

Bruno Lapertosa Drummond

SUBFRAÇÃO PnTx 3-6 DO VENENO DA ARANHA  
ARMADEIRA (*Phoneutria nigriventer*) NO TRATAMENTO  
DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO TRAUMA AGUDO  
COMPRESSIVO À MEDULA ESPINHAL

Dissertação apresentada à UFMG, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Ciência Animal, área de  
concentração Clínica e Cirurgia  
Veterinárias.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte

2010

D795s Drummond, Bruno Lapertosa, 1983-

Subfração PnTx 3-6 do veneno da aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*) no tratamento de ratos Wistar submetidos ao trauma agudo compressivo à medula espinhal / Bruno Lapertosa Drummond – 2010.

52 p. : il.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Aranha – Veneno – Teses. 3. Medula espinhal – Teses. 4. Medicamentos – Administração – Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.088 5

Folha de Aprovação / Assinatura da banca examinadora

Dedico este trabalho aos meus  
pais pelo apoio, e incentivo  
incondicionais.

## **Agradecimentos**

A Flávia pelo carinho, companheirismo e compreensão em todos os momentos.

A Professora Eliane Gonçalves de Melo pela orientação, paciência ajuda na realização deste trabalho.

A Fátima Caldeira pelo incentivo, companheirismo e ajuda constantes.

A Mariana e ao Victor, meus irmãos e melhores amigos, por acreditarem sempre em mim.

Ao Flávio Mourão e ao Rodrigo Miranda pela amizade e momento compartilhado.

Ao Juneo Freitas e a Rose por toda a paciência, ajuda e disposição.

A PL pelo companheirismo.

A Fabíola Fukoshima e ao Fernando Campolina pela amizade e carinho.

Aos professores André Ricardo Massensini, Marília Martins Melo, Rogéria Serakides e Natália de Melo Ocarino por todo auxílio na realização deste projeto.

Ao Mário Lavor, a Isabel Rosado, a Paula Mayer e aos alunos de iniciação científica pelo ótimo convívio e ajuda na concretização deste trabalho.

Ao Laboratório Cristália pelos fármacos cedidos.

A todas as pessoas não aqui citadas, não por isso menos importante e que muito me ajudaram no desenvolvimento deste estudo, o meu muito obrigado.

I finally figured out the only reason to be alive is to enjoy it.

Rita Mae Brown

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	<b>13</b>
2.1. Trauma medular .....	13
2.2. Patofisiologia do trauma medular agudo.....	14
2.3. Tratamento do trauma medular .....	17
2.4. Modelos experimentais para estudo do trauma medular .....	18
2.5. Toxinas de <i>Phoneutria nigriventer</i> .....	19
2.6. Avaliações clínicas motoras .....	21
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>26</b>
3.1. Toxina PnTx3-6 .....	26
3.2. Animais .....	26
3.3. Procedimento cirúrgico .....	27
3.4. Tratamentos.....	28
3.5. Avaliações motoras .....	29
3.6. Avaliação anatomopatológica da medula espinhal .....	30
3.7. Imunohistoquímica.....	30
3.8. Análise estatística.....	31
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>31</b>
4.1. Avaliações macro e microscópicas da medula espinhal e imunohistoquímica .....	37
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>43</b>
<b>6. Anexos</b> .....	<b>44</b>
6.1. Anexo 1 - Protocolo de aprovação do CETEA UFMG.....	44
6.2. Anexo 2 - Dados individuais obtidos no teste de BBB .....	45
6.3. Anexo 3 - Dados individuais obtidos na avaliação do reflexo de retirada .....	46
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	<b>47</b>

## Lista de figuras

- Figura 1.** Fotografias do procedimento de trauma medular em ratos Wistar. A) Aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFGM. B) Laminectomia utilizando drill pneumático neurológico C) Momento da injúria medular do tipo contusiva/compressiva.....28
- Figura 2.** Injeção do tratamento (PBS ou PnTx3-6) na medula espinhal lesionada. A) Sistema completo constituído de uma micro-seringa acoplada a um tubo PE-10 e uma agulha ortodôntica curta de 30G. B) Agulha posicionada na local da lesão para administração do tratamento.....29
- Figura 3.** Gráfico de teste de Basso, Beattie e Brasnahan com as medianas de ratos wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou à trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3-6, avaliados por 8 dias.....33
- Figura 4.** Gráfico de teste do plano inclinado com as medianas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou a trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3-6, avaliados por 8 dias.....36
- Figura 5.** A) Visão geral da medula na região da laminectomia de um animal do grupo G1 (controle) (Aumento de 8,8x H.E) B) Substância cinzenta e branca apresentando características de normalidade (Aumento de 34x H.E.) C e D) Visão em detalhe da substância cinzenta, mostrando corpos neuronais (seta larga), astrócitos (seta fina) e oligodendrócitos (cabeça de seta) (Aumento de 80x H.E.) .....38
- Figura 6** A) Visão geral da medula na região do epicentro de um animal do grupo G2 (PBS)(Aumento de 7,2x H.E.) B) Visão geral da medula na região do epicentro de um animal do grupo G3 (PnTx 3-6) (Aumento de 5,2x H.E.).....40
- Figura 7.** A) Visão geral da degeneração das substâncias branca e cinzenta com presença de malácia e células gitter (Aumento de 12x H.E.) B) Células gitter (seta) e necrose neuronal na substância cinzenta (Aumento de 96x H.E.) C) Neuroniofagia (seta) (Aumento de 80x H.E.) D) Neurônios degenerados(seta) em maior aumento e células gitter (Aumento de 80x H.E.) E) Degeneração da substância branca com tumefação axonal (Aumento de 80x H.E.).....41
- Figura 8** Cortes histológicos com neurônios marcados pela proteína Neu-N (Seta), no corno ventral (A) e dorsal (B) da substância cinzenta (Aumento de 80x Imunohistoquímica).....43

## Lista de tabelas

- Tabela 1.** Escores e características<sup>a</sup> locomotoras segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).....24
- Tabela 2.** Teste de Basso, Beattie e Bresnahan com as medianas de ratos wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou à trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3.6, avaliados por 8 dias.....33
- Tabela 3.** Teste do plano inclinado com as medianas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3-6, avaliados por 8 dias.....36
- Tabela 4.** Médias e desvio padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos em ratos Wistar .....42

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da subfração PnTx3-6, oriunda do veneno de *Phoneutria nigriventer*, sobre a lesão medular aguda em ratos Wistar. Foram utilizados 18 animais, machos, com aproximadamente três meses de idade, pesando em média 350g. Os animais foram submetidos a laminectomia (Grupo G1 – controle negativo) da décima segunda vértebra torácica, sendo 12 destes (Grupos G2 e G3) submetidos ainda ao trauma medular compressivo com uso de um aparelho estereotáxico, com peso de 70g por cinco minutos, exercendo pressão direta sobre a medula espinhal. Após 30 minutos, foi administrado o tratamento aos animais traumatizados por meio de injeção intramedular no local da lesão. Os animais do grupo G2 (controle positivo) receberam 2µl de PBS, enquanto os animais do grupo G3 receberam 200pMol de PnTx3-6 diluídos em 2 µl de PBS. Avaliações da função neurológica foram realizadas 24 horas após o trauma e diariamente por oito dias a fim de analisar a graduar as funções motoras e sensitivas no período pós cirúrgico, bem como a recuperação destas quando presente. No oitavo dia pós-cirúrgico, os animais foram eutanasiados e tiveram o tecido medular coletado para avaliações morfológicas microscópicas e para avaliação da integridade neuronal por imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-NeuN. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os Grupos G2 e G3 nas diferentes avaliações motoras. As avaliações descritivas dos segmentos medulares avaliados indicaram lesões mais brandas nos animais pertencentes ao grupo tratado com a PnTx3-6, quando comparados ao grupo tratado com PBS, onde maiores regiões de malácia foram observadas. No entanto, esta observação não se repetiu na avaliação por imunohistoquímica, na qual não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Sugere-se, assim, que a subfração PnTx3-6, na dose de 200pMol por via intralesional, administrada 30 minutos após o trauma medular, não foi capaz de promover neuroproteção, não diminuindo a gravidade das lesões secundárias decorrentes do trauma medular primário. Sugere-se, ainda, que outros estudos, com diferentes doses, tempos de administração e observação e intensidade do trauma sejam realizados.

Palavras-chave: Trauma medular, *Phoneutria nigriventer*, PnTx3-6, rato, avaliações motoras

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the PnTx3-6 sub fraction, derived from *Phoneutria nigriventer* toxin, on acute spinal trauma in Wistar rats. Eighteen male animals, approximately three months old, weighting an average of 350g were used. All animals underwent laminectomy (Group G1 – negative control) on 12<sup>th</sup> thoracic vertebrae, and 12 of them (Groups G2 and G3) were also submitted to compressive spinal injury by a weight drop model (70g for five minutes) applying pressure directly over the duramater. After 30 minutes, treatment was administered to the traumatized animals by intra medullar injection at the lesion site. Animals from group G2 (positive control) received 2µl of PBS, while animals from group G3 received 200pMol of PnTx3-6 diluted in 2 µl of PBS. Neurological function evaluations were performed 24 hours after trauma and daily for eight days in order to analyze and graduate motor and sensitive functions over post surgical period, as well as recovery when applicable. On the eighth day post surgery, animals were euthanized and had their spinal tissue collected for microscopic morphological and neuronal integrity evaluation by immunohistochemistry with anti-NeuN monoclonal antibody. No significant statistical differences were found between groups G2 and G3 in all behavioral tests. Descriptive evaluations of the spinal segments analyzed outpointed to milder lesions in animals treated with PnTx3-6, when compared to animals treated only with PBS, where larger areas of degeneration were observed. Nevertheless, this observation was not seen on immunohistochemistry labeled slides, where no relevant statistical difference between treatments was observed. We suggest, this way, that the PnTx3-6 sub fraction, on the dose of 200pMol, administered by intralesional injection 30 minutes after trauma, was not able to promote neuroprotection, not reducing the gravity of secondary lesions due to spinal injury primary lesions. Still, further studies using different doses, periods of treatment, observation and trauma intensity should be carried out to elucidate the real efficacy or inefficacy of this toxin.

Keywords: Spinal cord injury, *Phoneutria nigriventer*, PnTx3-6, rat, behavioral tests

## 1. Introdução

Os traumas à medula espinhal são comuns na medicina humana e veterinária, e geralmente acarretam graves conseqüências aos indivíduos acometidos, como perda parcial ou total das funções sensitivas, motoras e autonômicas. Além da inaptidão para retornar à vida normal, somam-se perdas financeiras geradas pelos elevados custos médicos. Na medicina veterinária, a lesão medular muitas vezes resulta em eutanásia do animal afetado, e conseqüente estresse físico e emocional dos proprietários (Bergman et al. 2000, Dumont et al., 2001).

A injúria à medula espinhal, geralmente de natureza irreversível, é resultante de um fator primário, que se origina de forças mecânicas o qual acarreta uma seqüência de eventos bioquímicos e celulares que causam a lesão secundária (Bergman et al. 2000, Dumont et al., 2001). Essas alterações secundárias caracterizam-se por diversos distúrbios locais, tais como comprometimento da circulação local, isquemia, edema e inflamação. São causadas por uma cascata de eventos intra e extracelulares conseqüentes à privação de oxigênio, mudanças nas concentrações iônicas e liberação anormal de neurotransmissores como o glutamato (Dumont et al., 2001).

Portanto, o objetivo do tratamento de pacientes com lesão espinhal é, principalmente, prevenir as alterações celulares desencadeantes dos eventos secundários possibilitando a recuperação neurológica (Lanz et al., 2000).

Os tratamentos mais comuns em medicina veterinária se fundamentam principalmente na administração de antiinflamatórios, sendo os corticóides ampla e rotineiramente utilizados em lesões da medula espinhal e cirurgias (Olby, 1999; Bergman et al., 2000; Olby et al., 2005).

Por outro lado, para o tratamento da injúria aguda à medula espinhal admite-se que, o bloqueio dos canais para  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , e de neurotransmissores poderia diminuir a isquemia e conseqüentes alterações geradas no local, bem como a apoptose, visto que este é o principal mecanismo de morte neuronal e conseqüente perda das funções (Hall e Springer, 2004; Faden e Stoica, 2007).

Neste contexto, surgem os venenos produzidos por animais que, possuem, em sua maioria, composições elaboradas e complexas, constituindo uma vasta biblioteca, com enorme potencial farmacológico a ser explorado (Gomez et al., 2002). Suas toxinas, dentre elas as produzidas pela *Phoneutria nigriventer*, possuem propriedades terapêuticas, que potencialmente resultariam em novos fármacos.

O veneno da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer*, tem importância na identificação e definição farmacológica de diferentes canais iônicos presentes nas células do organismo de mamíferos. A purificação e o fracionamento desse veneno têm permitido avanços na descoberta de sítios e mecanismos de ação celulares. Dentre suas diferentes frações isoladas, destaca-se a PnTx-3 pelo seu efeito sobre os canais iônicos presentes no sistema nervoso. A subfração PnTx3-6 inibe os canais de

Ca<sup>2+</sup> diminuindo sua concentração intracelular e a liberação de glutamato dependente de Ca<sup>2+</sup> (Vieira et al., 2003).

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da subfração PnTx3-6 da toxina oriunda do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* no tratamento de ratos Wistar submetidos ao trauma agudo da medula espinhal. Especulou-se assim, pela primeira vez, uma possível atuação da fração PnTx3 sobre o trauma medular agudo.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Trauma medular

O trauma à medula espinhal pode ser definido com uma lesão resultante de um traumatismo sobre a medula espinhal, comprometendo completa ou parcialmente, suas funções principais, motora, sensitiva, autonômica e reflexa (Dumont et al., 2001).

As lesões medulares são comuns na medicina humana e veterinária, e ainda hoje uma importante causa de morbidade e mortalidade, acarretando graves consequências aos indivíduos acometidos (Bergman et al., 2000). Mais de 10000 norte americanos, a grande maioria abaixo dos 30 anos de idade, são acometidos anualmente pelo trauma medular (Sekhon e Fehlings, 2001). Além da perda física sofrida por estes indivíduos, somada aos custos financeiros, o trauma medular possui efeitos psicossociais profundos e devastadores para os pacientes, familiares e amigos (Dumont et al., 2001).

Na medicina veterinária as causas mais comuns de trauma agudo à medula espinhal em cães e gatos incluem hérnia aguda do disco intervertebral, traumas (causando fraturas e luxações de vértebras ou lesões por hiperextensão), e eventos vasculares, como trombo fibrocartilagenoso. Geralmente, os animais acometidos são eutanasiados, resultando assim em estresse emocional e psicológico dos proprietários (Bergman et al., 2000; Dumont et al., 2001).

Diferentes tipos de trauma podem ser infligidos sobre a medula espinhal dentre os quais podem-se destacar concussão, compressão, laceração e isquemia (Olby et al., 2005). Estas forças são responsáveis pela lesão mecânica primária sobre a medula espinhal a qual em sua forma mais discreta causaria uma concussão com déficits neurológicos transitórios e em sua forma mais grave, paralisia completa e permanente. Enquanto a lesão discreta pode ser caracterizada por despolarização axonal e perda transitória da função, a lesão grave é caracterizada por lesões axonal e neuronal primária, seguida por lesão tecidual secundária que se expande a partir do local central da lesão (epicentro) (McDonald e Sadowsky, 2002; Kwon et al., 2004).

