventrículo lateral esquerdo dos animais diminuiu a energia total do EEG do hemisfério direito nas doses 1,5μg (175μV) e 0,75μg (174μV), com relação ao PBS (212μV) e aumentou para a dose 0,16 (258,7μV), **($p < 0,01$). Para análise estatística, foi utilizado One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey. As barras representam as médias dos valores de cada grupo e os traços indicam erro padrão da média.

Energia Total EEG (Hemisfério E)

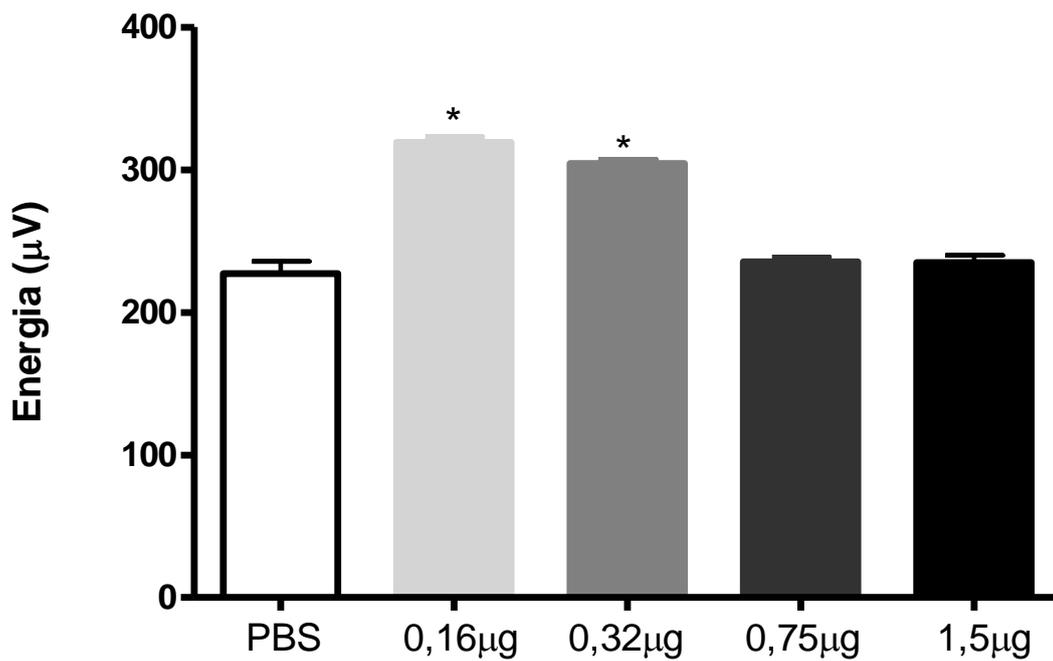


Figura 15. Energia total do EEG do hemisfério esquerdo após injeção central da toxina Tx3-4.

Elétrodos para registro superficial de EEG foram implantados sobre a região dos córtex parietal direito e esquerdo. Os registros foram realizados por 15 minutos, para determinação de valores basais. E após injeção da toxina, foram feitos por mais 60 minutos. A injeção central da toxina Tx3-4 no ventrículo lateral esquerdo dos animais aumentou a energia total do EEG do hemisfério esquerdo nas doses 0,16µg (319µV) e 0,32µg (304µV), com relação ao PBS (227µV) ******($p < 0,01$). Para análise estatística, foi utilizado One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey. As barras representam as médias dos valores de cada grupo e os traços indicam erro padrão da média.

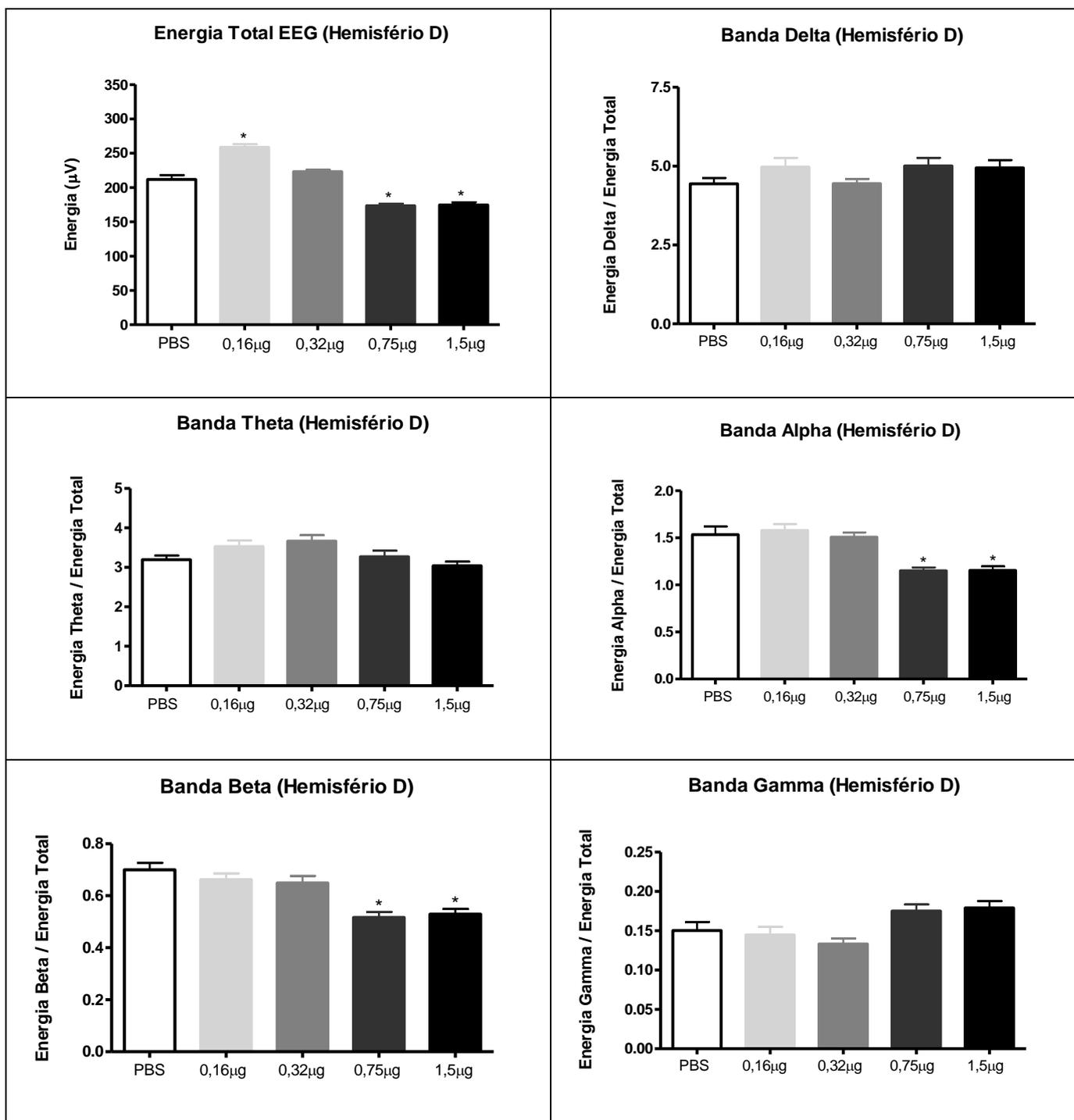


Figura 16. Energia total do EEG do hemisfério direito e valores normalizados (Energia banda/Energia Total EEG) das bandas de frequência após injeção central da toxina Tx3-4.

No hemisfério direito, as bandas Alpha e Beta diminuíram nas doses 0,75 μg e 1,5 μg após injeção da toxina. One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey, *(p<0,05).

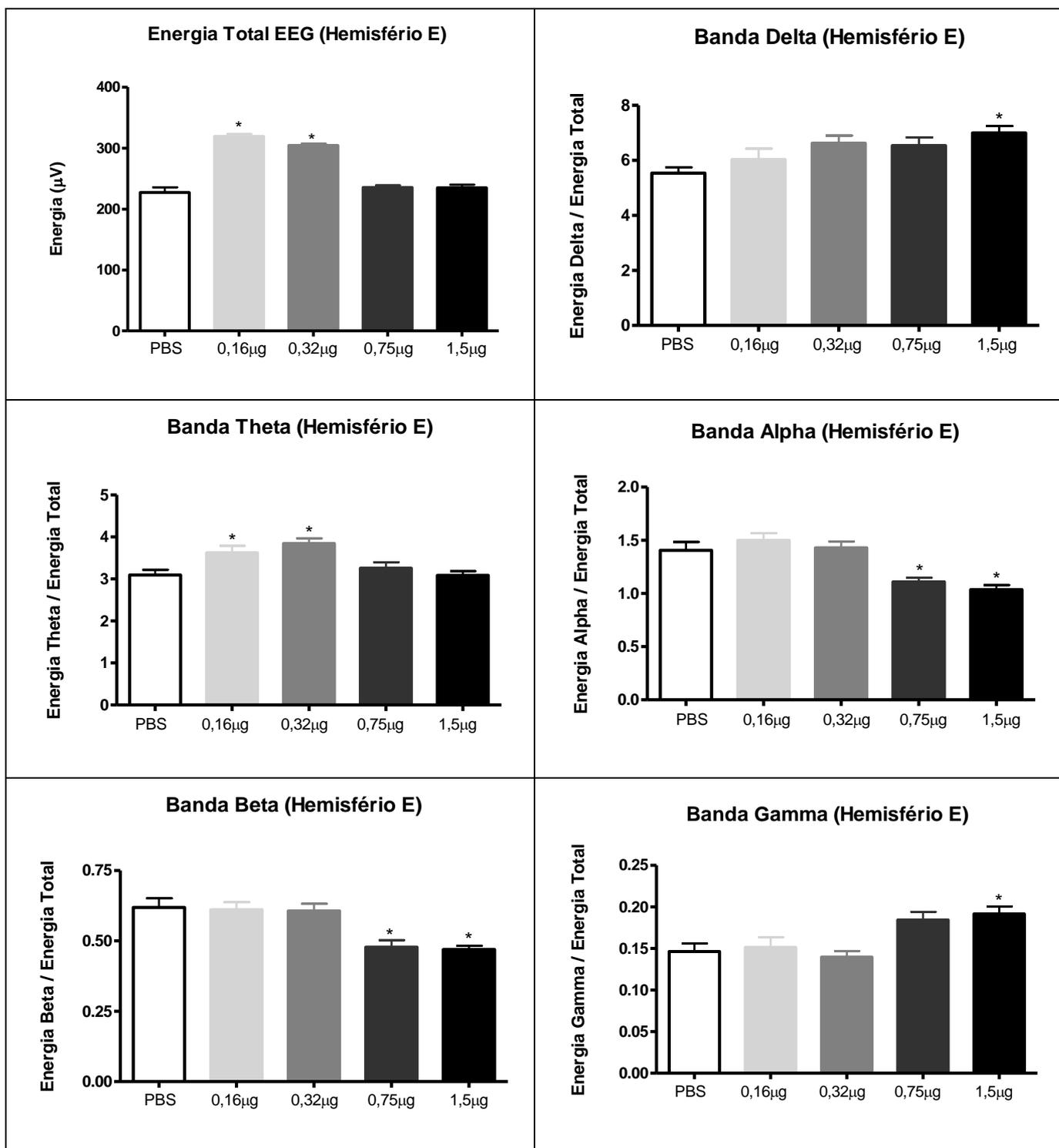


Figura 17. Energia total do EEG do hemisfério direito e valores normalizados (Energia banda/Energia Total EEG) das bandas de frequência após injeção central da toxina Tx3-4.

No hemisfério esquerdo, Delta aumentou para a dose de 1,5µg; Theta aumentou para 0,16µg e 0,32µg; Alpha e Beta diminuíram para 0,75µg e 1,5µg e Gamma aumentou para 1,5µg, One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey, *($p < 0,05$).

Os testes funcionais do experimento de neuroproteção após isquemia cerebral em ratos apresentaram os resultados a seguir. No teste do cilindro, não houve diferença entre os grupos de animais isquemiados quanto à porcentagem de contatos com a parede do cilindro da pata direita, esquerda ou ambas, como mostrado nas figuras 18 e 19.