A lesão primária inicia uma cascata de eventos que causa redução progressiva da perfusão sanguínea e necrose neuronal. A extensão da injúria tecidual primária, assim como a lesão secundária está diretamente relacionada à energia aplicada sobre a medula espinhal no momento do trauma. O dano tecidual secundário ocorre em sua maioria nas primeiras

48 horas após a lesão primária (Olby et al., 2005).

As intervenções clínico-cirúrgicas empregadas atualmente frente ao trauma medular agudo visam minimizar a lesão secundária e proteger os elementos neurais remanescentes no sítio da injúria primária. Estudos em animais demonstram persistência da função neurológica com a preservação de 1,4% a 12% do número total de axônios neste local (Fehlings e Tator, 1995). Sob a hipótese de que, mesmo pequenos ganhos em intervenções neuroprotetoras podem surtir efeitos funcionais relevantes à recuperação neurológica, é que se torna de extrema importância que os pacientes acometidos recebam cuidados clínicos emergenciais após o trauma, suplementados por intervenções farmacológicas neuroprotetoras quando apropriado (Kwon et al., 2004; Hall e Springer, 2004; Rosenzweig e McDonald, 2004).

## **2.2. Patofisiologia do trauma medular agudo**

As lesões primárias aplicadas à medula espinhal geralmente podem ser classificadas em quatro mecanismos característicos: I) Impacto com compressão persistente; II) Impacto isolado, com compressão temporária; III) Distração e; IV) Laceração / transecção. O mais comum destes mecanismos, impacto com compressão persistente, pode ser observado em hérnias de disco, luxações vertebrais e fraturas com fragmentos ósseos comprimindo a medula (Dumont et al., 2001).

O trauma mecânico inicial tende a lesar primariamente a substância cinzenta, poupando a substância branca, principalmente em sua porção periférica. A maior susceptibilidade da substância cinzenta à lesão se deve a sua consistência mais macia e maior vascularização. Evidências de hemorragia no interior da medula espinhal se desenvolvem rapidamente, e o fluxo sanguíneo é interrompido após a lesão primária, resultando em infarto local, hipóxia e isquemia (McDonald e Sadowsky, 2002). Essa condição é particularmente prejudicial à substância cinzenta, devido à sua alta demanda metabólica. Os neurônios que se encontram no local da lesão primária são rompidos e sofrem redução da mielinização com consequente interrupção da transmissão nervosa por microhemorragias e edema próximo ao local da lesão (Young, 1993).

Imediatamente após a injúria primária, ocorre infiltração por neutrófilos que secretam citocinas e enzimas líticas que podem agravar a lesão tecidual e recrutarem outras células (Popovich et al., 1997). Monócitos e macrófagos oriundos da circulação, assim como as células locais da micróglia são ativados e fagocitam o tecido lesado (Dusart e Schwab, 1994). Estas e outras células reativas produzem citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas e interferons, que compõem a resposta inflamatória e contribuem com o dano tecidual (Klusman e Schwab, 1997).

Hipotensão, hipovolemia com consequente isquemia na medula espinhal são considerados como os aspectos mais importantes na lesão secundária, ainda que o mecanismo pelo

qual a isquemia ocorre ainda não esteja inteiramente elucidado (Dumont et al., 2001; Kwon et al., 2004).

O rompimento mecânico da microvasculatura causado pelo trauma primário leva a formação de hemorragia e trombose intravascular, que em combinação com vasoespasmo de veias íntegras e edema no local da lesão pode desencadear um quadro grave de hipoperfusão e isquemia com progressão para necrose hemorrágica (Tator e Fehlings, 1991; Dumont et al., 2001).

A alta demanda metabólica dos neurônios fazem com que a substância cinzenta seja extremamente sensível às lesões isquêmicas, que podem ser agravadas pela perda dos mecanismos auto-regulatórios que normalmente promovem rígido controle sobre a hemodinâmica da medula espinhal. A perda desse mecanismo predispõe-na a flutuações da pressão arterial sistêmica, que podem contribuir com o agravamento da lesão secundária, uma vez que alguns pacientes apresentam um quadro de hipotensão e bradicardia consequente à perda de tônus vagal (choque neurogênico) (Kwon et al., 2004).

Hiperemia ocorre após o estágio de perfusão reduzida, com consequente queda no pH perivascular causado pelo acúmulo de metabólitos ácidos como lactato. Após este período de isquemia, a medula espinhal pode apresentar um quadro de reperfusão que exacerba a lesão e morte celular através da geração de agentes deletérios, como radicais livres e outros subprodutos tóxicos (Basu et al., 2001). Radicais livres oxigenados (incluindo super óxido,

radicais hidroxila, óxido nítrico, peroxinitrato e outros) são produzidos durante a isquemia com uma elevação mais pronunciada durante o período inicial de reperfusão exacerbando a lesão secundária (Kwon et al., 2004).

Estes compostos altamente energéticos que contribuem para o estresse oxidativo, são gerados por várias vias celulares, incluindo óxido-nítrico sintetase, ativação de fosfolipases mediadas por  $Ca^{2+}$ , xantina oxidases e células inflamatórias. Quando o estresse oxidativo excede a capacidade antioxidante celular, como nos traumas do SN, a produção destas espécies reativas causa a oxidação de proteínas, lípidios e ácido nucléico (Lewén et al., 2000; Cuzzocrea et al., 2001).

Esse estresse oxidativo pode ainda impedir o funcionamento de pontos-chaves na cadeia respiratória mitocondrial, alterar DNA e proteínas associadas e inibir ATPase sódio e potássio. Com isso, induz colapso celular, culminando finalmente em necrose ou apoptose. Portanto, a peroxidação lipídica é de extrema importância no processo patofisiológico agudo da lesão medular, durante o período inicial de hipoperfusão, e principalmente durante a reperfusão subsequente (Cuzzocrea et al., 2001).

Alterações bioquímicas e distúrbios hidroeletrólíticos também ocupam papel central no mecanismo de lesão secundária ao trauma medular agudo. Neurotransmissores excitatórios são liberados e acumulados, e especula-se que causam danos diretos à medula espinhal associados ainda, à produção de radicais livres,

isquemia e alterações da microcirculação (Dumont et al., 2001).

O glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, é liberado excessivamente após a lesão primária, acumulando-se rapidamente em resposta à isquemia e despolarização de membranas (Gasic e Hollmann, 1992). Níveis tóxicos são atingidos em até 15 minutos após o trauma, podendo causar danos diretos e indiretos (Wrathall et al., 1996). Ao atuar sobre receptores ionotrópicos AMPA e Kainato, parece resultar em acúmulo precoce de sódio intracelular, causando edema citotóxico e acidose intracelular. A falha nos mecanismos  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$  pode exacerbar o acúmulo intracelular de  $\text{Na}^+$ , água e perda de  $\text{K}^+$  extracelular. Adicionalmente, íons  $\text{Ca}^{2+}$  acumulam no meio intracelular produzindo alterações fisiológicas e causando maiores danos. Também, o aumento extracelular de potássio parece resultar em despolarização excessiva de neurônios, afetando negativamente a condução neuronal. Ainda, a depleção de magnésio intracelular possui efeitos deletérios sobre os processos metabólicos como glicólise, fosforilação oxidativa e síntese protéica, além de afetar adversamente reações onde o magnésio atua como co-fator. A depleção de magnésio pode ainda contribuir com o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e todo o processo patofisiológico associado a este íon, pois o  $\text{Mg}^{2+}$  protege as células neuronais bloqueando receptores NMDA reduzindo a excitotoxicidade (Choi, 1987; Choi, 1992; Dawson e Dawson, 1996; Cuzzocrea, et al., 2001).

A ativação glutamatérgica de receptores NMDA permite que os íons cálcio e sódio do meio extracelular movam-se para o interior da célula, em um gradiente, onde a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é normalmente baixa e controlada. O glutamato pode ainda desencadear a liberação de cálcio de reservatórios intracelulares para o compartimento citoplasmático. Esta elevada concentração de cálcio no citoplasma e na mitocôndria desencadeia uma série de processos cálcio-dependentes capaz de alterar o metabolismo celular. Dentre estes mecanismos se encontram ativação de lipases, como calpaínas, fosfolipase A2 e lipoxigenase com a formação de radicais livres e desregulação do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial levando à apoptose da célula (Choi, 1987; Mody e McDonald, 1995; Kwon et al., 2004).

A apoptose pode ser desencadeada por uma série de mecanismos, incluindo citocinas, lesão inflamatória, radicais livres e excitotoxicidade. Dados de modelos experimentais de trauma medular em ratos evidenciaram que apoptose, particularmente ativada por caspases, contribui significativamente com a lesão medular secundária. A cascata apoptótica no SNC é ativada em neurônios, oligodendrócitos, micróglia e possivelmente astrócitos. Apoptose na micróglia e oligodendrócitos contribui com a lesão secundária inflamatória e com a desmielinização pós- injúria, respectivamente. Em neurônios determina perda celular e possui implicações claramente negativas na recuperação (Schuman et al., 1997; Springer et al., 1999;

Beattie et al, 2000; Li et al., 2000; Citron et al., 2008).

Calpaínas degradam importantes componentes estruturais do SNC incluindo proteínas estruturais da unidade axônio-mielina. Adicionalmente, outras proteases e quinases  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes destroem membranas celulares e resultam em dissolução de certos componentes, como neurofilamentos. A ativação de lipases, ciclooxigenases e lipoxigenase resultam na conversão de ácido aracídico em tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos. Estas substâncias contribuem com a redução do fluxo sanguíneo causada por agregação plaquetária e vasoconstrição, além de auxiliarem na resposta inflamatória e peroxidação lipídica. Adicionalmente aos danos diretos à membrana celular, a peroxidação lipídica resulta em um ciclo, onde há produção de radicais livres, que continuam causando danos à membrana celular, resultando em mais peroxidação lipídica e formação de radicais (Boucher e Phelps, 1997; Shields et al., 2000).

Portanto, altas concentrações intracelulares de cálcio contribuem com a lesão secundária interferindo com a função mitocondrial, inibindo a respiração celular, a qual já se encontra prejudicada pela hipóxia e isquemia decorrentes da lesão inicial. Mas, ao mesmo tempo, é difícil afirmar e determinar a importância da homeostase do cálcio nas lesões do SNC, uma vez que a elevação citoplasmática e mitocondrial deste representa um ponto comum na via de morte neuronal consequente a diversos

mecanismos e insultos (Dumont et al., 2001, Kwon et al., 2004; Mattson, 2007).

### **2.3. Tratamento do trauma medular**

Atualmente pouca esperança resta aos indivíduos acometidos pelo trauma medular. Cuidados especializados emergenciais, cirurgias de descompressão e estabilização de vértebras, bem como administração de antiinflamatórios esteroideais durante a fase aguda do trauma são hoje os protocolos padrões do tratamento. No entanto, todos estes cuidados nem sempre são suficientes para proporcionar um prognóstico favorável à recuperação plena (Ackery et al., 2004).

Na medicina veterinária o panorama é ainda pior, uma vez que na maioria dos casos, ignora-se os cuidados emergenciais, diminuindo assim a possível janela de atuação do clínico (Olby, 1999). Além disso, os métodos diagnósticos disponíveis são pouco sensíveis, dificultado ainda mais a tarefa do cirurgião, quando o animal é de fato encaminhado à cirurgia (Lanz et al., 2000).

Em pequenos animais, assim como em humanos, a metilprednisolona é também o fármaco padrão para o tratamento desta injúria. Terapia complementar como fisioterapia e acupuntura são recomendadas em associação ao tratamento farmacológico, tendo demonstrado bons resultados na rotina clínica (Olby, 1999; Olby et al., 2005).

Um estudo clínico em humanos chamado de estudo nacional sobre lesão medular aguda (NASCIS I) teve início em 1979, e comparou

doses de metilprednisolona (100mg e 1000 mg via IV) sobre o trauma medular agudo. Foram observados poucos benefícios na recuperação funcional, e não houve diferença significativa entre os grupos de dose baixa ou alta após seis meses ou um ano. Atualmente, a terapia de altas doses de metilprednisolona, ainda que não oficialmente aprovada nos Estados Unidos para o tratamento do trauma agudo de medula, continua sendo o tratamento padrão utilizado não só neste país, mas em quase todos os países onde é comercializada (Hall e Springer, 2004).

Estudos recentes relativos à lesão medular aguda têm focado principalmente em reduzir a lesão secundária, com ação em diversos pontos desta complexa cascata de eventos celulares, e/ou em estratégias para promover a regeneração neuronal como o emprego de células tronco (Hall e Springer, 2004; Rosenzweig e McDonald, 2004; Lim e Tow, 2007).

#### **2.4. Modelos experimentais para estudo do trauma medular**

As causas de traumas medulares são as mais diversas, assim como a fisiopatogenia tecidual resultante, e o desfecho funcional destas (Grill, 2005). A necessidade de maior esclarecimento sobre a patofisiologia do trauma agudo da medula espinhal e de condições nas quais potenciais tratamentos possam ser avaliados levou ao desenvolvimento de numerosos modelos experimentais de trauma medular (Kwon et al, 2002). O refinamento de modelos animais que reproduzem precisamente a patofisiologia observada no trauma medular em humanos e em pequenos animais deve

proporcionar um cenário ideal para teste de intervenções que supostamente reduziriam a lesão induzida pelo trauma medular na fase aguda, e restabeleceriam a função perdida na fase crônica. Estudos baseados nestes modelos têm gerado grandes expectativas para o desenvolvimento de novas intervenções clínicas (Grill, 2005).

Modelos experimentais onde a medula espinhal é seccionada completa ou parcialmente têm enfrentado críticas pela disparidade em relação às injúrias traumáticas contusivas e/ou compressivas comumente observadas em humanos e animais domésticos. No entanto, estes modelos fornecem valiosas informações sobre regeneração de tratos axonais específicos, objeto de difícil estudo a partir de modelos contusivos, nos quais invariavelmente, axônios são preservados. Por outro lado, a simulação mais realística de forças biomecânicas em modelos contusivos permite avaliação de intervenções neuroprotetoras durante o processo patofisiológico agudo, bem como estratégias para regeneração axonal dentro de um contexto mais representativo, relevante e próximo da realidade e rotina clínica (Schwartz e Fehlings, 2001; Kwon et al, 2002).

Reginald Allen, em 1911, foi o primeiro a descrever um modelo de contusão medular, no qual um peso era lançado sobre a medula espinhal de cães, previamente exposta pela laminectomia. A partir deste estudo pioneiro, uma variedade de abordagens foi desenvolvida para mimetizar o trauma contusivo/compressivo em diversas espécies animais (Young, 2002).

Muitos desses modelos empregam um peso definido, lançado de um altura também definida pelo pesquisador sobre a medula exposta, a fim de promover rápido deslocamento do tecido medular por uma força uniforme aplicada pontualmente sobre o mesmo (Grill, 2005). Nestes modelos, dois aspectos importantes devem ser mencionados. Primeiro, a evolução da lesão ao longo do tempo, razoavelmente uniforme entre os animais empregados, proporcionando desta forma, cenário para avaliação de estratégias neuroprotetoras empregadas na fase aguda do trauma. E, a segunda observação importante é que, mesmo quando há paraplegia após um trauma contusivo/compressivo, a medula raramente sofre transecção completa, preservando, ainda que de forma residual, tecido normal periférico à área lesionada, e a quantidade de tecido poupado se correlaciona com as funções motora e sensitiva residuais (Kwon et al, 2002). Tais modelos incluem o clássico e amplamente utilizado *NY Impactor*, da Universidade de Nova Iorque, assim como vários outros modelos que se baseiam no lançamento de peso, como Falconer et al., 1996; Kuhn e Wrathall, 1998; Farooque, 2000; Iwanami et al., 2005; Silva et al., 2008, Torres et al. 2010. Atualmente, o rato e o camundongo são os animais mais utilizados nestes modelos, seja pelo custo e acessibilidade dos mesmos, e ainda pelo seu potencial transgênico (Kwon et al, 2002).

Esforço tem sido direcionado para aperfeiçoar a consistência e precisão das forças biomecânicas aplicadas durante a realização do trauma experimental, na expectativa de promover

déficits funcionais e neuropatológicos uniformes e padronizados. A capacidade em controlar, firmemente, os parâmetros da injúria e os resultados obtidos no animal utilizado é mandatória para a confiabilidade e reprodutibilidade experimental (Kwon et al, 2002). Este tem sido também um desafio de pesquisadores do trauma medular desde a criação do antigo modelo proposto por Allen (Grill, 2005).

## **2.5. Toxinas de *Phoneutria nigriventer***

Os venenos produzidos por animais possuem, em sua maioria, composições elaboradas e complexas, destinados, normalmente, à caça, proteção e alimentação, constituem vasta biblioteca, com enorme potencial farmacológico a ser explorado (Gomez et al., 2002). A estrutura e o mecanismo de ação desses venenos estão relacionados diretamente com o próprio modo de vida dos animais. Muitas toxinas possuem alvos específicos, vitais ao organismo, como as neurotoxinas que se ligam aos canais iônicos ativados por voltagem, modificando suas propriedades e modo de ação (Catterall et al., 2005). O estudo de como estas toxinas causam imobilização e até morte atrai a atenção de pesquisadores interessados em entender seus mecanismos de ação, vislumbrando ainda seus potenciais de aplicação em biotecnologia (Borges et al.,2009).

Como resultado de milhões de anos de evolução, as moléculas presentes nos venenos de aranha possuem a vantagem de ter alta seletividade e afinidade por certos receptores, ocasionando efeitos específicos mesmo em

baixas concentrações. Toxinas purificadas a partir dos venenos de aranha têm auxiliado na identificação e caracterização de canais iônicos e suas funções (Catterall et al., 2005). Canais iônicos são estruturas importantes para a manutenção das funções vitais em um organismo. Presentes em todas as membranas biológicas, regulam o movimento iônico entre o meio intra e extracelular, sendo cruciais na geração de potenciais de ação e mecanismos de transdução de sinais nas células de vertebrados e de invertebrados (Borges et al., 2009).

O veneno da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (PN), tem sido estudado por sua complexa constituição e possível atuação em diferentes sistemas orgânicos, bem como pelo emprego na identificação e definição farmacológica de diferentes canais iônicos. A purificação e o fracionamento desse veneno têm permitido avanços na descoberta de sítios e mecanismos de ação celular. Diferentes frações possuem ações distintas sobre canais iônicos presentes no sistema nervoso, estas frações podem constituir potenciais agentes terapêuticos, para o emprego em afecções ainda sem tratamento efetivo, como o trauma à medula espinhal (Gomez et al., 2002).

Estudos de purificação por filtração em gel e cromatografia de fase reversa demonstraram que o veneno de PN pode ser classificado em três categorias, considerando o seu conteúdo protéico: 1) peptídeos neurotóxicos ativos em mamíferos e insetos; 2) peptídeos atóxicos ativos em músculo liso; e 3) enzimas. Rezende et al. (1991) isolaram a partir do veneno

bruto uma fração não tóxica (PhM) e três frações neurotóxicas PnTx1, PnTx2 e PnTx3. Posteriormente, outra fração foi isolada, a PnTx4, que se mostrou altamente tóxica para insetos, mas aparentemente atóxica para mamíferos (Figueiredo et al., 1995; Lima et al., 2002).

As frações neurotóxicas PnTx1, PnTx2, PnTx3 e PnTx4 foram posteriormente purificadas pela combinação de cromatografia de fase reversa (HPLC) e cromatografia de troca iônica, resultando nas caracterizações funcional e estrutural de várias subfrações. Estas demonstraram atividade em diferentes canais iônicos, com variados graus de seletividade (Gomez et al., 2002; Lima et al., 2007).

Dentre as frações isoladas, destaca-se pelo efeito sobre o sistema nervoso a toxina PnTx3. A injeção desta, por via intracerebroventricular, teve como efeito paralisia flácida (Rezende et al., 1991; Cordeiro et al., 1993), resultante da inibição de neurotransmissores excitatórios (Gomez et al., 1995; Prado et al., 1996; Guatimosim et al., 1997; Leão et al., 2000, Gomez et al., 2002). A fração purificada PnTx3 é capaz de inibir a liberação de glutamato dependente de  $Ca^{2+}$ , através de sua ação sobre canais para cálcio do tipo P/Q, os mais abundantes no sistema nervoso. De forma semelhante, diminui também o aumento da concentração intracelular de cálcio, como demonstrado em experimentos *in-vitro*, frente a estímulos de despolarização de membranas (Prado et al., 1996).

Experimentos posteriores purificaram a fração PnTx3, resultando em seis subfrações diferentes, nomeadas PnTx3-1 a PnTx3-6. Ensaios realizados *in-vitro* mostraram que PnTx3-3 e PnTx3-4 bloquearam o influxo de cálcio pelos canais iônicos frente a despolarização de membranas (Guatimosin et al., 1997; Reis et al., 1999; Dos Santos et al., 2002). Células do hipocampo de ratos adultos submetidas à isquemia por baixa oxigenação e glicose foram avaliadas por Pinheiro et al. (2006). Foi observada neste estudo, citoproteção neuronal induzida por essas neurotoxinas, que resultou em menor mortalidade celular que a do grupo controle.

A fração PnTx3-6 inibiu os canais para  $Ca^{2+}$  diminuindo a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  e a liberação de  $Ca^{2+}$  glutamato dependente, como estabelecido por Vieira et al., (2003), sugerindo que a toxina teve como alvo os canais para  $Ca^{2+}$ . Inibiu também a elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular desencadeada por  $K^+$  e a liberação de glutamato  $Ca^{2+}$  dependente em sinaptossomas (Vieira et al., 2003). Em outro estudo conduzido por Vieira et al. (2005) foram utilizadas células HEK 293 com expressão de canais para cálcio  $Ca_{v2.2}$  (tipo N) que foram submetidas a um insulto isquêmico por privação de oxigênio e glicose. No grupo tratado com a subfração PnTx3-6, observou-se inibição significativa das correntes de  $Ca^{2+}$  e, conseqüente menores taxas de morte celular. Desta forma, PnTx3-3, PnTx3-4 e PnTx 3-6 são bloqueadores de canais para cálcio neuronais de amplo espectro (Prado et al., 1996; Guatimosim et al., 1997; Reis et al., 1999; Vieira et al., 2003; Vieira et al., 2005). Ainda,

PnTx3-4 inibe também a recaptção de glutamato (Reis et al., 1999).

A propriedade bloqueadora da fração PnTx3-6 em canais para cálcio dependentes de voltagem foi também avaliada por Souza et al. (2008), a fim de testar sua ação analgésica. A toxina foi capaz de prevenir e reverter eficientemente as dores química e neuropática, baseada na inibição de canais para cálcio e no bloqueio da liberação de glutamato em sinaptossomas localizados na medula espinhal de ratos.

Experimentos *in-vitro* demonstraram que as frações PnTx3, PnTx3-3 e PnTx3-4 possuem efeito neuroprotetor sobre isquemia celular induzida (Pinheiro et al., 2006). Resultados como estes, segundo os autores, demonstram o potencial das toxinas presentes na fração PnTx3 como drogas modelo para a prevenção de danos cerebrais conseqüentes à isquemia.

## 2.6. Avaliações clínicas motoras

O objetivo final do tratamento da lesão medular é promover a recuperação funcional do indivíduo. Para tanto, se faz necessário possuir métodos de avaliação capazes de determinar e quantificar a recuperação da função locomotora associada ao tratamento (Kunkel-Bagden et al., 1993).

Avaliações comportamentais são importantes ferramentas para determinar o resultado das lesões experimentais à medula espinhal, bem como a recuperação dos animais e efeitos de diferentes tratamentos ao longo do tempo (Von Euler et al., 1996). Assim, o

resultado funcional avaliado auxilia na realização de estudos clínicos futuros (Sědý, 2008). Os testes devem ser capazes de examinar respostas reflexas específicas, sendo ainda sensíveis a diferenças sutis no padrão de locomoção e de função dos membros em diferentes avaliações que desafiam a capacidade motora (Kunkel-Bagden et al., 1993).

Preferencialmente, os exames devem ser de fácil execução, necessitando mínimo condicionamento prévio e causando o menor estresse possível aos animais, sem a necessidade de equipamentos elaborados, proporcionando uma avaliação confiável sobre diferentes graus de lesão (Von Euler et al., 1996). O teste comportamental ideal deve ser capaz de fornecer dados objetivos e quantitativos para um grande número de animais, apresentando diferentes graus de capacidade motora, possuindo ainda padrões de desempenho aceitáveis. Infelizmente, não existe um teste capaz de preencher todos estes requisitos. Desta forma, cada investigador deve selecionar avaliações que atendam aos requisitos essenciais para o experimento que está sendo conduzido, controlando ao máximo as limitações inerentes às avaliações empregadas (Basso, 2004).

A difícil tarefa de obter todas estas características em um só teste faz com que os pesquisadores ao utilizarem uma combinação de diferentes avaliações, consigam resultados mais completos e fidedignos (Von Euler et al., 1996). O uso de mais de uma avaliação em um único experimento diminui a variabilidade do desempenho do animal causada por estresse,

manipulação, ritmo circadiano, habituação e dor pós-operatória. Ainda, os efeitos de um tratamento podem ser mimetizados ou mascarados por mecanismos compensatórios. Um fator a ser considerado quando se combina avaliações é a potencial sobreposição parcial dos resultados, devido a uma rede neural em comum, ainda que, para muitas destas avaliações, a via envolvida na mediação do comportamento respectivo não esteja completamente elucidada. Muir e Webb (2000) recomendam que uma bateria de testes deve conter: (I) uma medida de habilidades motoras durante a atividade locomotora espontânea; (II) uma medida de habilidades durante tarefas comportamentais treinadas e; (III) uma avaliação de função reflexa.

Em um estudo retrospectivo realizado por Sědý et al. (2008), foram estabelecidas as características e potenciais usos de diversas avaliações comportamentais para diferentes modelos de trauma à medula espinhal. As recomendações se basearam em 553 trabalhos publicados em periódicos científicos de língua inglesa com fator de impacto definido, no período de 1995 a 2007. A seleção cuidadosa das avaliações comportamentais, adequadas ao tipo e intensidade da lesão experimental, bem como da duração do estudo, se faz importante a fim de obter maior precisão e confiabilidade nos resultados, assegurando que não ocorra interpretação errônea dos resultados observados. Desta forma, podem ser escolhidos diversos testes a serem empregados, com o intuito de obter maior precisão da avaliação das respostas

de acordo com o modelo de trauma empregado e os resultados a serem observados.

#### 2.6.1. BBB (teste locomotor)

A avaliação da capacidade motora espontânea em campo aberto proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), baseada na escala inicialmente descrita por Tarlov em 1954 é segundo Sědý et al. (2008) o teste mais utilizado e difundido entre os grupos que pesquisam trauma medular. A escala BBB representa uma categorização detalhada e ordinal da recuperação locomotora dos membros posteriores após lesão à medula espinhal. Cada valor atribuído (score) pontua sem ambiguidade um estágio único e sequencial da melhora comportamental (Basso et al., 1995 e 1996). A escala numérica de 22 itens, abrange de 0 (ausência de atividade motora espontânea) a 21 pontos (função motora normal – marcha coordenada consistente, liberação dos dedos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e estabilidade de tronco consistente) (Tabela 1).

Valores de 0 a 7 indicam retorno de movimentos isolados do quadril, joelho e tornozelo, correspondendo à fase inicial da recuperação. Valores de 8 a 13 determinam retorno no posicionamento das patas e movimentos coordenados dos membros posteriores; enquanto valores de 14 a 21 demonstram retorno da liberação dos dedos durante as passadas, posicionamento predominante das patas, estabilidade de tronco e posicionamento de cauda, o que representam as fases intermediária e tardia da recuperação do

trauma, respectivamente. Os animais são testados em uma superfície não escorregadia, em uma área de 110cm por 90cm. Dois avaliadores conjuntamente determinam um escore ao animal, baseados na análise de seus movimentos na área de teste após um período de quatro minutos (Basso et al., 1995).

O teste BBB difere de outros sistemas de avaliação locomotora em vários aspectos. Primeiro, o valor atribuído ao animal não é um somatório de componentes comportamentais isolados e, cada valor na tabela requer o preenchimento de um conjunto de características. Desta forma, os valores não são ambíguos, uma vez que um mesmo valor não pode representar duas condições diferentes. Segundo, os valores cobrem vários traços comportamentais, representando uma caracterização detalhada da função locomotora. Em terceiro lugar, a ordenação dos valores determina melhora progressiva e cada estágio da recuperação representa melhora em relação ao anterior. Portanto, a curva de melhora observada no BBB é monotônica, crescendo, progressivamente com o tempo. No entanto, os valores do BBB possuem algumas desvantagens em potencial. O fato de diferentes partes da escala se basearem em diferentes critérios pode determinar causas não homogêneas para variabilidade dos valores atribuídos ao longo da tabela. Além disso, ainda que sejam valores ordinais, estes não são necessariamente equidistantes uns dos outros. A diferença entre os valores 1 e 2 pode não ser a mesma entre os valores 11 e 12. Por último, uma limitação inerente a escalas semi-quantitativas e subjetivas é a variabilidade introduzida pelas

impressões do avaliador. O uso de definições operacionais para determinar categorias comportamentais pode auxiliar na redução desta variabilidade (Basso et al., 1996; Basso, 2004). Ainda que alguns autores questionem como possível limitação, a subjetividade desta

avaliação, a experiência de diversos grupos de pesquisa demonstra que o treinamento dos avaliadores, bem como a padronização das condições e rigor na realização das avaliações minimizam esta limitação ao máximo (Basso et al., 1996).