O teste de assimetria bilateral mostrou que a toxina Tx3-4 diminuiu o tempo (em segundos) que o animal necessita para perceber a presença da fita adesiva da pata contralateral à lesão (direita) 7 dias após isquemia para as doses de 0,75µg ($20,92 \pm 3,5$) e 0,32µg ($21,75 \pm 4,3$) quando comparadas ao grupo PBS ($53,92 \pm 12,34$) ($p < 0,01$). Todos os animais dos grupos tratados com toxina perceberam a presença da fita mais rapidamente 14 dias após isquemia para as doses de 0,75µg ($17,67 \pm 1,9$), 0,32µg ($19,25 \pm 5,0$) e 0,16µg ($24,92 \pm 4,4$) quando comparadas ao grupo de animais injetados com PBS ($60,42 \pm 11,8$) ($p < 0,01$), Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, figura 20.

Com relação ao tempo de retirada da fita da pata direita, 7 dias após a cirurgia, os animais dos grupos injetados com a dose de 0,75µg ($60,92 \pm 14,56$) e 0,32µg ($76,75 \pm 23,71$) foram capazes de retirar a fita mais rapidamente que aqueles do grupo injetado com PBS ($146,9 \pm 11,77$) ($p < 0,01$). Todos os animais dos grupos tratados com toxina retiraram a fita mais rapidamente 14 dias após isquemia para as doses de 0,75µg ($40,42 \pm 7,0$), 0,32µg ($48,00 \pm 13,55$) e 0,16µg ($75,42 \pm 16,42$) em relação aos animais que receberam injeção de PBS ($145,3 \pm 12,78$) ($p < 0,01$), Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, figura 21.

No teste passo em falso, a toxina foi capaz de diminuir os erros cometidos pelos animais isquemiados tratados nas 3 doses estudadas no dia 7

pós-lesão para as doses de 0,75µg ($2,3 \pm 0,6$), 0,32µg ($3,0 \pm 0,6$) e 0,16µg ($4,0 \pm 0,8$) em relação ao grupo de animais injetados com PBS ($10,7 \pm 2,2$) ($p < 0,05$), One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey, figura 22. No entanto, 14 dias após isquemia, essa neuroproteção funcional continuou presente apenas para o grupo que recebeu a dose de 0,75µg ($2,16 \pm 0,6$), em relação ao grupo que recebeu PBS ($6,7 \pm 1,6$), One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey, figura 23.

No teste das barras paralelas, os animais isquemiados tratados com a toxina nas doses de 0,75µg e 0,32µg erraram menos ao atravessar as barras paralelas no dia 7 pós-lesão, figura 24. No entanto, essa neuroproteção funcional continuou presente apenas para o grupo que recebeu a dose de 0,75µg no dia 14 após isquemia, Teste Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, figura 25.

Com relação aos animais sham (falso operados para a cirurgia de isquemia cerebral) não houve diferença entre os grupos e entre os dias de teste. A toxina, injetada em um animal que não sofreu dano isquêmico, não causou alteração funcional nas doses estudadas.

Teste do Cilindro (dia 07)

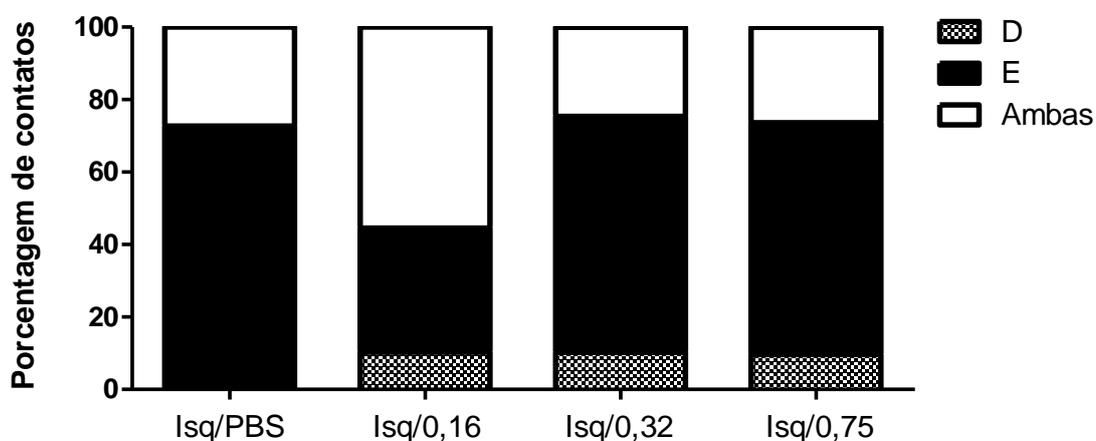


Figura 18. Porcentagem de contatos das patas anteriores dos animais isquemiados com a parede do cilindro 7 dias após lesão.

O teste do cilindro avalia assimetria no uso espontâneo da pata anterior e foi realizado antes, 7 e 14 dias após isquemia. O animal é colocado em um cilindro de 20cm de raio e 35cm de altura por 5 minutos. Durante esse tempo, conta-se o número de contatos da pata do animal com a parede do cilindro, levando-se em conta se o contato foi feito com a pata direita, esquerda ou ambas. Posteriormente, calcula-se a porcentagem de cada uma dessas categorias de toque na parede do cilindro. Não houve diferença entre os grupos de animais isquemiados quanto à porcentagem de contatos com a parede do cilindro da pata direita, esquerda ou ambas no dia 7 pós-lesão. Para análise estatística, foi utilizado One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey.

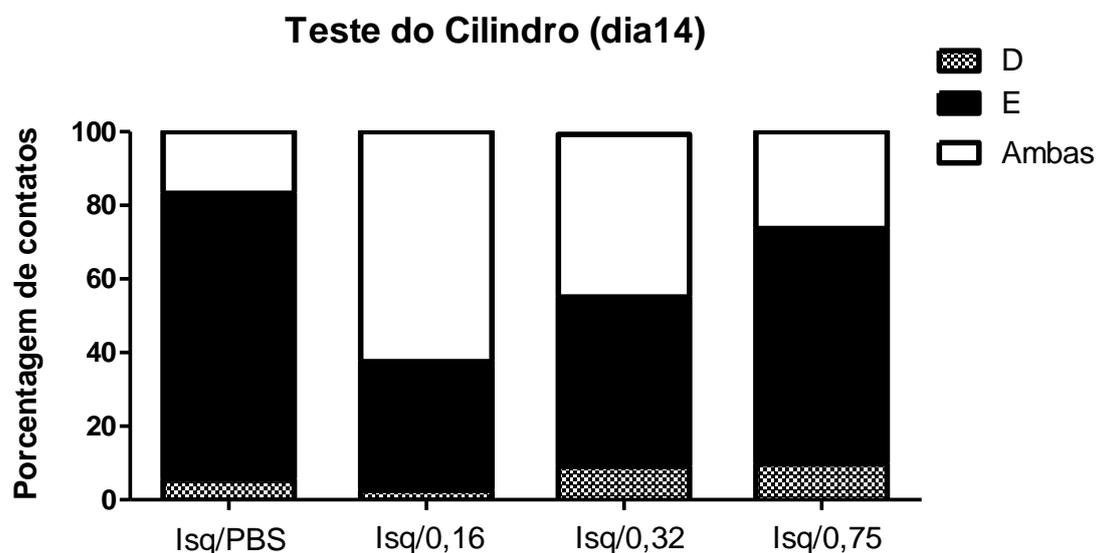


Figura 19. Porcentagem de contatos das patas anteriores dos animais isquemiados com a parede do cilindro 14 dias após lesão.

O teste do cilindro avalia assimetria no uso espontâneo da pata anterior e foi realizado antes, 7 e 14 dias após isquemia. O animal é colocado em um cilindro de 20cm de raio e 35cm de altura por 5 minutos. Durante esse tempo, conta-se o número de contatos da pata do animal com a parede do cilindro, levando-se em conta se o contato foi feito com a pata direita, esquerda ou ambas. Posteriormente, calcula-se a porcentagem de cada uma dessas categorias de toque na parede do cilindro. Não houve diferença entre os grupos de animais isquemiados quanto à porcentagem de contatos com a parede do cilindro da pata direita, esquerda ou ambas no dia 14 pós-lesão. Para análise estatística, foi utilizado One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey.

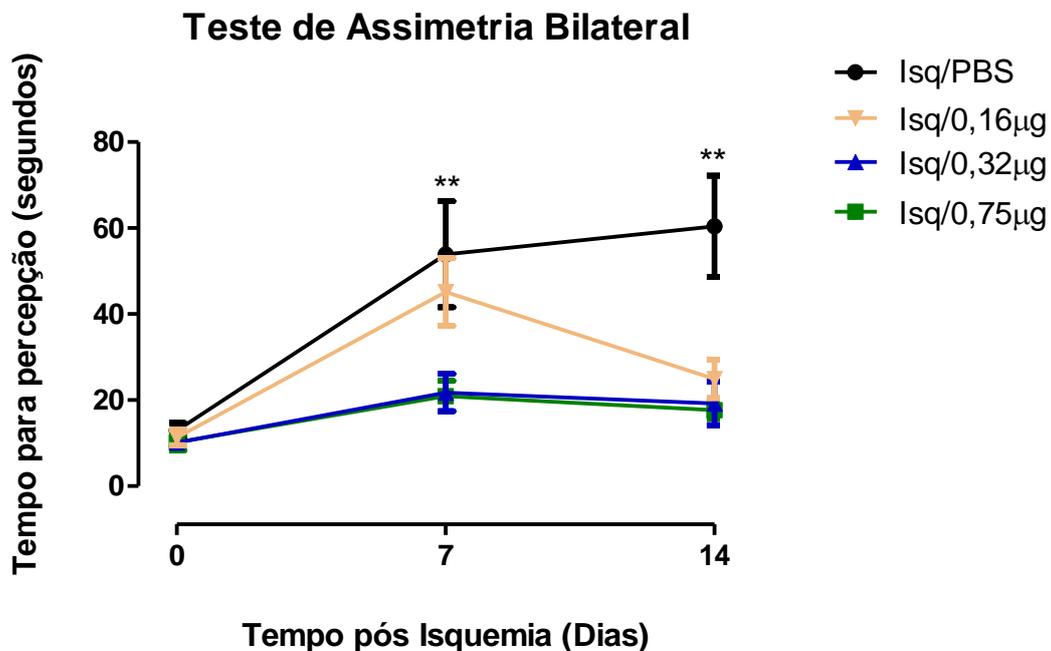


Figura 20. Tempo (segundos) gasto para perceber a presença da fita adesiva na pata direita (contralateral à lesão).

Os animais foram submetidos ao teste de assimetria bilateral antes, 7 e 14 dias após lesão. Esse teste tem como objetivo avaliar negligência sensório-motora. Uma fita adesiva é colocada em cada uma das patas anteriores do animal, que é então colocado na caixa de teste. Conta-se o tempo de latência para que o animal perceba a presença da fita em cada uma das patas e o tempo gasto para a remoção completa da fita em ambas as patas. A toxina Tx3-4 diminuiu o tempo que o animal necessita para perceber a presença da fita adesiva na pata direita, 7 dias após isquemia, nas doses 0,75µg (20,92 ± 3,5) e 0,32µg (21,75 ± 4,3) em relação ao grupo PBS (53,92 ± 12,34) **($p < 0,01$). Todos os grupos tratados com toxina perceberam a presença da fita mais rapidamente 14 dias após isquemia, 0,75µg (17,67 ± 1,9), 0,32µg (19,25 ± 5,0) e 0,16µg (24,92 ± 4,4) em relação ao PBS (60,42 ± 11,8) **($p < 0,01$), Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni.

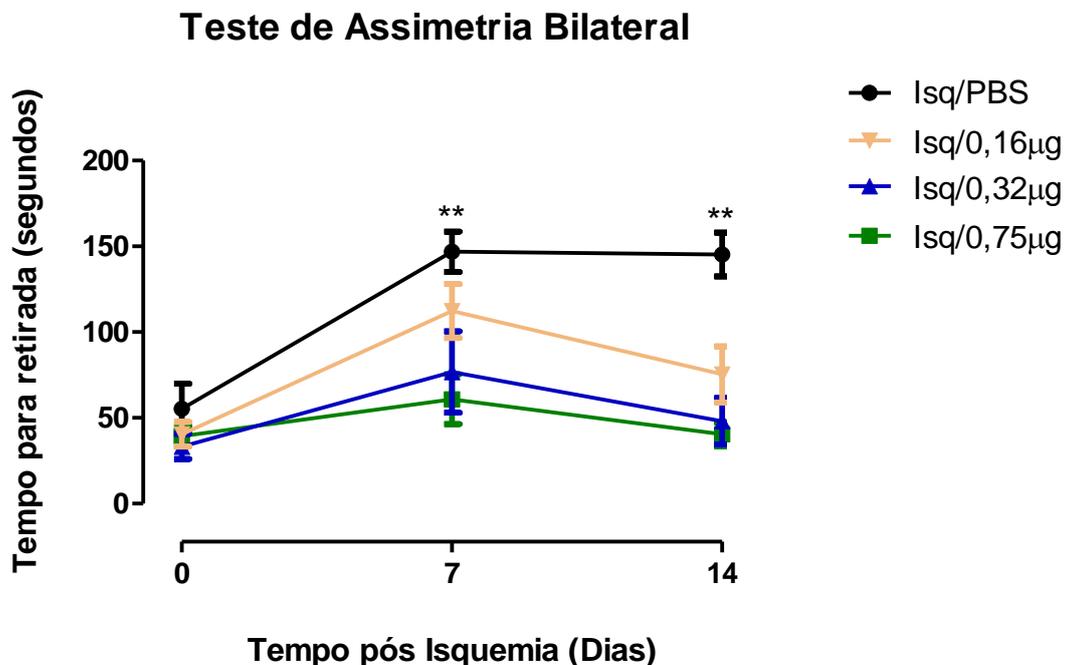


Figura 21. Tempo (segundos) gasto para retirar a fita adesiva da pata direita (contralateral à lesão).

Os animais foram submetidos ao teste de assimetria bilateral antes, 7 e 14 dias após lesão. Esse teste tem como objetivo avaliar negligência sensório-motora. Uma fita adesiva é colocada em cada uma das patas anteriores do animal, que é então colocado na caixa de teste. Conta-se o tempo de latência para que o animal perceba a presença da fita em cada uma das patas e o tempo gasto para a remoção completa da fita em ambas as patas. Com relação ao tempo de retirada da fita da pata direita, 7 dias após a cirurgia, os animais dos grupos 0,75µg ($60,92 \pm 14,56$) e 0,32µg ($76,75 \pm 23,71$) tiraram mais rapidamente que aqueles do grupo PBS ($146,9 \pm 11,77$) $** (p < 0,01)$. Todos os grupos tratados com toxina retiraram a fita mais rapidamente 14 dias após isquemia, 0,75µg ($40,42 \pm 7,0$), 0,32µg ($48,00 \pm 13,55$) e 0,16µg ($75,42 \pm 16,42$) em relação ao PBS ($145,3 \pm 12,78$) $** (p < 0,01)$, Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni.

Passo em Falso (dia07)

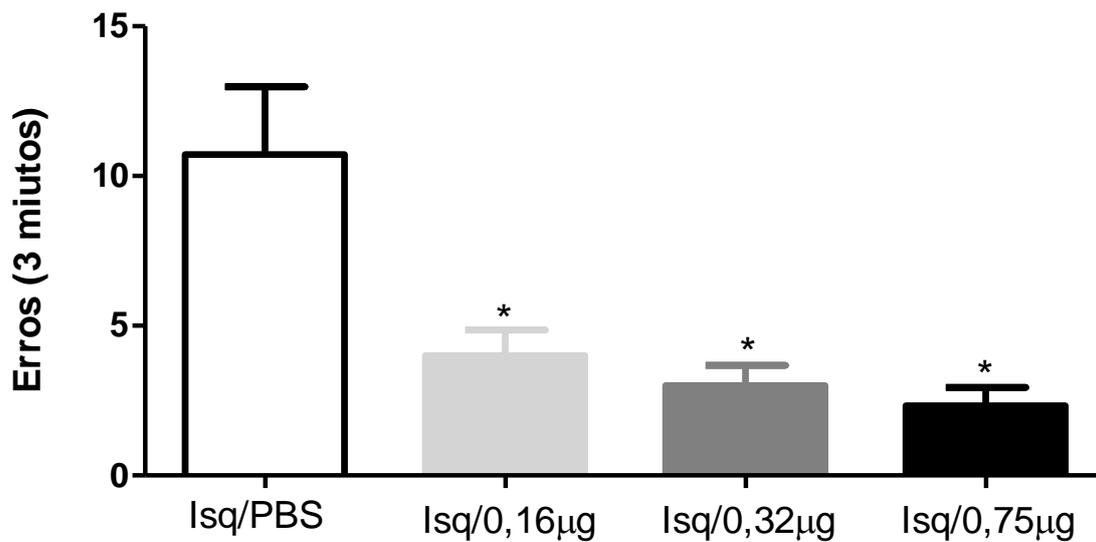


Figura 22. Número de erros cometidos pelos animais isquemiados no teste do passo em falso 7 dias após lesão.

O teste passo em falso foi realizado antes, 7 e 14 dias pós-lesão. A toxina foi capaz de diminuir os erros cometidos pelos animais isquemiados tratados nas 3 doses estudadas no dia 7 pós-lesão, 0,75µg (2,3 ± 0,6), 0,32µg (3,0 ± 0,6) e 0,16µg (4,0 ± 0,8) em relação ao PBS (10,7 ± 2,2) *(p<0,05), One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey. As barras representam as médias dos valores de cada grupo e os traços indicam erro padrão da média.

Passo em Falso (dia14)

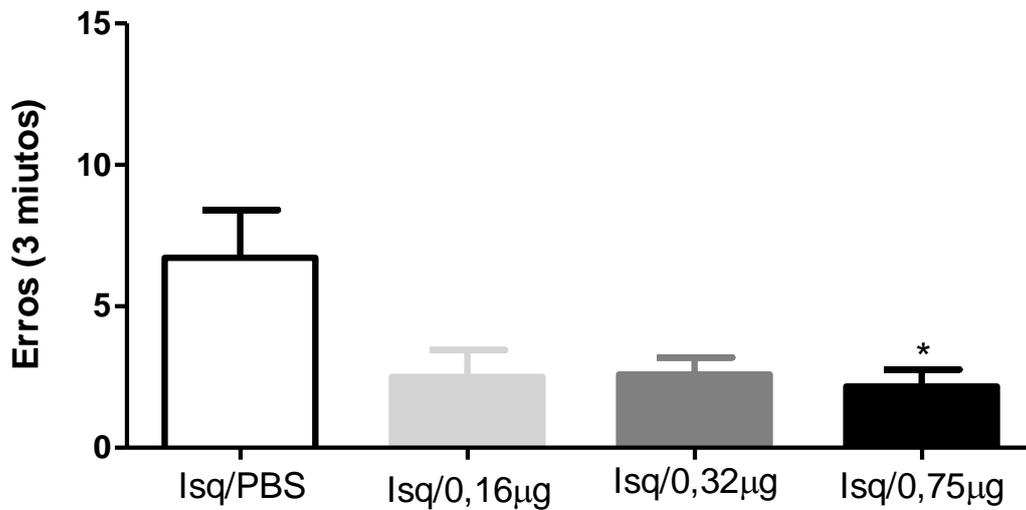


Figura 23. Número de erros cometidos pelos animais isquemiados no teste do passo em falso 14 dias após lesão.

No teste realizado 14 dias após isquemia, apenas o grupo que recebeu a dose de 0,75µg ($2,16 \pm 0,6$), errou menos em relação ao PBS ($6,7 \pm 1,6$), $*(p < 0,05)$, One Way Anova, seguido do *Post-hoc* de Tukey. As barras representam as médias dos valores de cada grupo e os traços indicam erro padrão da média.

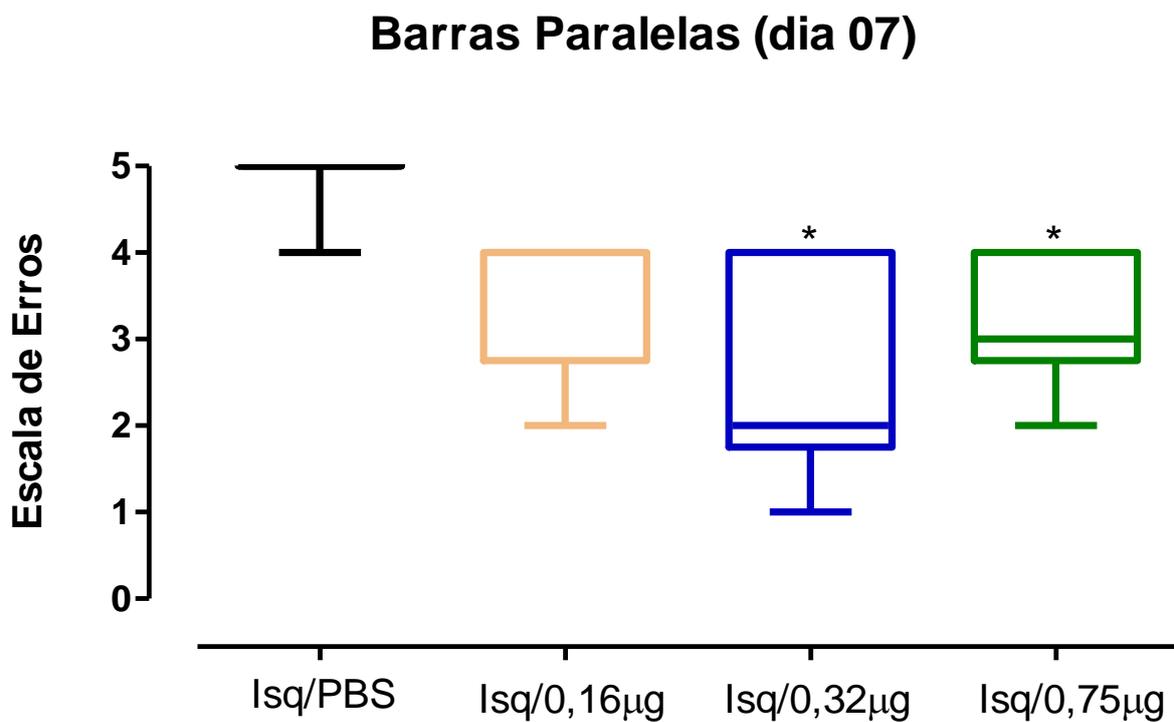


Figura 24. Erros cometidos pelos animais isquemiados no teste das barras paralelas (valor em escala) 7 dias após lesão.

Esse teste é utilizado para avaliar coordenação motora de patas posteriores. O animal é estimulado a se deslocar de uma plataforma para outra, atravessando as barras, através de um estímulo aversivo (choque). Para avaliar a coordenação motora, o número de erros cometidos pelo animal é contado, considerado-se erro quando o animal coloca as duas patas posteriores na mesma barra, deixa uma ou as duas patas para fora ou entre as barras. O valor final do teste é 0 - para os animais que atravessam as barras sem cometer erros; 1 - 1 erro cometido por metro percorrido; 2 - mais de 1 erro cometido por metro percorrido; 3 - mais de 2 erros cometidos por metro percorrido; 4 - mais de 4 erros cometidos por metro percorrido; 5 - mais de 6 erros cometidos por metro percorrido ou incapacidade de atravessar as barras. Os animais isquemiados tratados com a toxina nas doses de 0,75µg e 0,32µg erraram menos ao atravessar as barras paralelas no dia 7 pós-lesão. (Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, para análise entre grupos). Os resultados estão expressos em mediana ± primeiro/terceiro quartis.