**Tabela 1.** Escores e características<sup>a</sup> locomotoras segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

Escore	Características	Comentário
0	<b>Sem movimento observável dos MPs .</b>	
1	<b>Movimento discreto de uma das articulações dos MPs.</b>	Discreto = $\leq 50\%$ da articulação.
2	<b>Movimento extenso de uma articulação e possível movimento discreto de outra articulação dos MPs.</b>	Extenso = $> 50\%$ da articulação.
3	<b>Movimento extenso de duas articulações dos MPs.</b>	2 articulações = coxofemoral e femorotibial.
4	<b>Movimento discreto das três articulações dos MPs.</b>	3 articulações = coxofemoral, femorotibia e tibiotársica.
5	<b>Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira dos MPs.</b>	3 <sup>a</sup> = geralmente tibiotársica.
6	<b>Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira dos MPs.</b>	
7	<b>Movimento extenso das três articulações dos MPs.</b>	
8	<b>Passada sem suporte de peso ou posicionamento plantar sem suporte de peso.</b>	Extensão rítmica das três articulações.
9	<b>Posicionamento plantar com suporte de peso somente em estação ou passada dorsal com suporte de peso ocasional, frequente ou consistente e sem apoio plantar.</b>	Suporte de peso = contração do MP durante o posicionamento plantar da pata ou elevação do trem posterior em estação.  Coordenação = 1passo do MP para 1 passo do MA, passos do MP alternados.
10	<b>Passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação dos MPs com os MAs (MP-MA).</b>	Ocasional = $> 5\%$ e $\leq 50\%$ .  Passos = contato da face plantar com suporte de peso, avanço dos MPs para reestabelecer contato plantar.
11	<b>Passos frequentes a consistentes com suporte de peso sem coordenação MP-MA.</b>	Frequente = 51-94% do tempo.
12	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e <b>coordenação MP-MA ocasional</b>	Consistente = $> 95\%$ do tempo.
13	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e <b>coordenação MP-MA frequente.</b>	
14	<b>Passada plantar consistentemente coordenada, com a posição da pata predominantemente rotacionada durante contato inicial e retirada; Passada plantar frequente, coordenação</b>	Rotacionada = rotação interna ou externa da pata traseira parada ou

	<b>MP-MA consistente e ocasional passada dorsal.</b>	durante inicio do movimento
15	Passadas plantares coordenadas consistentes, <b>liberação dos dedos ausente ou ocasional durante avanço do membro, posicionamento da pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial.</b>	Paralela = pata traseira paralela ao corpo parada ou durante inicio do movimento
16	Passadas plantares coordenadas consistentes, <b>liberação dos dedos frequente</b> , da pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e rotacionada na retirada.	
17	Passadas plantares coordenadas consistentes, liberação dos dedos frequente, <b>pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada.</b>	
18	Passadas plantares coordenadas consistentes, <b>liberação dos dedos consistente</b> , pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada.	
19	Passadas plantares coordenadas consistentes, liberação dos dedos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, <b>cauda abaixada por parte ou todo o tempo de avaliação.</b>	Cauda abaixada = cauda toca a superfície durante as passadas
20	Passadas plantares coordenadas consistentes, liberação dos dedos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, <b>cauda consistentemente elevada</b> e instabilidade de tronco.	Cauda elevada = cauda não toca a superfície  Instabilidade de tronco = mudança de peso lateralmente durante mudanças bruscas de direção e quedas
21	Marcha coordenada consistente, liberação dos dedos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e <b>estabilidade de tronco consistente.</b>	Estabilidade de tronco = pelve e cauda alinhados com o corpo durante a locomoção.

---

<sup>a</sup>Cada escore representa um grupo único de características locomotoras. Pontos chaves entre os escores estão destacados em negrito. Comentários esclarem as definições. (Adaptado de Basso et al., 1996)

### 2.6.2. Plano inclinado (teste motor)

O teste do plano inclinado avalia a capacidade do animal em se manter sobre uma superfície posicionada em diferentes ângulos aumentados gradativamente. O animal é colocado sobre uma placa de 28x30cm, coberta com borracha de 1mm de espessura com a cabeça para cima em uma posição em que sua cabeça e corpo sejam perpendiculares ao eixo do plano. O ângulo de inclinação é então gradativamente aumentado, em direção à posição vertical, até que o rato não seja capaz de manter a posição inicial. O maior ângulo em que o animal consegue se sustentar estavelmente por 5 segundos é então anotado. A capacidade do

animal de se manter sobre o plano inclinado correlaciona-se com a integridade do trato rubro-espinhal e outras vias não piramidais após o trauma à medula espinhal (Rivlin e Tator, 1977; Fehlings e Tator, 1995; Silva et al., 2008)

### 2.6.3. Reflexos de retirada (teste sensitivo)

Reflexos de retirada são um grupo de respostas reflexas sendo desencadeadas frente a um estímulo nociceptivo. São avaliadas a velocidade e a força com que o membro posterior é retirado, quando estimulado por extensão, pressão ou dor. Com dois dedos, indicador e polegar, o avaliador estende o membro posterior do animal para trás e pressiona o coxim plantar entre os dois dedos. A

resposta avaliada pode ser classificada em ausente, normal, ou anormal (Gale et al., 1985; Von Euler et al., 1997). Ainda que pouco sensível, este teste é de fácil execução, e utilizado a fim de avaliar a integridade dos circuitos de reflexos segmentares espinhais (Sědý, 2008).

#### 2.6.4. Avaliações do posicionamento tátil/proprioceptivo (teste sensitivo/motor)

Estas avaliações baseiam-se no fato de que a resposta de posicionamento tátil/proprioceptivo dos membros posteriores pode ser desencadeada tocando-se levemente a pele da face dorsal da pata sem que ocorra movimentação articular. O animal responde levantando o membro posterior e posicionando-o sobre o obstáculo (Kunkel-Bagden et al., 1993; Metz et al., 2000). O animal é sustentado pelo tronco, com os membros posteriores livres. As faces dorsal e lateral de cada pata são colocadas em contato com a borda de uma tábua a fim de desencadear o reflexo. A velocidade e precisão em colocar os pés sobre o obstáculo são avaliadas. A resposta reflexa pode ser considerada ausente, normal ou anormal (Gale et al., 1985; Von Euler et al., 1997).

### 3. Materiais e métodos

A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o certificado número 10/2009 (Anexo 1).

#### 3.1. Toxina PnTx3-6

Uma amostra liofilizada da subfração PnTx3-6 oriunda do veneno de *Phoneutria nigriventer* foi fornecida pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Para quantificar a toxina esta foi re-suspendida em solução de PBS estéril, e uma alíquota foi utilizada em um ensaio de dosagem protéica pelo método de *Lowry*. Uma vez determinada a concentração, o volume foi ajustado para 100pMol/μL, e a solução alíquotada em tubos tipo *micro eppendorf*, sendo conservadas em freezer (-20°C) até o momento da aplicação.

#### 3.2. Animais

Foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus*), de linhagem Wistar, machos, com aproximadamente três meses de idade pesando 350g, provenientes do biotério do ICB - UFMG. Aos 30 dias de idade, os animais foram desverminados com tiabendazol<sup>1</sup>, na dose de 100mg/kg, via oral, em dois tempos, com um intervalo de 15 dias entre a primeira administração. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas com três animais/caixa, tendo livre acesso a água e ração comercial<sup>2</sup> e submetidos a ciclos de luz de 12hs claro/escuro. Estes animais foram mantidos por todo o período no biotério do Centro Experimental de Pequenos Animais (CEPA) da Escola de Veterinária da UFMG. Os animais foram

---

<sup>1</sup> Thiaben®, Tiabendazole 50mg/ml; Uci-Farma, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Nuvilab®, Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, Brasil.

divididos aleatoriamente em três grupos com seis animais cada. Animais do grupo 1 (G1) foram submetidos à laminectomia e eutanasiados aos oito dias. Animais do grupo 2 (G2) foram submetidos à laminectomia e trauma contusivo/compressivo à medula espinhal, receberam PBS trinta minutos após o trauma e foram eutanasiados oito dias após o procedimento. Já os animais do grupo 3 (G3) foram submetidos à laminectomia, receberam PnTx3-6 trinta minutos após o trauma e foram eutanasiados oito dias após o procedimento.

### 3.3. Procedimento cirúrgico

Os animais foram encaminhados para cirurgia asséptica e imediatamente antes do procedimento, receberam antibioticoterapia com cefalotina sódica<sup>3</sup> na dose de 30 mg/kg, por via intravenosa e ainda, medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol<sup>4</sup> na dose de 2mg/Kg, por via intramuscular. A indução e manutenção anestésicas foram realizadas utilizando isoflurano vaporizado em sistema semi aberto por meio de máscara.

Uma vez anestesiados, os animais tiveram a região toracolombar dorsal depilada, e foram posicionados, em decúbito esternal, sobre uma placa de vidro de 20cmx20cm. Esta, por sua vez, foi então colocada sobre uma mesa cirúrgica confeccionada a partir de duas placas

de polietileno, paralelas entre si e separadas por quatro hastes de alumínio, onde uma bolsa térmica de 1000ml com água aquecida a 80°C foi introduzida, afim de manter o animal aquecido. Diversas perfurações na placa superior, em contato com o animal, permitiam um aumento da troca de calor com o animal.

Foi realizada a anti-sepsia do campo cirúrgico com iodopovidona e álcool iodado. Incisões de pele e tecido subcutâneo foram realizadas, na linha média dorsal entre a décima vértebra torácica e a primeira vértebra lombar (T10 a L1). As inserções dos músculos epiaxiais de T10-L1 foram incisadas, e estes afastados lateralmente. Com o auxílio de uma pinça goiva realizou-se osteotomia do processo espinhal da décima segunda vértebra torácica (T12), e em seguida a retirada da lâmina dorsal da vértebra (laminectomia) empregando-se drill pneumático neurológico<sup>5</sup> e microscópio cirúrgico<sup>6</sup> (Fig.1 B). As brocas do drill foram constantemente irrigadas com solução fisiológica<sup>7</sup> para evitar o hiperaquecimento tecidual. Após a visualização da medula espinhal, foi provocado trauma mecânico compressivo sobre a duramáter com emprego de um aparelho estereotáxico modificado a partir do modelo proposto por Silva et al., 2008 e Torres et al., 2010 (Fig.1 A). O trauma foi realizado através da colocação de um peso de 70g, por 5 minutos exercendo

---

<sup>3</sup> Cefalotina Sódica injetável 1g., Antibióticos do Brasil LTDA., São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Tramadon®, Cloridrato de tramadol 50mg/ml, Cristália produtos químicos farmaceuticos Ltda., Itapira, Brasil

---

<sup>5</sup> Aesculap

<sup>6</sup> Opto DM Plus, Opto Eletrônica S.A., São Carlos, Brasil

<sup>7</sup> Cloreto de sódio a 0,9%; Laboratório Sanobiol Ltda., São Paulo, Brasil.

pressão em uma superfície de 1mm sobre a medula da região de T12 (Fig.1 C). Uma vez retirada a compressão, o local foi irrigado com solução fisiológica. O animal permaneceu anestesiado por 30 minutos, sem receber qualquer estímulo, e ao término desse período, o tratamento foi aplicado de acordo com cada grupo.

Em seguida, realizou-se sutura dos músculos previamente afastados e redução do espaço de morto com sutura contínua nos padrões Reverdin e simples, respectivamente; A dermorrafia foi realizada com padrão de sutura simples separado. Todas as suturas foram realizadas utilizando fio de poliglecaprone 3.0



**Figura 1.** Fotografias do procedimento de trauma medular em ratos Wistar. A) Aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFMG. B) Laminectomia utilizando drill pneumático neurológico C) Momento da injúria medular do tipo contusiva/compressiva.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em observação, recebendo oxigênio medicinal em máscara e mantidos aquecidos até a recuperação anestésica, quando em seguida foram devolvidos às caixas. Os animais receberam cloridrato de tramadol<sup>8</sup> e cefalexina nas doses de 2mg/kg,<sup>9</sup> e 30mg/kg respectivamente, a cada 12 horas por via oral por três dias. Massagem vesical para auxílio da micção foi realizada duas vezes ao dia até que

os animais recuperassem a função voluntária de micção.

### 3.4. Tratamentos

O tratamento foi realizado mediante a injeção intramedular, na região do trauma, 30 minutos após a realização do mesmo. Utilizando uma micro seringa<sup>10</sup> acoplada a um microtubo de polietileno PE-10 e uma agulha ortodôntica<sup>11</sup>. O sistema foi montado para a administração de um volume de 2 $\mu$ L/animal. Os animais do grupo 2 receberam somente solução de PBS, enquanto

<sup>8</sup> Tramadol® - Cloridrato de tramadol 100mg/ml, Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda., Itapira, Brasil

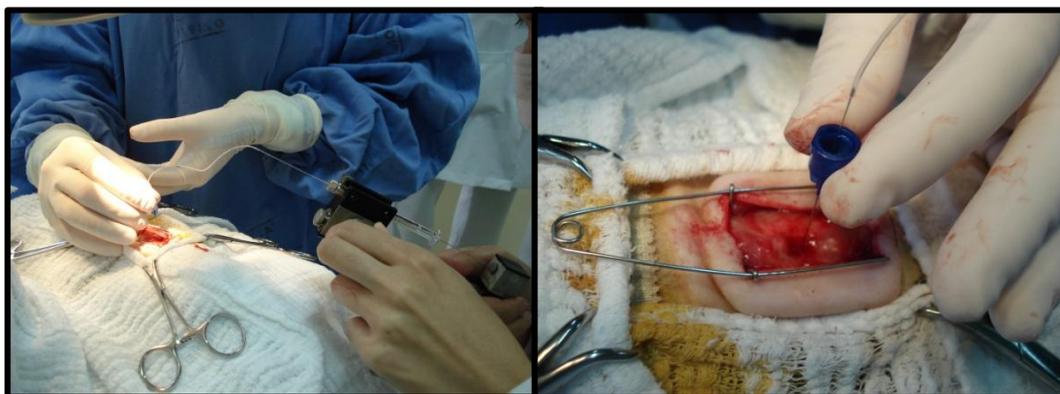
<sup>9</sup> Cefalexina 250mg/5ml, Medley S.A. Industria Farmacêutica, Campinas, Brasil

<sup>10</sup> Seringa 1701 RN-HP 10 $\mu$ L SYR, Hamilton, Reno, EUA.

<sup>11</sup> Agulha Gengival (30G/0,3x21mm), Injecta produtos odontológicos, Diadema, Brasil

os animais dos grupos 3 receberam uma injeção de 200pMol da toxina PnTx3.6 re-suspendida em PBS. A injeção foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão manual no período de

5 minutos. Após o término da injeção, a agulha permaneceu no local por 2 minutos antes de ser retirada da medula, para evitar refluxo.



**Figura 2.** Injeção do tratamento (PBS ou PnTx3-6) na medula espinhal lesionada. A) Sistema completo constituído de uma micro-seringa acoplada a um tubo PE-10 e uma agulha ortodôntica curta de 30G. B) Agulha posicionada na local da lesão para administração do tratamento.

### 3.5. Avaliações motoras

Os animais foram submetidos a uma série de avaliações da função neurológica com o intuito de analisar e graduar as funções motora e sensitiva no período pós cirúrgico, bem como a recuperação destas quando presente. Os animais foram avaliados no período pré-cirúrgico, e então diariamente, 24hs após o procedimento cirúrgico por um período de 8 dias (G1,G2 e G3).