Barras Paralelas (dia 14)

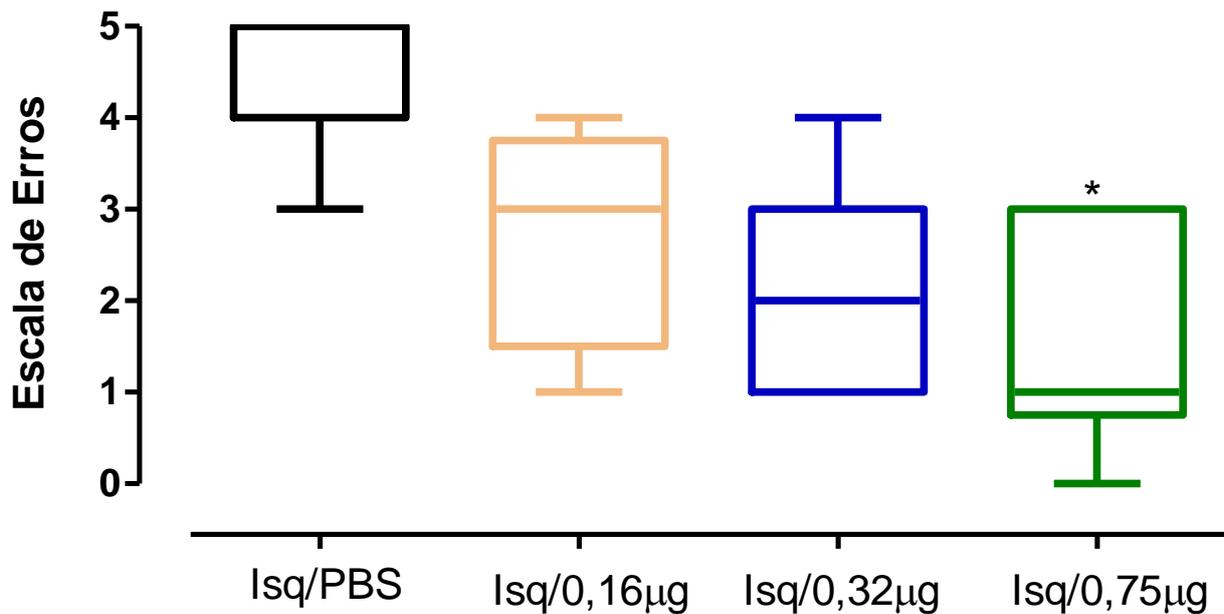


Figura 25. Erros cometidos pelos animais isquemiados no teste das barras paralelas (valor em escala) 14 dias após lesão.

Esse teste é utilizado para avaliar coordenação motora de patas posteriores. O animal é estimulado a se deslocar de uma plataforma para outra, atravessando as barras, através de um estímulo aversivo (choque). Para avaliar a coordenação motora, o número de erros cometidos pelo animal é contado, considerado-se erro quando o animal coloca as duas patas posteriores na mesma barra, deixa uma ou as duas patas para fora ou entre as barras. O valor final do teste é 0 - para os animais que atravessam as barras sem cometer erros; 1 - 1 erro cometido por metro percorrido; 2 - mais de 1 erro cometido por metro percorrido; 3 - mais de 2 erros cometidos por metro percorrido; 4 - mais de 4 erros cometidos por metro percorrido; 5 - mais de 6 erros cometidos por metro percorrido ou incapacidade de atravessar as barras. Os animais isquemiados tratados com a toxina na dose de 0,75µg erraram menos ao atravessar as barras paralelas no dia 14 pós-lesão. (Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, para análise entre grupos). Os resultados estão expressos em mediana ± primeiro/terceiro quartis.

Todos os animais isquemiados tratados com toxina apresentaram maior peso em relação ao PBS a partir do dia 7 após lesão, figura 26. Essa diferença se manteve até o dia do sacrifício, Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni.

A energia total do EEG, apresentada e analisada na forma de razão entre os valores do hemisfério E/hemisfério D, foi diferente para todos os grupos isquemiados nos registros realizados durante a isquemia (antes e depois da microinjeção) e no período de reperfusão em relação ao grupo Sham correspondente, Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni. No entanto, essa diferença desapareceu nos dias 1, 2, 3, 7 e 14 após lesão, figura 27.

O volume de Infarto, representado por porcentagem de integridade de tecido neural, foi reduzido para todos os grupos isquemiados tratados com toxina em relação ao PBS, entre as coordenadas 2,2 e -3,3 do Bregma, Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, figura 28.

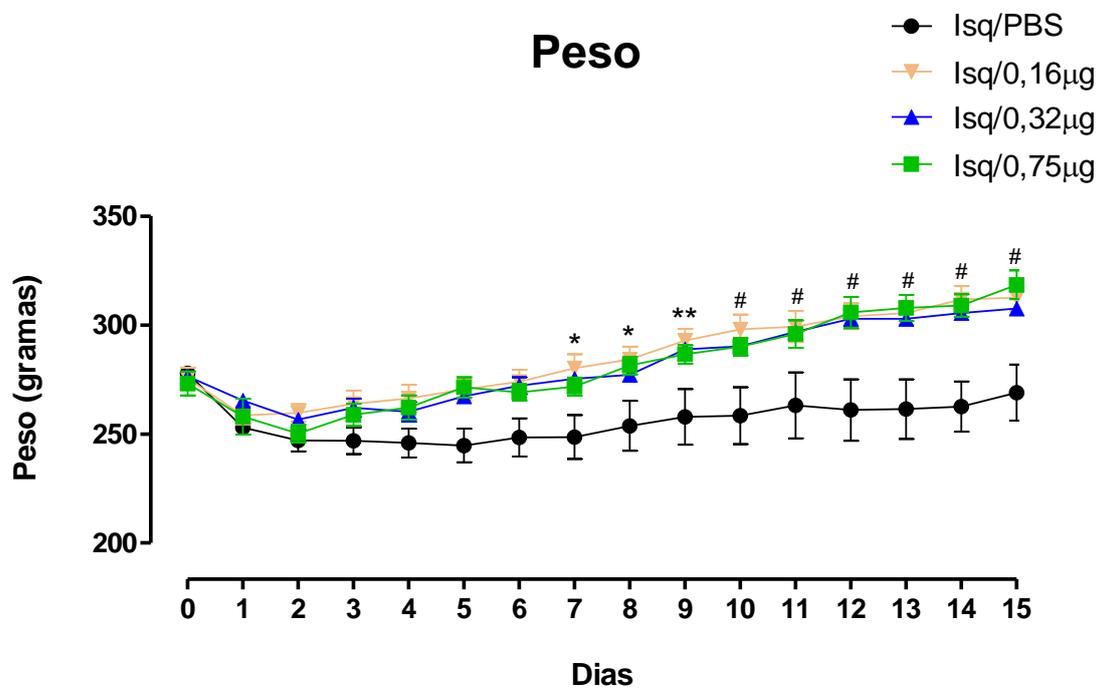


Figura 26. Peso corporal dos animais isquemiados ao longo dos dias de experimento.

Os animais foram pesados do dia da cirurgia (dia 0) até o dia do sacrifício (dia 15). Todos os animais isquemiados tratados com toxina apresentaram maior peso em relação ao PBS a partir do dia 7 após lesão. Essa diferença se manteve até o dia do sacrifício, Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e #($P < 0,001$).

REGISTROS DE EEG

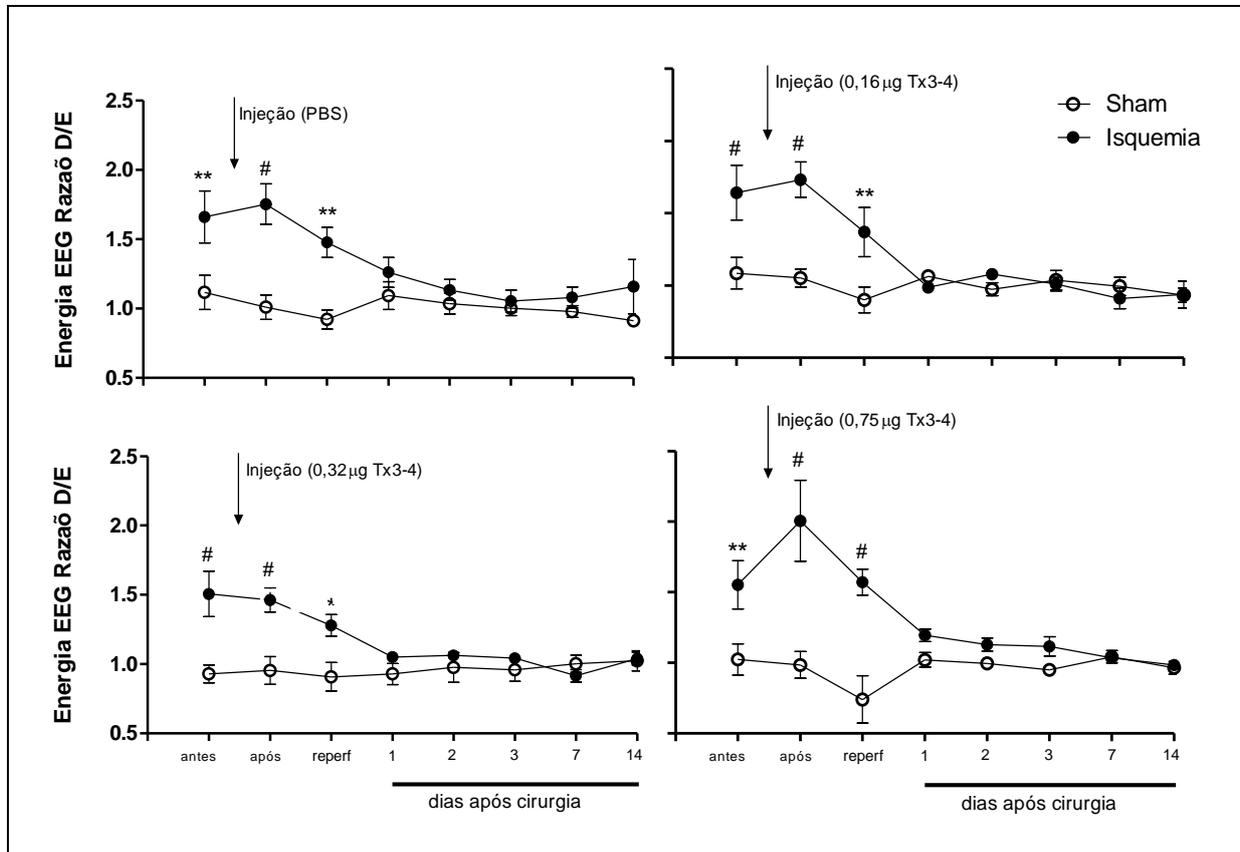


Figura 27. Registros de EEG dos animais dos grupos Sham e Isquemia injetados com toxina ou PBS.

Os registros de EEG foram realizados antes e após a injeção de toxina ou PBS, no período de reperfusão e 1, 2, 3, 7 e 14 dias após cirurgia. A energia total do EEG, apresentada e analisada na forma de razão entre os valores do hemisfério D/hemisfério E, foi diferente para todos os grupos isquemiados nos registros realizados antes e após a injeção de toxina ou PBS e no período de reperfusão em relação ao grupo Sham correspondente. No entanto, essa diferença desapareceu nos dias 1, 2, 3, 7 e 14 após lesão, Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e #($P < 0,001$).

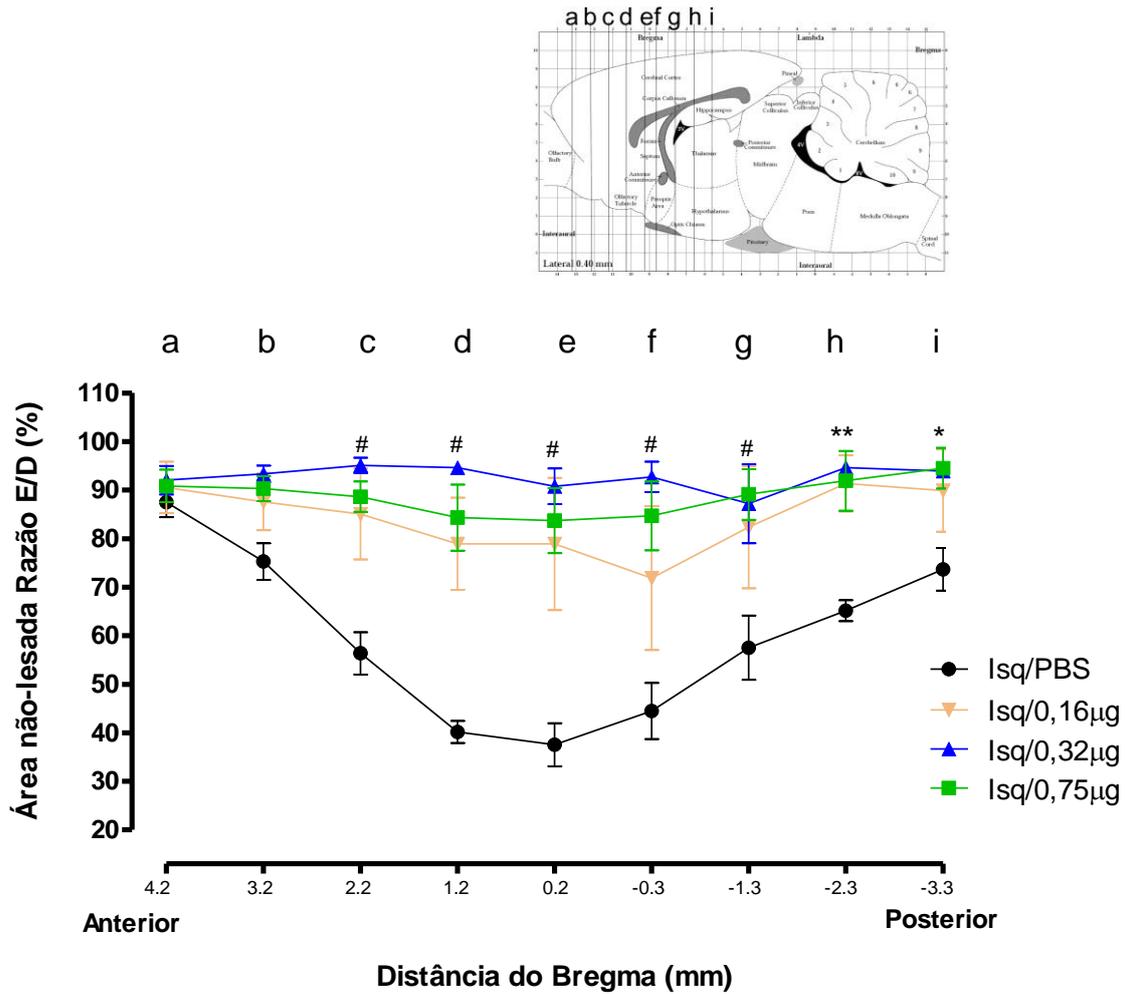


Figura 28. Integridade do tecido neural após oclusão transitória da ACM.