As avaliações foram constituídas pelo exame em campo aberto, com avaliação em escala numérica como determinado por Basso et al. 1996 (BBB), propriocepção, posicionamento tátil, plano inclinado e sensibilidade dolorosa, adotando-se escala numérica descritiva (Sědý, 2007). Os animais foram avaliados pela mesma pessoa durante todo o período experimental.

Para a avaliação da capacidade motora, o animal foi posicionado em uma área cercada de 110 x 90 cm e seu comportamento filmado por 2 minutos. Os animais que permaneciam estáticos eram colocados novamente no centro da arena, a fim de estimular a movimentação. Os vídeos foram posteriormente analisados por dois avaliadores, pelo método duplo cego, de modo a evitar incongruências no resultado final. O escore atribuído a cada animal se baseou na escala descritiva proposta por Basso et al. (1996).

O posicionamento proprioceptivo foi realizado flexionando a pata do animal de forma que a superfície dorsal da mesma ficasse em contato com a mesa. Foram avaliadas a rapidez e a precisão com que o animal retornou a pata à posição normal.

O posicionamento tátil foi verificado ao suspender o animal pelo tronco deixando os membros pélvicos a serem testados livres. A superfície dorsal da pata do animal foi colocada em contato com uma barra e a velocidade e precisão com que o animal posicionou a superfície plantar das patas sobre a barra foram avaliadas.

O reflexo de retirada (sensibilidade dolorosa) foi avaliada através de beliscamento da prega interdigital dos membros posteriores. A velocidade e força da retirada do membro, bem como, o comportamento do animal, presença de vocalização e tentativa de morder foram avaliados.

O teste do plano inclinado consistiu em colocar o animal em uma tábua revestida com material emborrachado (EVA), posicionada em diferentes angulações. Os animais foram testados em ângulos crescentes de 10°, variando de 30° a 90°, em duas posições, cabeça para cima e cabeça para baixo. A capacidade do animal de se manter sobre o plano inclinado, por cinco segundos, na maior angulação possível determinou o escore do teste.

### **3.6. Avaliação anatomopatológica da medula espinhal**

Ao final do período de avaliação, os animais foram eutanasiados através de hipovolemia com punção intracardíaca e sobredose anestésica de isoflurano e xilazina. O animal foi rapidamente dissecado, sua coluna removida e preservada em solução de formaldeído tamponado a 10%. Após um

período de sete dias de fixação do tecido, a medula foi dissecada e um segmento medular de aproximadamente 2,8cm, entre T8 e L3, foi coletado e dividido em três seções: cranial ao epicentro, epicentro e caudal ao epicentro da lesão. Estes foram processados de acordo com técnicas rotineiras para a inclusão em parafina histológica.

Os segmentos medulares foram cortados em micrótomo em fatias sequencias de 4µm, e os cortes foram corados por hematoxilina-eosina para a avaliação morfológica descritiva em microscopia óptica.

### **3.7. Imunohistoquímica**

Cortes histológicos provenientes de segmentos medulares caudais ao epicentro da lesão foram obtidos para a realização da reação de imunohistoquímica, por possuírem arquitetura tecidual melhor preservada quando comparados aos cortes oriundos da região do epicentro.

Desta forma, seções de tecido montadas em lâminas silanizadas<sup>12</sup> foram desparafinizadas segundo protocolo padrão para imunohistoquímica. Realizou-se a recuperação antigênica por meio de aquecimento das lâminas por 30 minutos em solução de ácido cítrico a 0,05% (10 minutos no microondas seguidos de 20 minutos em repouso na mesma solução); bloqueio da peroxidase endógena em solução de metanol e peróxido de hidrogênio (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em câmara escura por 30 minutos;

<sup>12</sup> (3-Aminopropyl)triethoxysilane (4) ≥98%, Sigma-Aldrich, EUA.

sorobloqueio<sup>13</sup> por 30 minutos também em câmara úmida e escura. Em seguida, as lâminas foram incubadas na câmara úmida e escura overnight (16hs aproximadamente) com o anticorpo primário monoclonal (Neu-N 1:500<sup>14</sup>). Após este período, o anticorpo secundário<sup>15</sup> foi adicionado, e as lâminas foram incubadas da mesma forma por 45 minutos. Em seguida, foi adicionado o complexo estreptoavidina biotina peroxidase<sup>16</sup> e as lâminas foram incubadas por mais 30 minutos. As lâminas foram reveladas com 3-3' diaminobenzina peroxidase (DAB)<sup>17</sup> por 12 segundos, lavadas em água corrente por 10 minutos, contra coradas com hematoxilina de Harris. Após estas etapas, procedeu-se a desidratação padrão e montagem com laminúlas e bálsamo do Canadá.

A contagem de células marcadas foi realizada com auxílio de grátula de 121 pontos<sup>18</sup>, com objetiva de 40x, onde se contou os corpos neuronais marcados pelo anticorpo monoclonal Neu-N em oito campos, abrangendo desta forma toda a substância cinzenta.

### 3.8. Análise estatística

Os escores obtidos a partir das avaliações motoras foram analisados entre grupos pelo

---

<sup>13</sup> Protein Block(Serum-Free), DAKO, EUA.

<sup>14</sup> Millipore

<sup>15</sup> LSAB™, Link for AP/HRP, DAKO, EUA.

<sup>16</sup>LSAB™, Streptavidin/HRP, DAKO, EUA.

<sup>17</sup> DAB+, DAKO, EUA.

<sup>18</sup> Olympus

teste de Kruskal Wallis, e entre os dias pelo teste de Friedman. Os dados obtidos a partir da imunohistoquímica foram analisados entre grupo pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software *GraphPad InStat® 3.05*. Adotou-se 95% como nível de significância nas análises (p-valor<0,05 indica diferença significativa).

## 4. Resultados e Discussão

A dose da toxina empregada no presente estudo baseou-se no trabalho de Souza et al. (2008) que, ao utilizarem 200pMol de PnTx3.6, administrados por via subaracnóide em ratos, demonstraram abolição dos reflexos dolorosos mediados pela liberação de glutamato cálcio dependente.

A escolha da via de administração da sub-fração PnTx3-6 foi também um ponto importante neste estudo, uma vez que se buscou máxima disponibilidade da toxina no local da lesão. Alternativamente, poderia se optar pela via intravenosa, contudo o risco de não ocorrer aporte adequado da toxina na medula espinhal determinou a escolha intralésional de tratamento. Desta forma, foram minimizadas as perdas por transformações metabólicas e conseqüentemente maior disponibilidade da toxina foi obtida na medula lesionada. Diferentes vias de administração são testadas no tratamento de trauma medular. Células tronco oriundas da medula óssea foram avaliadas em ratos submetidos ao trauma medular por Vaquero et al. (2006). Com este estudo, foram

identificados melhores resultados e maior concentração de células na região do trauma utilizando-se a via intralesional quando comparada à via intravenosa. Buscou-se ainda, causar mínima lesão tecidual decorrente da injeção, não agravando ainda mais o trauma medular. O que foi conseguido provavelmente devido ao pequeno volume administrado (2µl), ao pequeno calibre da agulha (30G) e à lenta velocidade de infusão (0,4µl/minuto).

Por se tratar de um estudo sobre o trauma agudo à medula espinhal, optou-se pelo período de oito dias para as avaliações motoras e histopatológicas. Ainda que ocorra morte celular a partir do momento da injúria inicial, trauma primário, já é bem estabelecido que processos secundários capazes de causar posterior agravamento do quadro continuam agindo por horas e dias após o insulto inicial. Portanto, neste período ocorrerão os principais eventos responsáveis pela progressão da lesão primária e passíveis de serem avaliados.

Avaliações motoras

As avaliações motoras empregadas mostraram-se de fácil execução e aplicabilidade, fornecendo assim importantes informações referentes ao estado clínico dos animais. Para tanto, foram selecionados o teste BBB e parte da escala adaptada por Silva et al. (2008). Essa combinação de diferentes testes já foi sugerida por diversos pesquisadores que pretendiam avaliar e graduar adequadamente a recuperação funcional de animais submetidos ao trauma medular, bem como comparar a eficácia dos

tratamentos testados (Von Euler et al., 1996; Muir e Webb, 2000; Basso, 2004; Sědý, 2008).

A avaliação clínica dos animais no período que antecedeu a intervenção cirúrgica foi necessária e eficaz, uma vez que permitiu ao pesquisador constatar a normalidade dos animais nesse período. Possibilitou ainda comparar as alterações deambulatórias em um mesmo animal entre os períodos pré e pós-cirúrgico.

Após o procedimento cirúrgico, os animais do grupo G1 (laminectomia) não apresentaram qualquer déficit neurológico. No exame do BBB, apresentaram marcha normal, suporte de peso nos quatro membros, cauda elevada e estabilidade de tronco, características estas correspondentes ao escore máximo 21 (Tab. 2). Ainda se mantiveram estáveis no plano inclinado nos mesmos graus notados previamente à cirurgia (70° ou mais). As avaliações do reflexo de retirada e dos posicionamentos proprioceptivo e tátil também se apresentaram normais. Estes dados eram esperados uma vez que o procedimento cirúrgico foi realizado meticulosamente, utilizando-se equipamento adequado e obedecendo-se aos preceitos da cirurgia asséptica. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por Scheff et al., (2003), Ghazemlou et al.,(2005) e Torres et al., (2010), em que os animais submetidos somente à laminectomia não manifestaram déficits sensitivos ou motores.

**Tabela 2.** Teste de Basso, Beattie e Bresnahan com as medianas de ratos wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou à trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3.6, avaliados por 8 dias.

Dias de avaliação	Laminectomia (G1)	Trauma + PBS (G2)	Trauma + PnTx3.6 (G3)
Pré-cirúrgico	21 <sup>A,a</sup>	21 <sup>A,a</sup>	21 <sup>A,a</sup>
1º	21 <sup>A,a</sup>	0 <sup>A,b</sup>	0 <sup>A,b</sup>
2º	21 <sup>A,a</sup>	0 <sup>A,b</sup>	0 <sup>A,b</sup>
3º	21 <sup>A,a</sup>	0 <sup>A,b</sup>	0 <sup>A,b</sup>
4º	21 <sup>A,a</sup>	0 <sup>A,b</sup>	1 <sup>A,b</sup>
5º	21 <sup>A,a</sup>	0 <sup>A,b</sup>	1 <sup>A,b</sup>
6º	21 <sup>A,a</sup>	0 <sup>A,b</sup>	1 <sup>A,b</sup>
7º	21 <sup>A,a</sup>	1 <sup>A,b</sup>	1 <sup>A,b</sup>
8º	21 <sup>A,a</sup>	2,5 <sup>B,b</sup>	1 <sup>B,b</sup>

Medianas seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Friedman ( $P>0,05$ ). Medianas seguida de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal Walllis ( $P>0,05$ )

Resultados semelhantes não foram observados nos animais pertencentes aos grupos G2 (PBS) e G3 (PnTx3.6) submetidos ao trauma medular. Em relação ao teste BBB, não houve diferença significativa entre grupos G2 e G3 nos diferentes dias de avaliação ( $p>0,05$ ) (Tab. 2). Os ratos manifestaram déficits motores 24 horas após a realização da cirurgia, não sendo observados movimentos perceptíveis dos membros posteriores (MPs), resultados que correspondem ao escore 0 no teste BBB (Tab. 2 e Fig. 3).

No modelo de trauma medular empregado no referido estudo, buscou-se causar uma lesão de intensidade grave confirmada por paraplegia observada nas avaliações motoras e lesões histológicas intensas. Desta forma, a deambulação dos animais foi comprometida, demonstrando a eficácia do modelo aqui empregado. Grunner (1996) relatou que a perda

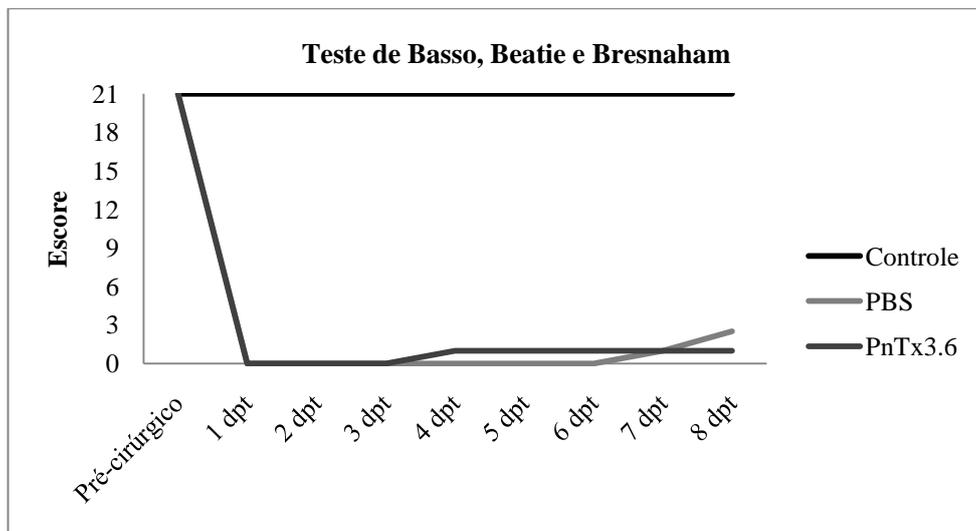
funcional tende a ser mais intensa no período imediatamente após a lesão primária. Contudo, são os eventos secundários que contribuem para exacerbar a perda tecidual observada no período pós-trauma, comprometendo o retorno da função locomotora e sensitiva, como já descrito por Dumont et al. (2001); McDonald e Sadowsky, (2002); Kwon et al. (2004).

Somente 96 horas pós-injúria (4ª avaliação), observou-se que dois animais do grupo G2 apresentaram movimento discreto de uma articulação dos MPs (escore 1 - teste BBB), enquanto que no G3 (PnTx3.6) todos já apresentavam movimentos em pelo menos uma das articulações dos MPs. Embora não tenha sido evidenciada diferença significativa entre os grupos com trauma, o maior número de animais do grupo G3 sugere que esses retornaram mais rapidamente com os movimentos.

Nas avaliações subsequentes, os animais mantiveram-se no escore 1, sendo este comportamento deambulatório atribuído, principalmente à intensidade do trauma. Curiosamente, no 8º dia foram observados movimentos nas três articulações dos MPs (escore 4), em um dos animais de cada grupo com trauma. Provavelmente, este fato ocorreu devido à melhora espontânea e individual dos animais, uma vez que este comportamento foi único, não acompanhando a tendência do grupo (Anexo 2 – dados individuais). Comumente, pesquisadores optam por infligir traumas experimentais à medula espinhal de intensidade leve a moderada (Basso et al., 1996; Kunkel Bagden et al., 1993). Em um experimento conduzido por Basso et al. (1995), os ratos submetidos ao trauma medular leve apresentaram recuperação funcional considerável, escore 19 na escala BBB, em quatro semanas após a lesão, sem qualquer tratamento. Nestes casos, ocorre maior preservação do tecido nervoso e quando são avaliados os efeitos de diferentes tratamentos, comumente a resposta observada é favorável.

Contudo, a aplicação posterior em pacientes pode ficar comprometida, uma vez que a maioria apresenta lesão medular grave (Sekhon e Felings, 2001). Em conjunto estes aspectos determinaram a escolha por um trauma de intensidade grave para o referido estudo.

Contrariamente ao relatado por Rezende et al. (1991) que empregou a PnTx3 em ratos via intracérebroventricular na dose de 0,04 µg/kg, não foi observada paralisia flácida no presente estudo. Essa incapacidade motora foi atribuída a ação inibitória da Pntx3-6 na liberação de neurotransmissores (Gomez et al., 1995; Prado et al., 1996), e provavelmente não foi aqui verificada pela diferença na via de administração e/ou pela dose empregada, não atuando dessa forma em estruturas centrais responsáveis pelo controle motor. Como demonstrado pelas diferentes avaliações comportamentais deste estudo, verificou-se que a administração da sub-fração da toxina PnTx3-6 pela via intralesional não ocasionou em piora do quadro clínico após o trauma, podendo assim constituir uma interessante via de administração terapêutica.



**Figura 3.** Gráfico de teste de Basso, Beattie e Brasnaham com as medianas de ratos wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou à trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3-6, avaliados por 8 dias

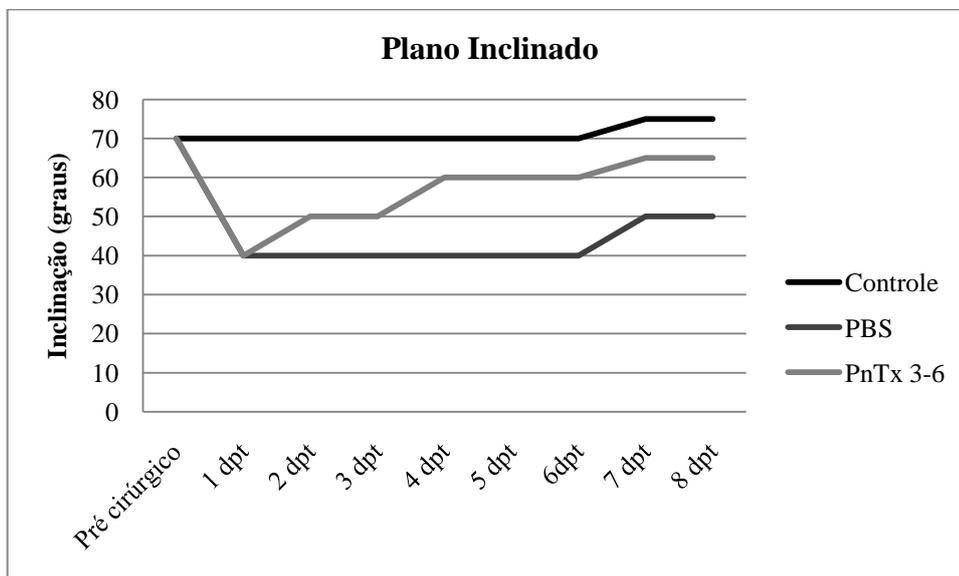
Na avaliação do plano inclinado foram observados resultados semelhantes aos do teste BBB, ocorrendo também início de recuperação a partir da 4<sup>a</sup> avaliação, com melhora no escore (Tab.3 e Fig.4). Neste exame, o grupo G1 foi diferente do G2 ( $p < 0,05$ ), porém, semelhante a G3, ou seja, a partir deste dia de avaliação, o grupo tratado com a sub-fração da toxina PnTx3-6 também foi similar ao grupo da laminectomia ( $p > 0,05$ ).

Muito embora não tenha sido observada diferença estatística entre os grupos com trauma (G2 e G3) ( $p > 0,05$ ), os animais do G3 conseguiram se manter a 60° (escore 3), enquanto que os pertencentes ao grupo PBS ainda se mantiveram a 40° (escore 1). No presente estudo, a recuperação dos animais pode ser melhor visualizada no teste do plano inclinado, assim como a diferença entre os tratamentos, constituindo assim um prognóstico mais promissor que o observado no teste BBB.

**Tabela 3.** Teste do plano inclinado com as medianas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3-6, avaliados por 8 dias.

Dias de avaliação	Laminectomia (G1)	Trauma + PBS (G2)	Trauma + PnTx3.6 (G3)
Pré-cirúrgico	70 <sup>a</sup>	70 <sup>b</sup>	70 <sup>a</sup>
1º	70 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>
2º	70 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>
3º	70 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>
4º	70 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	60 <sup>a,b</sup>
5º	70 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	60 <sup>a,b</sup>
6º	70 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	60 <sup>a,b</sup>
7º	75 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>	65 <sup>a,b</sup>
8º	75 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>	65 <sup>a,b</sup>

Medianas seguida de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (P>0,05).



**Figura 4.** Gráfico de teste do plano inclinado com as medianas de ratos Wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou a trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3-6, avaliados por 8 dias

Em relação a reação de propriocepção, foi observada ausência de resposta ao longo do período experimental, demonstrando a natureza grave da lesão adotada no presente estudo. Estatisticamente, não foi observada diferença entre os grupos com trauma ( $p>0,05$ ). Como mencionado por Lorenz e Kornegay (2004) o desempenho da propriocepção depende da integridade dos sistemas sensorial e motor, estando os tratos relacionados aos impulsos aferentes dispostos periféricamente na medula espinhal. Esta distribuição neuroanatômica determina que a propriocepção seja a primeira função a ser perdida e a última a retornar após lesões medulares. Possivelmente, no presente estudo poderia ter sido constatada recuperação desta função, caso o período observacional fosse maior.

Na avaliação do reflexo de retirada (sensibilidade dolorosa) observou-se resposta reduzida dos animais pertencentes aos grupos com trauma G3 e G2 (Anexo 3), havendo recuperação desta função na sexta e oitava avaliações, respectivamente. Também para esta variável não houve diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ). Sědý (2008) mencionou que a avaliação do reflexo de retirada é subjetiva e pouco precisa, principalmente quando interpretada isoladamente, sendo recomendado, desta forma, a associação com outras observações, como realizado no referido projeto.

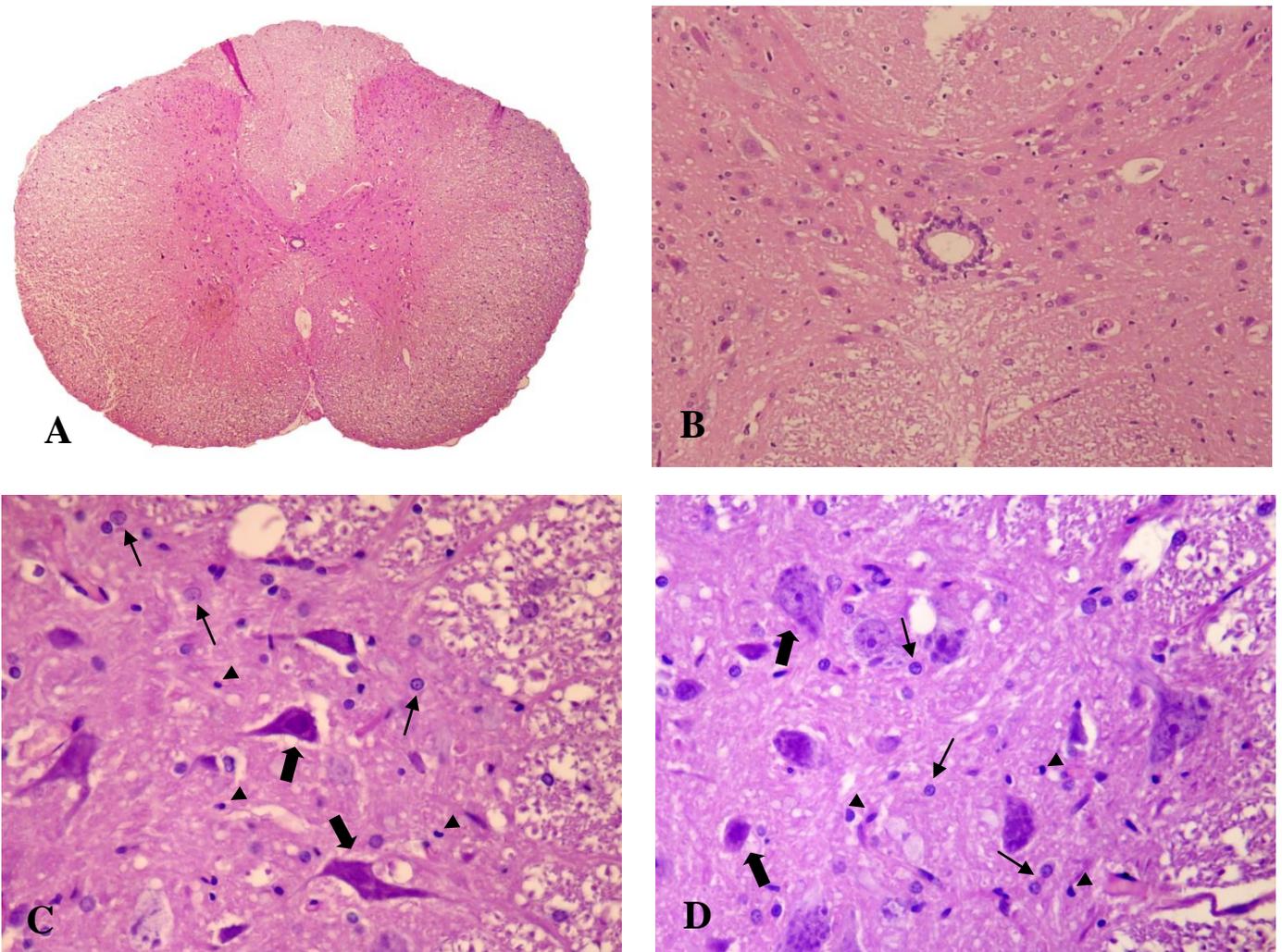
#### **4.1. Avaliações macro e microscópicas da medula espinhal e imunohistoquímica**

À macroscopia, as medulas espinhais dos animais dos grupos G2 (PBS) e G3 (PnTx3-6) apresentaram dura-máter e leptomeninges mais aderidas ao corpo vertebral na região da vértebra torácica 12, local da laminectomia e do trauma medular. Observou-se ainda na porção dorsal da medula espinhal, depressão tecidual com congestão e hemorragia moderadas, estendendo-se discretamente nos segmentos medulares cranial e caudal adjacentes. Já as medulas espinhais dos ratos pertencentes ao grupo G1 não apresentaram qualquer alteração, como era de se esperar visto que estes animais foram submetidos apenas à laminectomia.

Microscopicamente, os animais do grupo G1 apresentaram tecido normal nos três segmentos avaliados (epicentro, cranial e caudal), com preservação da arquitetura tecidual e ausência de alterações que caracterizassem degeneração. Observou-se a medula espinhal, arredondada, circundada pelas meninges, com nítida individualização das substâncias branca e cinzenta. A substância branca ocupou a parte mais periférica da medula espinhal em todo o seu diâmetro, sendo constituída por fibras axonais, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, neurópilo (tecido de sustentação) e vasos sanguíneos. Circundada pela substância branca, a substância cinzenta com formato de H, era constituída de corpos neuronais, fibras axonais, astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e alguns vasos sanguíneos (Fig. 5). Foi

identificado ainda o canal medular ou ependimário, localizado na região central da medula espinhal, precisamente na comissura central da substância cinzenta (McGavin e Zachary, 2007). Estes achados são importantes por demonstrar que a realização da laminectomia não acarretou em alterações morfológicas na medula espinhal, como já

evidenciado pelos escores máximos das avaliações motoras dos animais do grupo G1. Em estudo semelhante de trauma medular, Torres et al. (2010) também não observaram alterações microscópicas na medula espinhal dos ratos pertencentes ao grupo submetido à laminectomia.



**Figura 5** A) Visão geral da medula na região da laminectomia de um animal do grupo G1 (controle) (Aumento de 8,8x H.E.) B) Substância cinzenta e branca apresentando características de normalidade (Aumento de 34x H.E.) C e D) Visão em detalhe da substância cinzenta, mostrando corpos neuronais (seta larga), astrócitos (seta fina) e oligodendrócitos (cabeça de seta) (Aumento de 80x H.E.)

Em relação aos animais submetidos ao trauma, grupos G2 e G3, foram verificados padrões histológicos semelhantes entre si, havendo, contudo variação quanto à intensidade da lesão tecidual. A região do epicentro, mais lesionada, teve como principal característica áreas de malácia mais extensas, quando comparada aos segmentos cranial e caudal. Os animais do grupo G2 (PBS) apresentaram áreas de malácia acentuada e difusa, acometendo as substâncias branca e cinzenta. Observou-se grande quantidade de células gitter, associadas à degeneração e tumefação axonal moderada a acentuada e câmaras de digestão. Malácia simétrica, acometendo toda a medula estava presente em todos os animais do grupo. Observou-se ainda gliose acentuada difusa associada a degeneração e necrose neuronal moderada a acentuada multifocal com neuroniofagia (Fig. 6).

Os animais do grupo G3 (PnTx3-6) apresentaram padrões semelhantes aos do grupo G2 (PBS), porém, as áreas de malácia com células gitter, degeneração e tumefação axonal acometiam principalmente o funículo dorsal da substância branca. Observou-se também gliose, moderada difusa, com maior intensidade nas proximidades das regiões de malácia associada à degeneração e necrose neuronal moderada multifocal (Fig. 6).

A avaliação de cortes histológicos da região cranial ao epicentro do trauma medular apresentou degeneração e tumefação axonais. A diferença observada entre os grupos G2 e G3 restringiu-se a intensidade e abrangência da

degeneração. Nos animais do grupo G2 observou-se degeneração difusa de intensidade discreta a moderada, predominando no funículo dorsal da substância branca com presença discreta de células gitter e gliose discreta difusa na substância cinzenta. No grupo G3, três animais (3/6) não apresentavam qualquer lesão e, nos demais essas alterações morfológicas estavam restritas ao funículo dorsal da substância branca e apenas dois destes animais apresentavam gliose discreta e difusa.