O cérebro dos animais foi seccionado em fatias de 200µm, corados com Vermelho Neutro e a área não lesada dos hemisférios direito e esquerdo foi calculada para cada corte. Em seguida, a área do hemisfério direito (não lesado) foi dividida pela do hemisfério esquerdo (lesado). As fatias foram agrupadas de acordo com sua referência de localização em relação ao Bregma. Os intervalos determinados foram os seguintes de 4,2 a 3,2mm; 3,2 a 2,2mm; 2,2 a 1,2mm; 1,2 a 0,2mm; 0,2 a -0,3mm; -0,3 a -1,3mm; -1,3 a -2,3mm; -2,3 a -3,3mm de distância do Bregma. Todas as fatias que pertenciam ao mesmo intervalo foram reunidas e foi calculada a média das razões entre a área do hemisfério direito e esquerdo. A partir dos valores da razão entre o hemisfério D/E foi calculada a porcentagem de integridade do tecido neural, através da fórmula: $1/(RazãoD/E) \times 100$. A porcentagem de integridade de tecido neural foi reduzida para todos os grupos isquemiados tratados com toxina em relação ao PBS, entre as coordenadas 2,2 e -3,3 do Bregma, Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni, *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e #($P < 0,001$).

Imagens de ressonância magnética estrutural do encéfalo de animais do grupo Isquemia/PBS/2horas e do grupo Isquemia/tox/2horas 24 horas após cirurgia com a área de lesão isquêmica demarcada são mostradas nas figuras 29 e 30, respectivamente.

A análise do volume de infarto demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Todos os grupos foram analisados utilizando-se o teste *t de student* não pareado, comparando Isquemia/PBS/30min e Isquemia/tox/30min ou Isquemia/PBS/2horas e Isquemia/tox/2horas, para os intervalos de 24 horas, 2 semanas e 5 semanas após lesão. O volume de infarto (mm^3) do grupo Isquemia/tox/30min foi menor que o do grupo controle 24 horas ($32,01 \pm 10,74$), grupo controle ($57,04 \pm 18,65$); 2 semanas ($14,62 \pm 7,8$), grupo controle ($56,34 \pm 17,05$); e 5 semanas pós-lesão ($4,4 \pm 3,5$), grupo controle ($39,44 \pm 18,09$) ($p < 0,05$), figura 31. O grupo isquemia/tox/2horas também apresentou menor volume de infarto em todos os tempos analisados, 24 horas ($32,48 \pm 7,8$), grupo controle ($112,9 \pm 42,01$); 2 semanas ($9,8 \pm 3,9$), grupo controle ($68,75 \pm 34,67$); e 5 semanas pós-lesão ($3,7 \pm 1,7$), grupo controle ($45,5 \pm 27,24$) ($p < 0,05$), figura 32.

Não houve diferença estatisticamente significativa no teste de assimetria bilateral entre os grupos (figura 33) e no peso corporal dos animais ao longo do experimento (figura 34).

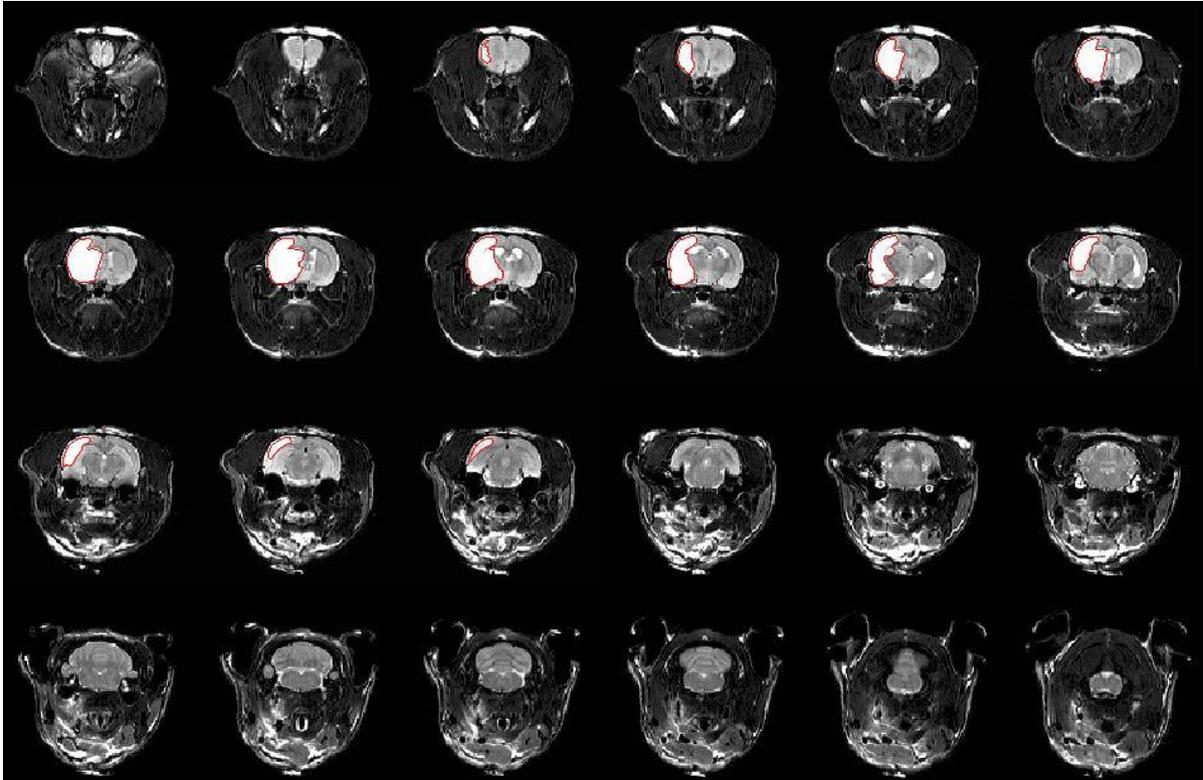


Figura 29. Imagem de ressonância magnética estrutural, grupo Isquemia/PBS/2horas, 24 horas após lesão.

Imagens de ressonância magnética estrutural do encéfalo dos animais foram obtidas 24 horas, 2 e 5 semanas após lesão. A figura mostra imagem de animal do grupo Isquemia/PBS/2horas obtidas 24 horas após início da lesão isquêmica com contornos da área lesada.

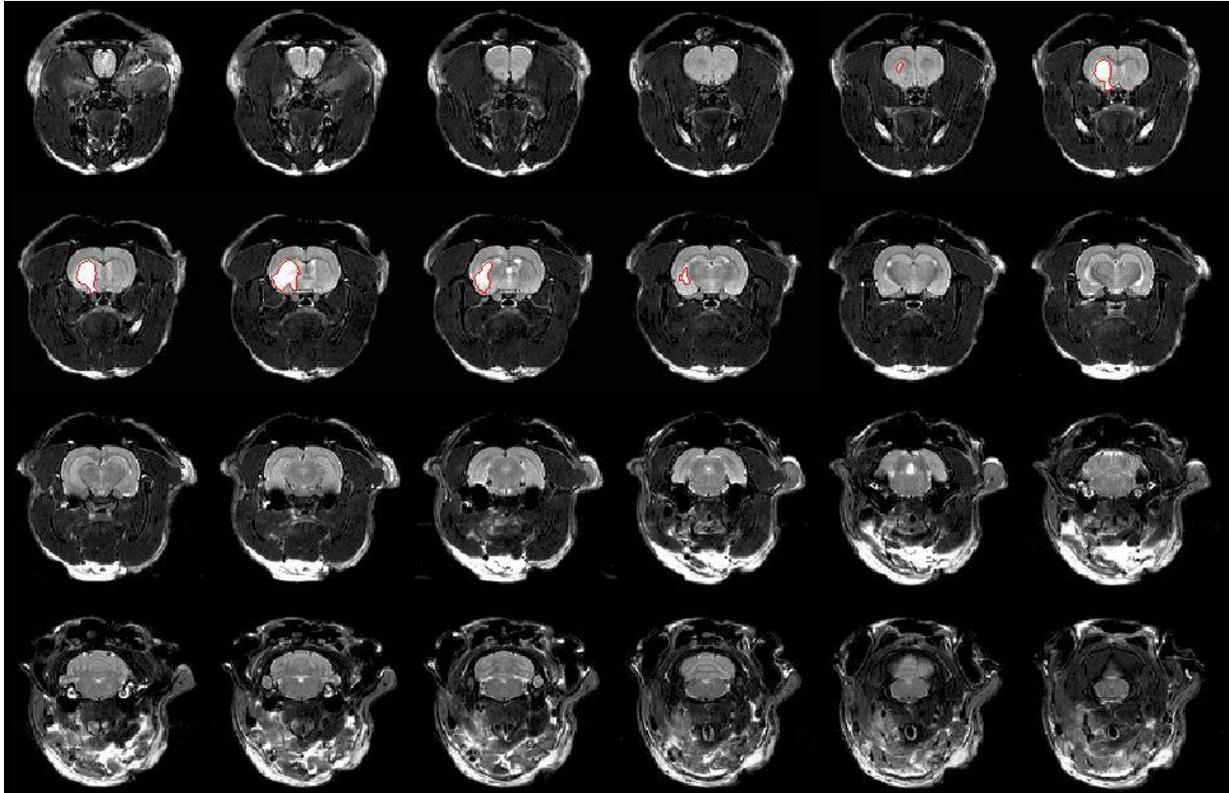


Figura 30. Imagem de ressonância magnética estrutural, grupo Isquemia/tox/2horas, 24 horas após lesão.

Imagens de ressonância magnética estrutural do encéfalo dos animais foram obtidas 24 horas, 2 e 5 semanas após lesão. A figura mostra imagem de animal do grupo Isquemia/PBS/2horas obtidas 24 horas após início da lesão isquêmica com contornos da área lesada.

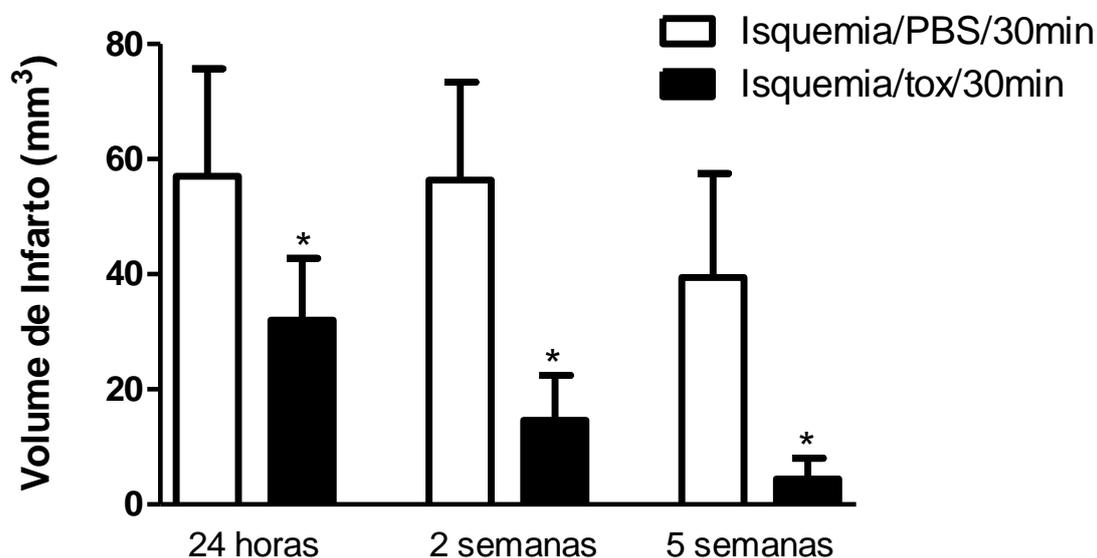


Figura 31. Volume de infarto (mm³) dos animais isquemiados tratados com toxina ou PBS 30 minutos após oclusão da ACM direita.