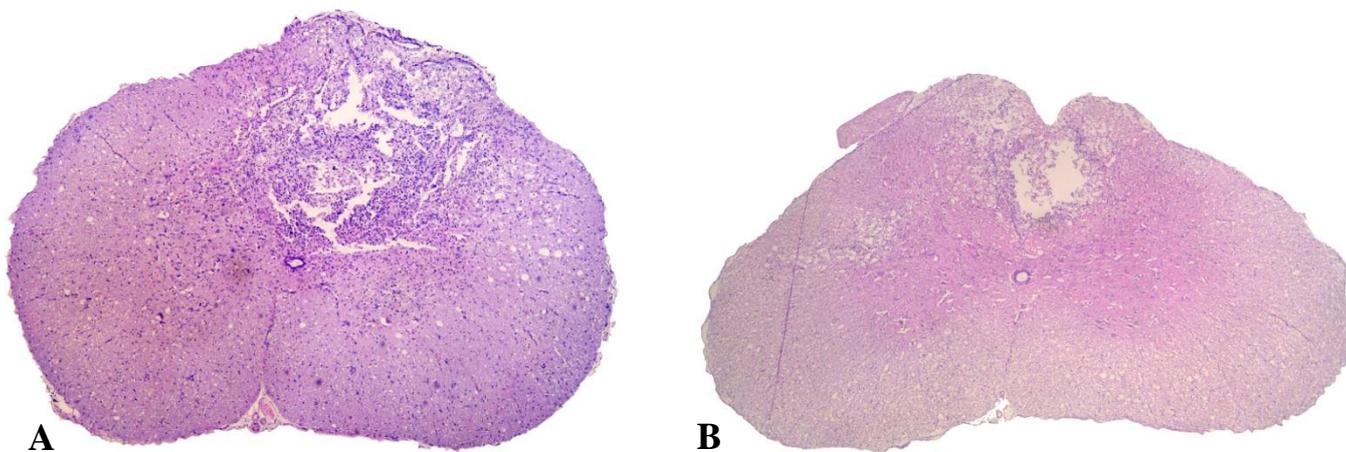
Os segmentos medulares caudais dos animais oriundos do grupo G2 apresentaram área de malácia focalmente extensa, ainda que restrita à região do funículo dorsal da substância branca, com presença de células gitter associada à acentuada degeneração axonal multifocal/focalmente extensa com tumefação axonal e câmara de digestão. Na substância cinzenta observou-se gliose moderada e acentuada difusa.

Já no grupo G3, três animais (3/6) apresentam no segmento caudal uma região de malácia focalmente extensa no funículo dorsal, com presença de células gitter, degeneração axonal multifocal discreta a moderada. Ainda, um animal não apresentou lesão aparente, tendo preservada a arquitetura tecidual e os outros apresentaram apenas degeneração axonal multifocal discreta, associado à tumefação axonal, ainda que predominantemente no funículo dorsal. Na substância cinzenta pode-se observar gliose discreta a acentuada, com degeneração neuronal variando de discreta e difusa à moderada difusa. Neste segmento foi

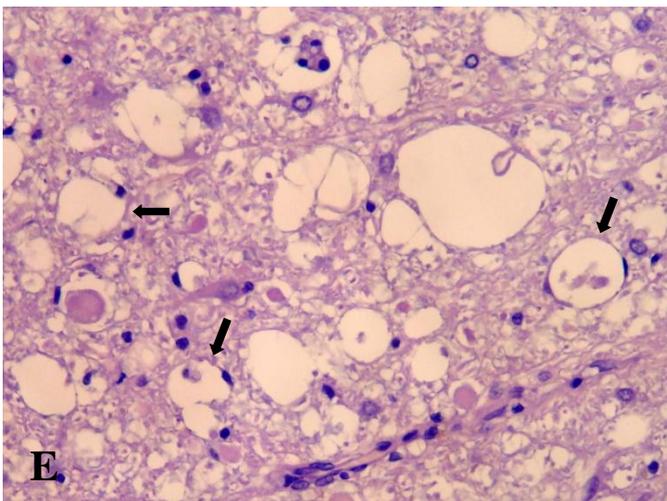
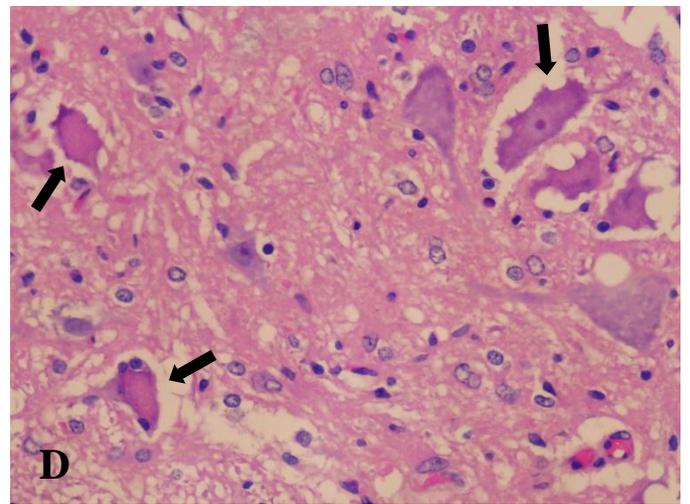
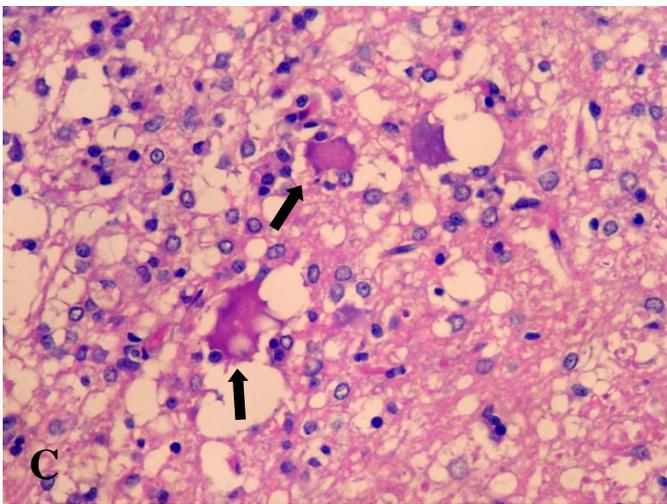
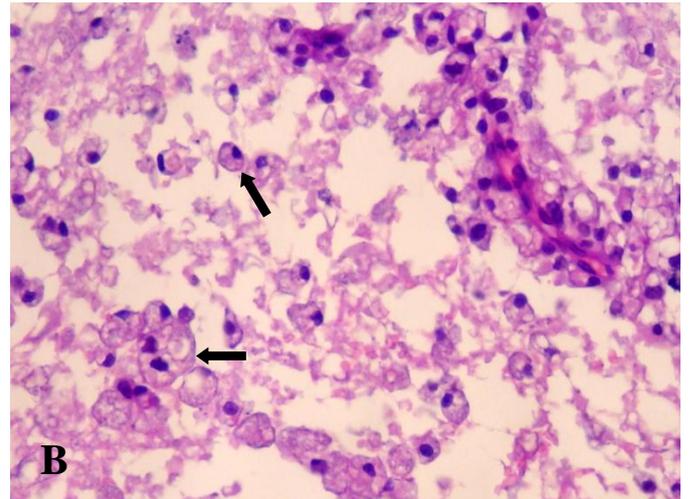
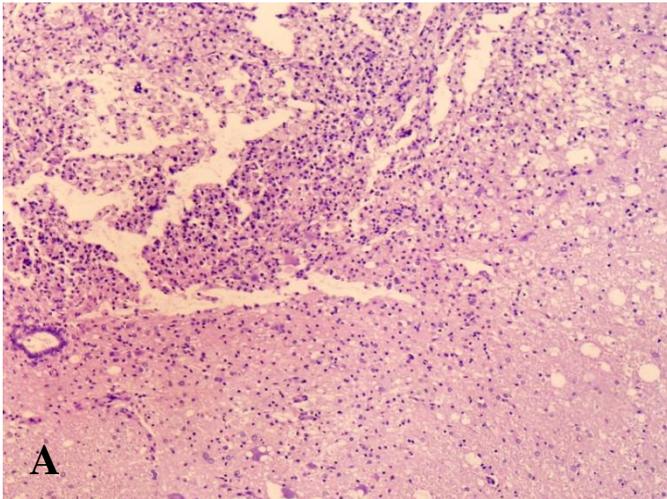
verificada também que a medula espinhal dos animais do grupo G3 apresentaram-se morfológicamente melhores que os do grupo G2.

Frente à injúria primária intensa, a lesão secundária e os danos teciduais consequentes tendem a progredir em ambas as direções a partir do epicentro da lesão (Beattie, 2004), como os observados no presente estudo. De forma semelhante ao observado por Cao et al. (2005), o modelo de trauma compressivo utilizado no presente estudo foi capaz de causar lesões histológicas correlacionadas a déficits sensoriais e motores graves, como os descritos previamente. Sugere-se que as lesões, aparentemente mais discretas do grupo G3

(PnTx3-6), possam ser devido à menor ativação dos eventos decorrentes ao trauma secundário. O aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  é responsável por uma série de distúrbios e eventos celulares, que culminam na morte celular principalmente por mecanismos apoptóticos. Com o bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$  pela sub-fração Pntx3-6 e consequente redução na liberação do glutamato (Vieira et al., 2003; Vieira et al., 2005; Souza et al., 2008), o mecanismo de lesão secundária poderia ter sido atenuado, promovendo menores lesões histológicas e possível recuperação funcional dos animais.



**Figura 6** A) Visão geral da medula na região do epicentro de um animal do grupo G2 (PBS)(Aumento de 7,2x H.E.) B) Visão geral da medula na região do epicentro de um animal do grupo G3 (PnTx 3-6) (Aumento de 5,2x H.E.)



**Figura 7** A) Visão geral da degeneração das substâncias branca e cinzenta com presença de malácia e células gitter (Aumento de 12x H.E.) B) Células gitter (seta) e necrose neuronal na substância cinzenta (Aumento de 96x H.E.) C) Neuroniofagia (seta) (Aumento de 80x H.E.) D) Neurônios degenerados(seta) em maior aumento e células gitter (Aumento de 80x H.E.) E) Degeneração da substância branca com tumefação axonal (Aumento de 80x H.E.)

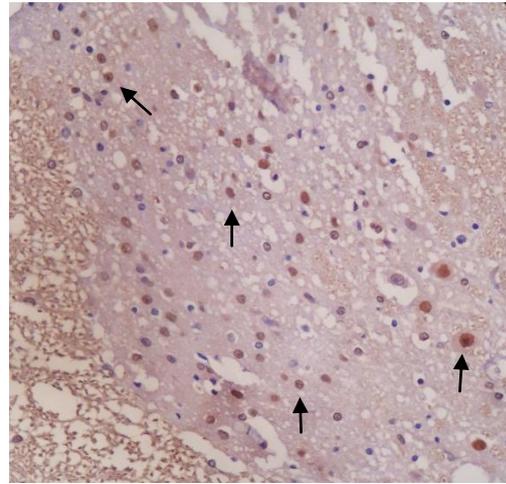
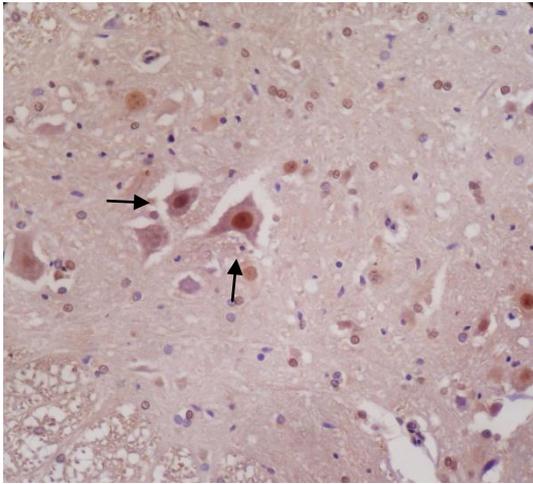
Para confirmar esses achados morfológicos realizou-se então, a marcação e quantificação da proteína Neu-N. A contagem de diferentes tipos celulares específicos no sistema nervoso é uma maneira eficiente para se avaliar a sobrevivência tecidual, sendo importante para determinar o impacto tanto da lesão quanto de tratamentos propostos sobre as populações celulares submetidas ao trauma medular (Casella et al., 2004). A proteína NeuN (*Neuronal Nuclei*) é expressa exclusivamente em neurônios, aparecendo desde o início do desenvolvimento e persistindo por toda a vida adulta em mamíferos. A expressão de altas concentrações de NeuN indica a viabilidade

neuronal, sendo este um importante marcador para se avaliar a integridade dos neurônios e consequentes efeitos benéficos na sobrevivência deste tipo celular quando submetidos a um tratamento experimental, o que pode ser interpretado como neuroproteção (Mullen et al., 1992). Surpreendentemente, este fato não foi observado em nosso estudo, visto que a contagem de corpos neuronais marcados com o anticorpo monoclonal Neu-N não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com placebo, sendo estes dois grupos diferentes do grupo controle ( $P > 0,05$ ) (Figura 8 e Tab.4).

**Tabela 4.** Médias e desvio padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos em ratos Wistar.

Grupo	Células marcadas
Laminectomia (G1)	141,2 ± 6,18 <sup>a</sup>
Trauma + PBS	105,5 ± 19,52 <sup>b</sup>
Trauma + PnTx3.6	114 ± 17,34 <sup>b</sup>

Medianas seguida de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si ( $P > 0,05$ ).



**Figura 8** Cortes histológicas com neurônios marcados pela proteína Neu-N (Seta), no corno ventral (A) e dorsal (B) da substância cinzenta (Aumento de 80x Imunohistoquímica).

A injúria medular realizada no presente estudo, de intensidade grave, pode ter dificultado a avaliação dos efeitos benéficos do tratamento com a sub-fração PnTx3-6. Danos graves consequentes à lesão primária, associados ao curto tempo de observação, podem ter reduzido a modulação de eventos responsáveis pela injúria secundária, não oferecendo assim, condições favoráveis à neuroproteção mediadas por esta toxina. Paralelamente, a dose empregada pode ter sido insuficiente para minimizar as alterações decorrentes do trauma grave, sendo assim recomendada a realização de outros estudos com doses variadas associadas a diferentes intensidades de injúria medular.

Ressalta-se que o presente estudo foi pioneiro em empregar a sub-fração da toxina

PnTx3-6 para o tratamento da injúria medular. Estudos anteriormente realizados com esta toxina, empregaram-na principalmente em modelos *in vitro* (Vieira et al., 2003; Vieira et al., 2005) e desta forma não foram estabelecidas ainda a farmacocinética, a janela terapêutica e a via adequada de sua administração.

## 5. Conclusões

- A toxina PnTx3.6 não foi capaz de promover neuroproteção visualizada clinicamente frente ao trauma medular agudo grave.

- Outros estudos devem ser realizados utilizando-se diferentes doses, diferentes tempos de observação pós-trauma e trauma medular agudo moderado .

## 6. Anexos

### 6.1. Anexo 1 - Protocolo de aprovação do CETEA UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

#### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 10/2009**, relativo ao projeto intitulado "*Efeito da subfração PnTx3-6 do veneno de Phoneutria nigriventer no tratamento do trauma à medula espinhal de ratos Wistar*", que tem como responsável(is) **Eliane Gonçalves de Melo**, está(ão) 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 **1/ 04/2009**.

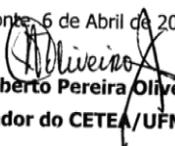
Este certificado expira-se em **1/ 04/ 2014**.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 10/2009**, related to the project entitled "*Effect of subfraction PnTx3-6 from Phoneutria nigriventer poison in the treatment of spinal trauma of Wistar rats*", under the supervisors of **Eliane Gonçalves de Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 1, 2009**.

This certificate expires in **April 1, 2014**.

Belo Horizonte, 6 de Abril de 2009.

  
**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) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1 0)

## 6.2. Anexo 2 - Dados individuais obtidos no teste de BBB

Dados individuais obtidos no teste de Basso, Beattie e Bresnahan com os escores de ratos wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou à trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3.6, avaliados por 8 dias.

Animal	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação	4ª Avaliação	5ª Avaliação	6ª Avaliação	7ª Avaliação	8ª Avaliação
A1 G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A2 G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A3 G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A4 G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A5 G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A6 G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A1 G2	0	0	0	0	0	0	0	1
A2 G2	0	0	0	0	0	0	1	4
A3 G2	0	0	0	0	1	1	1	1
A4 G2	0	0	0	1	0	0	1	4
A5 G2	0	1	1	1	1	1	4	6
A6 G2	0	0	0	0	0	0	1	1
A1 G3	0	0	0	1	1	1	1	4
A2 G3	0	0	0	1	1	1	4	4
A3 G3	0	0	0	1	1	1	1	1
A4 G3	0	0	0	1	1	1	1	1
A5 G3	0	0	0	1	1	1	1	1
A6 G3	0	1	1	1	1	1	1	1

### 6.3. Anexo 3 - Dados individuais obtidos na avaliação do reflexo de retirada

Dados individuais obtidos na avaliação do reflexo de retirada (sensibilidade dolorosa) com os escores de ratos wistar submetidos à laminectomia (Controle – G1) ou à trauma medular, incluindo os sem tratamento (PBS – G2) e os tratados com a toxina PnTx3.6, avaliados por 8 dias. 0=Resposta ausente ; 1= Resposta diminuída ; 2= Resposta normal

Animal	1 Av.	2 Av.	3 Av.	4 Av.	5 Av.	6 Av.	7 Av.	8 Av.
G1 A1	2	2	2	2	2	2	2	2
G1 A2	2	2	2	2	2	2	2	2
G1 A3	2	2	2	2	2	2	2	2
G1 A4	2	2	2	2	2	2	2	2
G1 A5	2	2	2	2	2	2	2	2
G1 A6	2	2	2	2	2	2	2	2
G2 A1	2	2	2	2	2	2	2	2
G2 A2	2	2	2	2	2	2	2	2
G2 A3	1	1	1	1	1	1	2	2
G2 A4	1	1	1	1	1	1	1	2
G2 A5	2	2	2	1	1	1	2	2
G2 A6	2	2	2	1	1	1	1	2
G3 A1	2	2	2	2	2	2	2	2
G3 A2	1	1	2	2	2	2	2	2
G3 A3	2	2	2	2	2	2	2	2
G3 A4	2	2	2	2	2	2	2	2
G3 A5	2	1	1	1	1	2	2	2
G3 A6	2	2	2	2	2	2	2	2

## 7. Referências bibliográficas

- ACKERY, A.; TATOR, C.; KRASSIOUKOV, A. A global perspective on spinal cord injury epidemiology. *J Neurotrauma*, v. 21, n. 10, p. 1355-1370, 2004.
- BASSO, D.M.; BEATIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, v. 12, n. 1, p. 1-21, 1995.
- BASSO, D.M.; BEATIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C.; et al. MASCIS Evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *J Neurotrauma*, v. 13, n. 7, p. 343-359, 1996.
- BASSO, D.M. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J Neurotrauma*, v. 21, n. 4, p. 395-404, 2004.
- BASU, S.; HELLBERG, A.; ULUS, A.T; et al. Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia. *FEBS Letters*, v. 508, p. 36-38, 2001.
- BEATTIE, M.S.; FAROOQUI, A.A.; BRESNAHAN, J.C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, v. 17, p. 915- 925, 2000.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: Mechanisms and clinical syndromes. *Vet Med*, nov., p.846-850, 2000.
- BORGES, M.H.; LIMA, M.E.; STANKIEWICZ, M.; et al. Structural and functional diversity in the venom of spiders of the genus *Phoneutria*. In: LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M.C.; MARTIN-EUCLAIRE, M.F.; ZINGALI, R.B.; ROCHAT, H. *Animal toxins: state of the art: perspectives in health and biotechnology*. 1 Ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009, p.291 – 311.
- BOUCHER BA, PHELPS SJ. Acute management of the head injury patient. In: DIPIRO JT, TALBERT RL, YEE GC, et al. *Pharmacotherapy: A Pathophysiological Approach*.3 ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997, p. 1229–42.
- CAO, Q.; ZHANG, Y.P.; IANNOTTI, C.; et al. Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat. *Exp. Neurol.*, v.191, p.S3-S16, 2005.
- CATTERALL, W.A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T.P.; et al. *Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. *Pharmacol Rev*, v. 57, p. 411-425, 2005.
- CASELLA, G.T.B.; BUNGE, M.B.; WOOD, P.M. Improved immunocytochemical identification of neural, endothelial, and inflammatory cell types in paraffin-embedded injured adult rat spinal cord. *J Neu Meth*, v. 139, p. 1-11, 2004.
- CHOI, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, v. 7, p. 360-379, 1987.
- CHOI, D.W. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*, v. 23, p. 1261-76, 1992.
- CITRON, B.A; ARNOLD,P.M.; HAYNES, N.G.; et al. Neuroprotective effects of caspase-3 inhibition on functional recovery and tissue sparing after acute spinal cord injury. *Spine*, v. 33, p. 2269-2277, 2008.
- CORDEIRO, M.N.; FIGUEIREDO, S.G.; VALENTIM, A.C.; et al. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, v. 31, p. 35–42, 1993.

- CUZZOCREA, S.; RILEY, D.P.; CAPUTI, A.P.; et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, v. 53, p. 135–159, 2001.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differentiation*, v. 3, p. 71-78, 1996.
- DOS SANTOS, R.G.; RENTERGHEM, C.V.; MARTIN-MOUTOT, M.; et al. *Phoneutria nigriventer*  $\omega$ -Phonetoxin IIA blocks the  $Ca_{v2}$  family of calcium channels and interacts with  $\omega$ -Conotoxin-binding sites. *J Biol Chem*, v. 277, p. 13856-13862, 2002.
- DUMONT, R.J.; OKONKWO, D.O.; VERMA, S.; et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol*, v.24, p. 254-264, 2001.
- DUSART, I.; SCHWAB, M.E. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, v. 6, p. 712-724, 1994.
- FALCONER, J.C.; NARAYANA, P.A.; BHATTACHARJEE, M.; et al. Characterization of an experimental spinal cord injury model using waveform and morphometric analysis. *Spine*, v. 21, p. 104-112, 1996.
- FAROOQUE, M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathol*, n. 100, p. 13-22, 2000.
- FIGUEIREDO, S.G.; GARCIAS, M.E.L.P; VALENTIM, A.C.;et al. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin tx4(6-1) from the venom of the ‘armed’ spider *Phoneutria nigriventer* (keys). *Toxicon*, v. 33, p. 83-93, 1995.
- FEHLINGS, M.G.;TATOR, C.H. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*, v. 132, p. 220-228, 1995.
- GALE, K.; KERASIDIS, H.; WRATHALL, J.R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp. Neurol*, v. 88, p. 123-134, 1985.
- GASIC, G.P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol*, v. 54, p. 507-536, 1992.
- GHASEMLOU, N.; KERR, B.J.; DAVID, S. Tissue displacement and impact force are important contributors to outcome after spinal cord contusion injury. *Exp Neurol*, v. 196, p. 9-17, 2005.
- GOMEZ, M.V; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIN, C.; PRADO, M.A.M. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol*, v.22, p.579-588, 2002.
- GOMEZ, R.S.; CASALI, T.A.; ROMANO-SILVA, M.A. et al. The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. *Neurosci Lett*, v.196, p.131–133, 1995.
- GRILL, R.J. User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. *Exp Neurol*, v. 196, p. 1-5, 2005.

- GRUNNER, J.A.; YEE, A.K.; BLIGHT, A.R. Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression. *Brain Res*, v.729, p. 90-101, 1996.
- GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M.A.; CRUZ, J.S. et al. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Brit Journal of Pharmacol*, v.122, p.591-597, 1997.
- HALL, E.D.; SPRINGER, J.E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: A reappraisal. *NeuroRx*, v. 1, p. 80-100, 2004.
- IWANAMI, A.; YAMANE, J.; KATOH, H.; ET AL. Establishment of graded spinal cord injury model in a nonhuman primate: the common marmoset. *J Neurosci Res*, v. 80, p. 172-181, 2005.
- KUHN, P.L., WRATHALL, J.R. A mouse model of graded contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma*, v. 15, p. 125-140, 1998.
- KLUSMAN, I.; SCHWAB M.E. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res*, v. 762, p. 173-184, 1997.
- KUNKEL-BAGDEN, E.; DAI, H-N.; BREGMAN, B.S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, v. 119, p. 153-164, 1993.
- KWON, B.K.; TETZLAF, W; GRAUER, J.N.; et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J*, v. 4, p. 451-464, 2004.
- KWON, B.K.; OXLAND, T.R.; TETZLAFF, W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, v. 27, n. 14, p. 1504-1510, 2002.
- LANZ, O.; BERGMAN, R.; SHELL, L. Initial assessment of patients with spinal cord trauma. *Vet Med*, nov., p.851-854, 2000.
- LEÃO, R.M.; CRUZ, J.S.; DINIZ, C. R. et al. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-*Phoneutria nigriventer* Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, v.39, p.1756-1767, 2000.
- LEWÉN, A.; MATZ, P.; CHAN, P.H. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma*, v. 17, p. 871-890, 2000.
- LI, M.; ONA, V.O.; CHEN, M.; et al. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neurosci*, v.99, p. 333-342, 2000.
- LIM, P.A.C.; TOW, A.M.; Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med*, v. 36, p.49-57, 2007.
- LIMA, M.E.; STANKIEWICZ, M.; HAMON, A.; et al. The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na<sup>+</sup> current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. *J Insect Physiol*, v. 48, p. 53-61, 2002.
- LIMA, M.E.; FIGUEIREDO, S.G.; PIMENTA, A.M.C.; et al. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp Biochem Physiol C*, v. 146, p. 264-279, 2007.

- LORENZ, M.D.; KORNEGAY, J.N. *Handbook of Veterinary Neurology*. 4 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2004, 480 pgs.
- MATTSON, M.P. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, v. 6, p. 337-350, 2007.
- MCDONALD, J.W.; SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. *Lancet*, v. 359, p. 417-425, 2002.
- MCGAVIN, M.D; ZACHARY, J.F. *Pathologic basis of veterinary disease*. 4. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 833-868.
- METZ, G.A.S; MERKLER, D.; DIETZ, V.; et al. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res*, v. 883, p. 165-177, 2000.
- MODY, I.; MCDONALD, J.F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Trends Pharmacol Sci*, v. 16, p. 356-359, 1995.
- MUIR, G.D.; WEBB, A.A. Assessment of behavioral recovery following spinal cord injury in rats. *Euro J Neurosci*, v. 12, p. 3079-3086, 2000.
- MULLEN R.J.; BUCK, C.R.; SMITH, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, v. 116, p. 201-211, 1992.
- OLBY, N.; HALLING, K.B.; GLICK, T.R. Rehabilitation for the neurologic patient. *Vet Clin Small Anim*, v. 35, p. 1389-1409, 2005.
- OLBY, N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. *J Vet Intern Med*, v. 13, p. 399-407, 1999.
- PINHEIRO, A.C.N.; GOMEZ, R.S.; MASSENSINI, A.R.; et al. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem Int*, v. 49, p. 543, 547, 2006.
- POPOVICH, P.G.; WEI, P.; STOKES, B.T. Cellular inflammatory response after spinal cord in Sprague-Dawley and Lewey rats. *J Comp Neurol*, v. 377, p. 443-464, 1997.
- PRADO ,M. A.M.; GUATIMOSIM C.; GOMEZ, M.V. 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*. *J Biochem*, v.314, p.145–150, 1996.
- RASH, L.D.; HODGSON, W.C.; Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, v. 40, p. 225-254, 2002.
- REIS, H.J.; PRADO, M.A.M.; KALAPOTHAKIS, E.; et al. Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (phoneutriatoxin 3-4) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J*, v. 343, p. 413-418, 1999.
- REZENDE, L.J; CORDEIRO, M.N.; OLIVEIRA, E.B.; DINIZ, C.R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, v.29, p.1225–1233, 1991.
- RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg*, v. 47, p. 577-581, 1977.
- ROSENZWEIG, E.S.;MCDONALD, J.W.; Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Curr Opin Neurol*, v. 17, p. 121-131, 2004

- SCHEFF, S.W.; RABCHEVSKY, A.G.; FUGACCIA, I., et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J Neurotrauma*, v. 20, n. 2, p. 179-193, 2003.
- SCHUMAN, S.L.; BRESNAHAN, J.C.; BEATTIE, M.S. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res*, v. 50, p. 798-808, 1997.
- SCHWARTZ, G; FEHLINGS, M.G.; Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg*, v. 94, p. 245-256, 2001.
- SĚDY, J.; URDŽÍKOVÁ, L.; JENDELOVÁ, P., et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 32, p. 550-580, 2008.
- SEKHON, L.H.S.; FEHLINGS, M.G.; Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v. 26, p. s2-s12, 2001.
- SHIELDS, D.C.; SCHAECHER, K.E.; HOGAN, E.L.; et al. Calpain activity and expression increased in activated glial and inflammatory cells in penumbra of spinal cord injury lesion. *J Neurosci Res*, v. 61, p. 146-150, 2000.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F.; et al. Efeito da predinisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v. 60, p. 641-650, 2008.
- SOUZA, A.H.; FERREIRA, J.; CORDEIRO, M.N.; et al. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Phalβ toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain*, v. 140, p. 115-126, 2008.
- SPRINGER JE, AZBILL RD, KNAPP PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, v. 5, p. 943-946, 1999.
- TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, v. 75, p. 15-26, 1991.
- TORRES, B.B.J.; MELO, E.G.; CALDEIRA, F.M.C.; et al. Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular agudo experimental. *Arq Bras Med Vet Zoo*, In press, 2010.
- VAQUERO, J.; ZURITA, M.; OYA, S.; SANTOS, M.; Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? *Neurosci Lett*, v. 396, p. 129-134, 2006.
- VIEIRA, L.B.; KUSHMERICK, C; REIS, H.J.; et al. PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K<sup>+</sup>-evoked increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem Int*, v.42, p. 277-282, 2003.
- VIEIRA, L.B.; KUSHMERICK, C; HIDELBRAND, M.E.; et al. Inhibition of High Voltage-Activated Calcium Channels by Spider Toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 314, p. 1370-1377, 2005.
- VON EULER, M.; ÅKESSON, E.; SAMUELSSON, E.B.; et al. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, v. 137, p. 242-254, 1996.
- VON EULER, M.; SEIGER, A.; SUNDSTRÖM, E. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp Neurol*, v. 145, p. 502-510, 1997.

WRATHALL, J.R; TENG, Y.D.; CHOINIERE, D. Amelioration of Functional Deficits from Spinal Cord Trauma with Systemically Administered NBQX, an Antagonist of Non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Exp Neurol*, v. 137, p. 119-126, 1996.

YOUNG, W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res*, v. 137, p. 231-255, 2002.

YOUNG,W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. *J Emerg Med*, v. 11, p. 13-22, 1993.