Os animais dos grupos Isquemia/PBS/30min e Isquemia/tox/30min foram tratados com toxina ou PBS 30 minutos após início do insulto isquêmico. Imagens de ressonância magnética estrutural foram obtidas 24 horas, 2 e 5 semanas após lesão. A análise estatística foi realizada utilizando-se teste t não pareado entre os grupos nos diferentes tempos de aquisição das imagens. O grupo Isquemia/tox/30min apresentou menor volume de infarto em todos os tempos analisados em relação ao grupo controle, *(p<0.05).

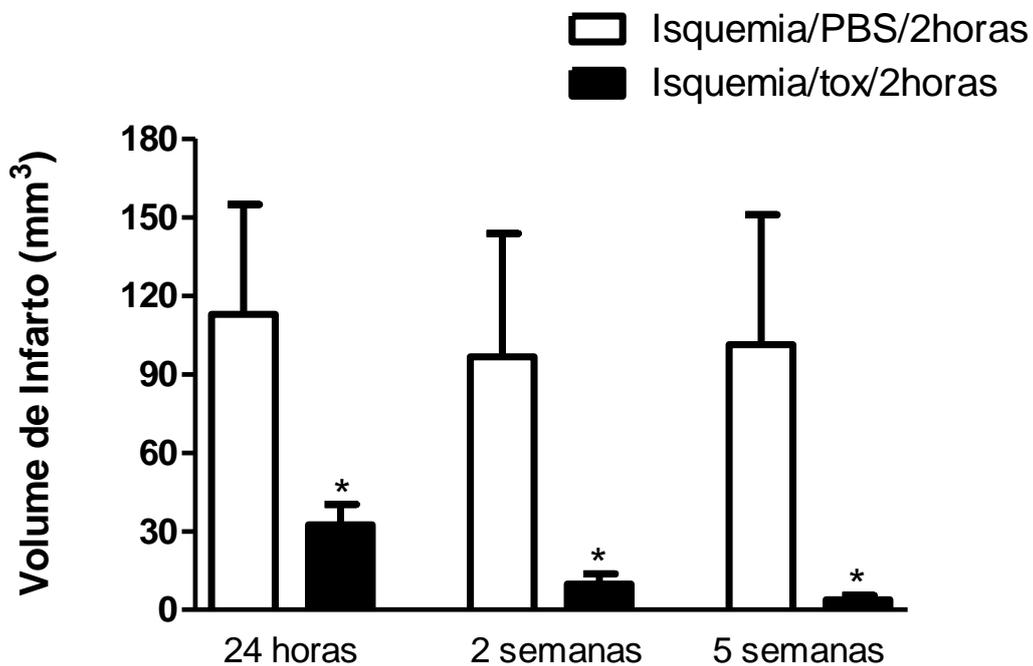


Figura 32. Volume de infarto (mm³) dos animais isquemiados tratados com toxina ou PBS 2 horas após oclusão da ACM direita.

Os animais dos grupos Isquemia/PBS/2horas e Isquemia/tox/2horas foram tratados com toxina ou PBS 2 horas após início do insulto isquêmico. Imagens de ressonância magnética estrutural foram obtidas 24 horas, 2 e 5 semanas após lesão. A análise estatística foi realizada utilizando-se teste t não pareado entre os grupos nos diferentes tempos de aquisição das imagens. O grupo Isquemia/tox/2horas apresentou menor volume de infarto em todos os tempos analisados em relação ao grupo controle, *(p<0.05).

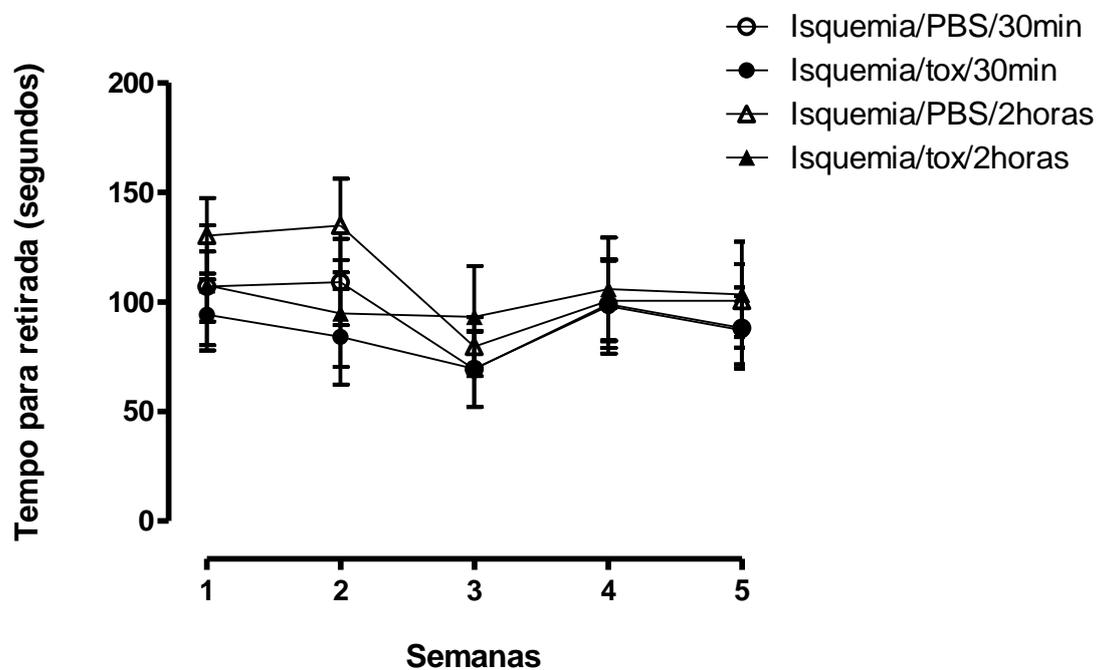


Figura 33. Teste de assimetria bilateral dos animais isquemiados tratados com toxina ou PBS ao longo das 5 semanas de experimento.

Os animais foram submetidos ao teste de assimetria bilateral uma vez por semana por 5 semanas após lesão. Esse teste tem como objetivo avaliar negligência sensório-motora. Uma fita adesiva é colocada em cada uma das patas anteriores do animal, que é então colocado na caixa de teste. Contou-se o tempo de latência para que o animal removesse completamente a fita de ambas as patas. Os dados foram analisados utilizando-se o teste Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos nos tempos analisados.

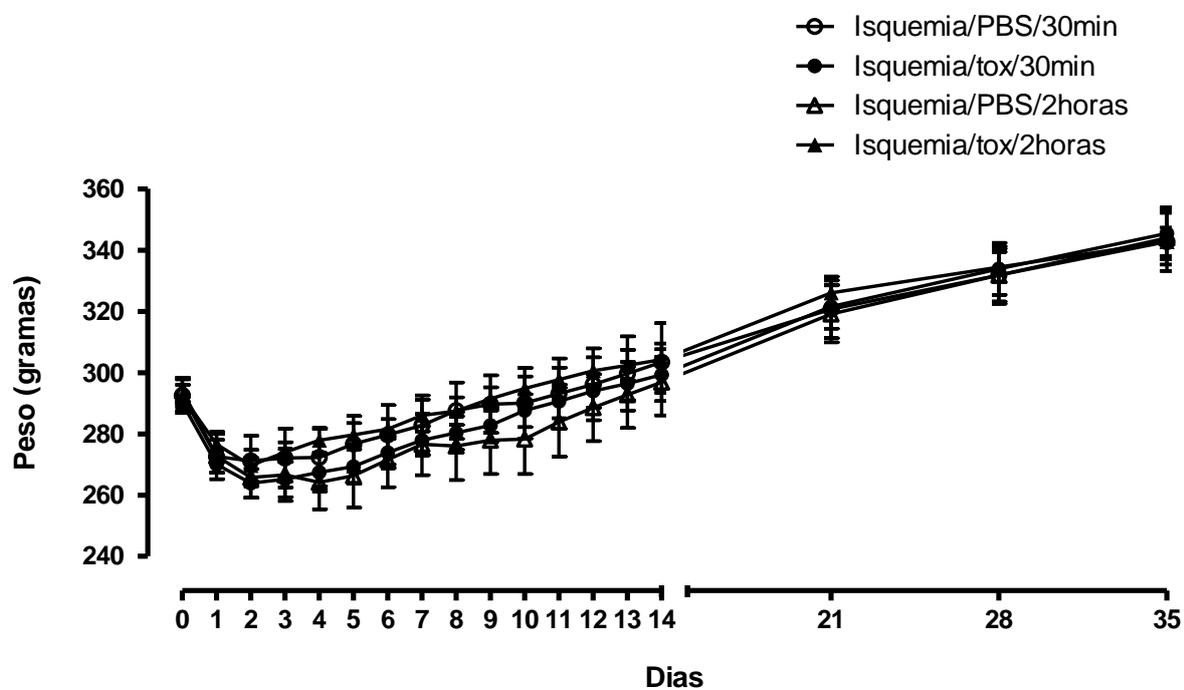


Figura 34. Peso corporal dos animais isquemiados ao longo das 5 semanas de experimento.

Os animais foram pesados do dia da cirurgia (dia 0) até 14 dias pós-isquemia todos os dias e uma vez por semana na terceira, quarta e quinta semanas. Os dados foram analisados utilizando-se o teste Two Way Anova, pós-teste de Bonferroni e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos nos tempos analisados.

5. Discussão

A injeção central da toxina Tx3-4 mostrou os efeitos dessa sobre o encéfalo, mesmo que alguns parâmetros tenham sido registrados periféricamente (FC e PAM). Uma vez injetada no ventrículo lateral, a toxina se difunde para o terceiro ventrículo, aqueduto cerebral e quarto ventrículo. Essas estruturas do sistema ventricular são margeadas pelo tronco encefálico e cerebelo. No tronco encefálico, encontra-se o Centro Vasomotor que controla FC, força de contração do coração e tônus vascular da maior parte dos vasos (Berne 2004). A toxina em contatos com essas estruturas de controle cardiovascular provocou alterações nesses parâmetros.

Embora as variações nos valores de FC não tenham sido estatisticamente significativas, observa-se uma diminuição dos mesmos nos primeiros minutos pós-injeção nos animais dos grupos 0,32 μ g; 0,75 μ g e 1,5 μ g. Essa diminuição ocorreu, embora o estresse do procedimento de microinjeção da toxina tenha causado aumento da FC como observado nos grupos PBS e 0,16 μ g. A partir do intervalo 3 (início dos 7 minutos pós-injeção), o grupo PBS fica com seus valores isolados no gráfico sem que as barras de erro se encontrem com as dos demais grupos. No entanto, a partir do intervalo 8 (início dos 22 minutos pós-injeção) os valores de todos os grupos se reaproximam e permanecem assim até o fim do registro. Essa variação dinâmica dos valores pode indicar uma difusão da toxina por sobre estruturas de controle da FC. Essa alteração não se manteve por mais de 20 minutos, mostrando que a ação da toxina sobre as estruturas responsáveis por essa resposta não é duradoura. O controle da FC foi modificado, mas logo restabelecido.

A variação nos valores da PAM teve uma dinâmica diferente daquela observada na FC. Inicialmente, a toxina não causou alterações na PAM, no entanto a partir do intervalo 10 (início dos 28 minutos pós-injeção) os valores começaram a variar. As doses 0,16µg, 0,32µg e 0,75µg causaram um aumento nos valores da PAM, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa, a dose 1,5µg causou aumento estatisticamente significativo nos valores de PAM cerca de 46 minutos após injeção. Esses resultados mostram que essa resposta da PAM foi dose-dependente. A maior dose pode ter atingido mais estruturas de controle cardiovascular que as demais ou ter atingido uma mesma região de maneira mais significativa. Como os registros foram interrompidos aos 60 minutos após injeção, não se sabe por quanto tempo esse efeito da toxina sobre a PAM permaneceu. As drogas antagonistas de canais de Ca²⁺ diminuem a atividade neuronal, acredita-se que o aumento da PAM tenha sido causado pela inibição de uma estrutura inibidora. Ou seja, alguma estrutura que inibe o tônus vascular pode ter tido sua ação diminuída pela toxina.

A discussão dos efeitos cardiovasculares é extremamente complexa, uma vez que inúmeras estruturas centrais desempenham papel de controle cardiovascular e nenhuma investigação foi feita no sentido de buscar as estruturas que estão envolvidas nos resultados observados.

Esperava-se que a toxina causasse diminuição na energia total do EEG de ambos os hemisférios cerebrais, uma vez que essa inibe a atividade neuronal. No entanto, esse raciocínio é simplista, uma vez que o registro eletroencefalográfico final é resultado da soma da energia das 5 bandas de frequência do EEG. A energia total do hemisfério direito (contralateral à

microinjeção) diminuiu após a injeção de toxina nas doses de 0,75µg e 1,5 µg. Coerente com esse fato, as bandas Alpha e Beta também diminuíram para essas mesmas doses. Já a energia total do hemisfério esquerdo (ipsilateral à microinjeção) não foi alterada por essas doses. A análise das bandas de frequência do EEG mostra que para a dose de 1,5µg, as bandas Alpha e Beta diminuíram, enquanto Delta e Gamma aumentaram. Ou seja, embora a energia total do hemisfério esquerdo não tenha sido alterada, houve grande variação nas bandas de frequência do EEG, que se equilibraram para gerar o resultado final.

Embora a injeção central da toxina tenha causado mudanças em alguns parâmetros fisiológicos, essas alterações não foram capazes de levar os animais à morte, mostrando a baixa toxicidade da mesma. Todos os animais permaneceram vivos por até 48 horas após a injeção da toxina. O modelo de isquemia experimental *in vitro* foi importante para mostrar a enorme capacidade dessa toxina em proteger os neurônios da morte, mas a técnica tem a limitação de não fornecer informações sobre a ação dessa toxina em um organismo vivo mesmo na ausência de isquemia. Esse resultado foi de extrema importância para a continuação dos trabalhos, uma vez que se a toxina matasse o animal, não haveria sentido continuar o estudo da mesma como potencial agente terapêutico na isquemia cerebral.

O efeito neuroprotetor da toxina Tx3-4 foi claramente comprovado em trabalhos anteriores (Pinheiro et al. 2006; Pinheiro et al. 2009) utilizando o modelo de isquemia cerebral *in vitro*. O trabalho publicado em 2009 mostrou que as toxinas Tx3-3 e Tx3-4 nas concentrações de 8nM foram mais eficientes que ω-conotoxina GVIA (bloqueadora de canais de Cálcio do tipo N) na

concentração de 1.0 μ M e a ω -conotoxina MVIIC (bloqueadora de canais de Cálcio do tipo N e P/Q) na concentração de 100nM em promover neuroproteção. Os resultados do nosso estudo, que utilizou modelo de isquemia experimental *in vivo*, mostraram a capacidade da toxina Tx3-4 em promover neuroproteção funcional de maneira dose dependente como mostrado por testes comportamentais.

O teste do cilindro foi eficiente em mostrar recuperação funcional em um estudo que envolveu ambiente enriquecido e migração celular após isquemia (Hicks et al. 2007). No entanto, em outro trabalho que investigou um agonista de receptor de estrogênio como agente neuroprotetor (Farr et al. 2007) os resultados foram similares aos encontrados nesse estudo, ou seja, o teste não foi capaz de detectar diferenças entre os grupos. Todos os animais isquemiados, tratados ou não tratados, praticamente não tocaram a parede do cilindro com a pata direita (contralateral à lesão).

O teste de assimetria bilateral é bem descrito na literatura e bastante utilizado em estudos que envolvem o modelo de oclusão transitória da ACM (Ashioti et al. 2007; Modo et al. 2000). Considera-se a avaliação do tempo de percepção da presença da fita como um teste sensorial e o tempo de retirada da fita adesiva como um teste motor. Ambos os parâmetros apresentaram representação gráfica similar com as mesmas diferenças estatísticas em relação aos resultados. Ou seja, o desempenho do córtex motor e sensorial primário no teste foram os mesmos. Os grupos tratados com as doses 0,32 μ g e 0,75 μ g mostraram melhor desempenho nesse teste nos dias 7 e 14 após lesão. No entanto, os animais que receberam a dose de 0,16 μ g só foram diferentes dos não tratados 14 dias pós-isquemia. Sabe-se que a morte neuronal

acontece durante episódio isquêmico e nas horas e dias subseqüentes ao insulto. A excitotoxicidade do glutamato e as despolarizações peri-infarto são responsáveis pela morte celular na fase aguda da isquemia e a inflamação e a apoptose na fase tardia. Diante desse resultado, acredita-se que a toxina promove neuroproteção nos primeiros instantes do evento isquêmico, ou seja, na fase aguda. As duas maiores doses conseguiram proteger um maior número de neurônios nas primeiras horas da lesão e conseqüentemente, diminuíram a morte por apoptose e eventos inflamatórios. A menor dose não foi tão eficiente em acelerar os processos de recuperação tecidual após lesão, uma vez que mais área foi afetada em relação às duas maiores doses, mas isso aconteceu, mesmo que tardiamente. No dia 14 após lesão, todas as 3 doses estudadas mostraram neuroproteção funcional, ou seja, embora a proteção na fase aguda tenha sido menor para a dose 0,16 μ g ela ainda foi suficiente para promover maior recuperação pós-lesão que os animais que não foram tratados com toxina.

Os testes do passo em falso e barras paralelas confirmaram a neuroproteção funcional mostrada pelo teste de assimetria bilateral. No dia 7 pós-lesão, os animais tratados com a dose de 0,16 μ g de toxina apresentaram melhor desempenho que os do grupo controle no teste do passo em falso, mas não no teste das barras paralelas. O passo em falso é um teste eficiente em revelar melhoras, requer uma habilidade motora mais simples que aquela exigida no teste das barras paralelas, que por ser um teste mais complexo é indicado para mensurar déficits. Sendo assim, animais tratados com a dose de 0,16 μ g de toxina apresentam recuperação funcional melhor, mas ainda déficits similares aos não tratados. Enquanto os grupos que receberam as doses

0,32 μ g e 0,75 μ g apresentam maior recuperação funcional e menos déficits que os que receberam PBS 7 dias após lesão.

No dia 14 após isquemia, apenas os animais que foram tratados com a maior dose de toxina (0,75 μ g) tiveram desempenho diferente dos tratados com PBS nos testes passo em falso e barras paralelas. Esse resultado se deve, principalmente, à recuperação espontânea que ocorre após lesão isquêmica, devido à reabsorção do edema local, remoção de metabólitos, resolução de processo inflamatório. Ou seja, todos os animais, inclusive os não tratados com toxina, tiveram seu desempenho funcional melhorado ao longo dos dias de experimento, mas aqueles tratados com a maior dose de toxina foram beneficiados pela neuroproteção promovida por esse bloqueador de canais de Ca⁺². Como o insulto inicial foi menor nos animais desse grupo, a recuperação a longo prazo foi diferente dos animais tratados com PBS ou doses menores de toxina. Em maior dose, esse antagonista de canais Ca⁺² foi capaz de agir sobre maior número de neurônios na área de penumbra isquêmica quando injetado durante processo isquêmico.

Nenhum animal sham apresentou déficit motor ou sensorial conseqüente à injeção central da toxina na ausência de processo isquêmico 7 ou 14 dias após isquemia. A presença de bloqueador de canais de Ca⁺² no tecido neural na ausência de processo isquêmico pode ser devastador para a função neuronal. Como os grupos não foram submetidos a testes funcionais nas primeiras horas ou dias após injeção i.c.v. da toxina, não se sabe se a função foi modificada nesse período.

O volume de lesão e o desempenho funcional estão relacionados em casos de isquemia cerebral (Lyden et al. 1997). Todos os animais tratados com

toxina apresentaram maior porcentagem de tecido neural íntegro em relação aos que receberam PBS. Esse dado é compatível com o resultado do teste de assimetria bilateral, que avalia córtex motor e sensorial primário, em que todos os animais tratados com toxina tiveram melhor desempenho motor. O mesmo não pode ser dito com relação aos testes passo em falso e barras paralelas que exigem integração de respostas motoras e não avaliam apenas uma área cerebral.

O peso corporal é um dado muito importante que informa sobre o estado geral do animal. Todos os grupos que receberam a toxina apresentaram maior ganho de peso pós-lesão em relação ao controle. Esse resultado está de acordo com o do volume de infarto, uma vez que lesões menores causam menos déficits aos animais.

Os resultados da análise dos registros de EEG mostraram que a ação da toxina sobre a atividade neuronal não é duradoura, ou seja, acontece apenas nas primeiras horas pós-injeção. Foram observadas diferenças na energia total do EEG entre os grupos sham e isquemia correspondentes apenas nos períodos antes e após injeção da toxina e no período de reperfusão. A partir do dia 1 após isquemia, essa diferença desapareceu indicando que a toxina não foi mais capaz de provocar alteração na atividade eletroencefalográfica registrada superficialmente. Se a toxina atua sobre a atividade neuronal de neurônios isquêmicos por um período menor que 24 horas, ela tem chance de intervir em mecanismos de morte celular agudos.

O intervalo de tempo entre o aparecimento de sintomas de lesão central e o atendimento médico adequado varia muito e pode ser extremamente longo (horas ou dias). Sendo assim, uma droga neuroprotetora eficaz deve

apresentar efeito positivo injetada algum tempo após o início da lesão. O tempo de 30 minutos após início da isquemia mostrou-se adequado para a ação da toxina e esse efeito neuroprotetor continuou com a toxina sendo injetada 2 horas após início da lesão. A análise estatística dos valores de volume de infarto das imagens de RM mostrou diferença entre os grupos de animais que foram submetidos à injeção da toxina ou PBS 2 horas após início do insulto isquêmico 24 horas, 2 e 5 semanas pós-lesão. Essa diferença entre o grupo tratado e controle não apareceu no teste de assimetria bilateral. A maioria dos animais apresentou lesão estriatal, ou seja, tinha o córtex motor e sensorial intactos e por isso tiveram bom desempenho nesse teste. O peso dos animais acompanhou o desempenho motor e não houve diferença entre os grupos.

Os resultados obtidos em testes de toxicidade e investigação do efeito neuroprotetor da toxina encorajam a continuação de estudos com o objetivo de transformar essa toxina em um agente terapêutico em casos de isquemia cerebral para se evitar a morte neuronal. Testes de tempos maiores da injeção da toxina após início da lesão devem ser realizados, uma vez que esses resultados são extremamente relevantes para a clínica. Além disso, estudos devem ser realizados com a injeção periférica da toxina, uma vez que a injeção central da toxina não é tão adequada na prática clínica.

6. Conclusão

A toxina Tx3-4, proveniente do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, exerce ação neuroprotetora sobre as funções motora e sensorial e sobre o volume de infarto de ratos Wistar machos submetidos à isquemia cerebral.

7. Referências Bibliográficas

- Arundine, M. and M. Tymianski, "Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity," *Cell Calcium* 34 (4-5): 325-337 (2003).
- Arundine, M. and M. Tymianski, "Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury," *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (6): 657-668 (2004).
- Ashioti, M. et al., "Multi-modal characterisation of the neocortical clip model of focal cerebral ischaemia by MRI, behaviour and immunohistochemistry," *Brain Res.* 1145: 177-189 (2007).
- Berne, R. M. Fisiologia. 2004. Elsevier.
Ref Type: Generic
- Bland, S. T. et al., "Early overuse and disuse of the affected forelimb after moderately severe intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery in rats," *Behavioural Brain Research* 126 (1-2): 33-41 (2001).
- Brown, M. M., "Brain attack: a new approach to stroke," *Clinical Medicine* 2 (1): 60-65 (2002).
- Calabresi, P. et al., "Synaptic plasticity in the ischaemic brain," *Lancet Neurology* 2 (10): 622-629 (2003).
- Cassola, A. C. et al., "omega-Phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*," *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 436 (4): 545-552 (1998).
- Castillo, J. et al., "Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: is it still a therapeutic option?," *Neurologia* 18 (7): 368-384 (2003).
- Charriaut-Marlangue, C. et al., "Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia," *Biomedicine & Pharmacotherapy* 52 (6): 264-269 (1998).
- Cheng, Y. D., L. Al Khoury, and J. A. Zivin, "Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure," *NeuroRx*. 1 (1): 36-45 (2004).
- Corbett, D. and S. Nurse, "The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia," *Progress in Neurobiology* 54 (5): 531-548 (1998).
- Cordeiro, M. D. et al., "Purification and Amino-Acid-Sequences of 6 Tx3-Type Neurotoxins from the Venom of the Brazilian Armed Spider *Phoneutria-Nigriventer* (Keys)," *Toxicon* 31 (1): 35-42 (1993).

- Costa, S. K. P. et al., "Activation by Phoneutria nigriventer spider venom of autonomic nerve fibers in the isolated rat heart," *European Journal of Pharmacology* 363 (2-3): 139-146 (1998).
- Costa, S. K. P. et al., "The effect of Phoneutria nigriventer (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats," *European Journal of Pharmacology* 298 (2): 113-120 (1996).
- Danbolt, N. C., "Glutamate uptake," *Progress in Neurobiology* 65 (1): 1-105 (2001).
- de Castro, C. J. et al., "Tx3-4 a toxin from the venom of spider Phoneutria nigriventer blocks calcium channels associated with exocytosis," *Neuroscience Letters* 439 (2): 170-172 (2008).
- Ding, Y. et al., "Motor balance and coordination functional outcome in rat with cerebral artery occlusion training enhances transient middle," *Neuroscience* 123 (3): 667-674 (2004a).
- Ding, Y. et al., "Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin," *Neuroscience* 124 (3): 583-591 (2004b).
- Ding, Y. C. et al., "Functional improvement after motor training is correlated with synaptic plasticity in rat thalamus," *Neurological Research* 24 (8): 829-836 (2002a).
- Ding, Y. C. et al., "Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion," *Behavioural Brain Research* 132 (1): 29-36 (2002b).
- Dos Santos, R. G. et al., "Phoneutria nigriventer omega-phonetoxin IIA blocks the Ca(v)2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites," *Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 13856-13862 (2002).
- Estato, V. et al., "Investigation of the haemodynamic effects of Phoneutria nigriventer venom in anaesthetised rabbits," *Toxicon* 38 (6): 841-853 (2000).
- Farr, T. D. et al., "Estrogen receptor beta agonist diarylpropionitrile (DPN) does not mediate neuroprotection in a rat model of permanent focal ischemia," *Brain Res.* 1185: 275-282 (2007).
- Fau, S. et al., "Effect of the reperfusion after cerebral ischemia in neonatal rats using MRI monitoring," *Exp.Neurol.* 208 (2): 297-304 (2007).
- Feuerstein, G. Z. and X. K. Wang, "Animal models of stroke," *Molecular Medicine Today* 6 (3): 133-135 (2000).

- Fisher, M., "Stroke and TIA: epidemiology, risk factors, and the need for early intervention," *Am.J.Manag.Care* 14 (6 Suppl 2): S204-S211 (2008).
- Gass, A. et al., "Diffusion-weighted MRI for the "small stuff": the details of acute cerebral ischaemia," *Lancet Neurol.* 3 (1): 39-45 (2004).
- Guatimosim, C. et al., "A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis," *British Journal of Pharmacology* 122 (3): 591-597 (1997).
- Guidine, P. A. M. et al., "Carbamazepine protects the CNS of Wistar rats against the central effects of scorpion envenomation," *Neurotoxicology* 29 (1): 136-142 (2008).
- Hicks, A. U. et al., "Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke," *Neuroscience* 146 (1): 31-40 (2007).
- Hossmann, K. A., "Experimental models for the investigation of brain ischemia," *Cardiovascular Research* 39 (1): 106-120 (1998).
- Hunter, A. J. et al., "Functional assessments in mice and rats after focal stroke," *Neuropharmacology* 39 (5): 806-816 (2000).
- Jiang, Q. et al., "The temporal evolution of MRI tissue signatures after transient middle cerebral artery occlusion in rat," *J.Neurol.Sci.* 145 (1): 15-23 (1997).
- Kobayashi, T. and Y. Mori, "Ca²⁺ channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia," *European Journal of Pharmacology* 363 (1): 1-15 (1998).
- Leao, R. M. et al., "Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-*Phoneutria nigriventer* Tx3-3 peptide toxin," *Neuropharmacology* 39 (10): 1756-1767 (2000).
- Lee, M. H. et al., "Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils," *Life Sciences* 73 (19): 2455-2465 (2003).
- Longa, E. Z. et al., "Reversible Middle Cerebral-Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats," *Stroke* 20 (1): 84-91 (1989).
- Lovblad, K. O. et al., "Magnetic resonance imaging of the ischaemic penumbra," *Swiss Med.Wkly.* 133 (41-42): 551-559 (2003).
- Love, S., "Apoptosis and brain ischaemia," *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (2): 267-282 (2003).
- Lucas, S., "Spiders in Brazil," *Toxicon* 26 (9): 759-772 (1988).

- Lyden, P. D. et al., "Effect of ischemic cerebral volume changes on behavior," *Behavioural Brain Research* 87 (1): 59-67 (1997).
- Marshall, J. W., A. R. Green, and R. M. Ridley, "Comparison of the neuroprotective effect of clomethiazole, AR-R15896AR and NXY-059 in a primate model of stroke using histological and behavioural measures," *Brain Res.* 972 (1-2): 119-126 (2003).
- McGeer, E. G. and P. L. McGeer, "Some factors influencing the neurotoxicity of intrastriatal injections of kainic acid," *Neurochem.Res.* 3 (4): 501-517 (1978).
- McGeer, E. G., P. L. McGeer, and K. Singh, "Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract," *Brain Res.* 139 (2): 381-383 (1978).
- McRobbie, D. W, Moore, E. A, Graves, M. J, and Prince, M. R. MRI:From Picture to Proton. 2007. Cambridge University Press.
Ref Type: Generic
- Meldrum, B. S., "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology," *J.Nutr.* 130 (4S Suppl): 1007S-1015S (2000).
- Memezawa, H., M. L. Smith, and B. K. Siesjo, "Penumbra Tissues Salvaged by Reperfusion Following Middle Cerebral-Artery Occlusion in Rats," *Stroke* 23 (4): 552-559 (1992).
- Mesquita, M. B. S. Analise Multi-Modal (EEG+Ressonancia Nuclear Magnetica Funcional) dos efeitos de injecoes centrais da fracao toxica TsTX do veneno do escorpiao *Tityus serrulatus* em ratos Wistar adultos. 2004. UFMG.
Ref Type: Generic
- Miljanich, G. P. and J. Ramachandran, "Antagonists of Neuronal Calcium Channels - Structure, Function, and Therapeutic Implications," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35: 707-734 (1995).
- Miranda, D. M. et al., "Phoneutria nigriventer toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes," *Neuroreport* 9 (7): 1371-1373 (1998).
- Modo, M. et al., "Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion," *Journal of Neuroscience Methods* 104 (1): 99-109 (2000).
- Mody, I. and J. F. Macdonald, "Nmda Receptor-Dependent Excitotoxicity - the Role of Intracellular Ca²⁺ Release," *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (10): 356-359 (1995).

- Neumann-Haefelin, T. et al., "Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation," *Stroke* 31 (8): 1965-1972 (2000).
- Nishizawa, Y., "Glutamate release and neuronal damage in ischemia," *Life Sciences* 69 (4): 369-381 (2001).
- Nudo, R. J. and R. J. Nelson, "Animal models of stroke and rehabilitation - Introduction," *Ilar Journal* 44 (2): 81-82 (2003).
- Olivera, B. M. et al., "Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins," *Annu.Rev.Biochem.* 63: 823-867 (1994).
- Olney, J. W., "Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion," *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 28 (3): 455-474 (1969).
- Oneill, M. J. et al., "Effects of Ca²⁺ and Na⁺ channel inhibitors in vitro and in global cerebral ischaemia in vivo," *European Journal of Pharmacology* 332 (2): 121-131 (1997).
- Paxinos, G. 1995. Cerebral Vascular System. In *The Rat Nervous System*. Second ed. Edited by Academic Press. San Diego.
- Paxinos, G. and C. Watson. 1998. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 4 ed. San Diego.
- Pinheiro, A. C. D. et al., "Phoneutria Spider Toxins Block Ischemia-Induced Glutamate Release, Neuronal Death, and Loss of Neurotransmission in Hippocampus," *Hippocampus* 19 (11): 1123-1129 (2009).
- Pinheiro, A. C. N. et al., "Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider Phoneutria nigriventer," *Neurochemistry International* 49 (5): 543-547 (2006).
- Prado, M. A. M. et al., "A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: The toxin Tx3-3 from the venom of the spider Phoneutria nigriventer," *Biochemical Journal* 314: 145-150 (1996).
- Rajendra, W., A. Arumugam, and K. Jeyaseelan, "Neuroprotection and peptide toxins," *Brain Research Reviews* 45 (2): 125-141 (2004).
- Reglodi, D., A. Tamas, and I. Lengvari, "Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats," *Brain Research Bulletin* 59 (6): 459-466 (2003).

- Reis, H. J. et al., "Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*," *Biochemical Journal* 343: 413-418 (1999).
- Rezende, L. et al., "Isolation of Neurotoxic Peptides from the Venom of the Armed Spider *Phoneutria-Nigriventer*," *Toxicon* 29 (10): 1225-1233 (1991).
- Riek-Burchardt, M. et al., "Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia," *Journal of Neuroscience Methods* 137 (2): 227-233 (2004).
- Saposnik, G. and O. H. Del Brutto, "Stroke in South America - A systematic review of incidence, prevalence, and stroke subtypes," *Stroke* 34 (9): 2103-2107 (2003).
- Sattler, R. and M. Tymianski, "Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity," *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 78 (1): 3-13 (2000).
- Tamura, M. et al., "Cerebroprotective action of a Na⁺/Ca²⁺ channel blocker NS-7 - II. Effect on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of permanent middle cerebral artery occlusion in rats," *Brain Research* 890 (1): 170-176 (2001).
- Tanaka, K. et al., "A novel voltage-sensitive Na⁺ and Ca²⁺ channel blocker, NS-7, prevents suppression of cyclic AMP-dependent protein kinase and reduces infarct area in the acute phase of cerebral ischemia in rat," *Brain Research* 924 (1): 98-108 (2002).
- Troncone, L. R. et al., "Promiscuous and reversible blocker of presynaptic calcium channels in frog and crayfish neuromuscular junctions from *Phoneutria nigriventer* spider venom," *J.Neurophysiol.* 90 (5): 3529-3537 (2003).
- Turkstra, L. S., A. L. Holland, and G. A. Bays, "The neuroscience of recovery and rehabilitation: What have we learned from animal research?," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 84 (4): 604-612 (2003).
- Vieira, L. B. et al., "Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6," *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 314 (3): 1370-1377 (2005).
- Vieira, L. B. et al., "PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes," *Neurochemistry International* 42 (4): 277-282 (2003).
- White, B. C. et al., "Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury," *Journal of the Neurological Sciences* 179 (1-2): 1-33 (2000).

- Wiat, M. et al., "Magnetic resonance imaging (MRI) of inflammation in stroke," *Conf.Proc.IEEE Eng Med.Biol.Soc.* 2007: 4316-4319 (2007).
- Winstein, C. J., A. S. Merians, and K. J. Sullivan, "Motor learning after unilateral brain damage," *Neuropsychologia* 37 (8): 975-987 (1999).
- Yenari, M. A. et al., "Time-course and treatment response with SNX-111, an N-type calcium channel blocker, in a rodent model of focal cerebral ischemia using diffusion-weighted MRI," *Brain Res.* 739 (1-2): 36-45 (1996).
- Zausinger, S. et al., "Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms," *Brain Research* 863 (1-2): 94-105 (2000).
- Zhang, L. et al., "Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats," *Journal of the Neurological Sciences* 174 (2): 141-146 (2000).