

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

TALITA LOPES SERRA

**ω-CONOTOXINA MVIIC E CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS,
ISOLADAS OU ASSOCIADAS NO TRATAMENTO DE RATOS
SUBMETIDOS AO TRAUMA MEDULAR AGUDO**

Belo Horizonte

2019

TALITA LOPES SERRA

**ω-CONOTOXINA MVIIC E CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS,
ISOLADAS OU ASSOCIADAS NO TRATAMENTO DE RATOS
SUBMETIDOS AO TRAUMA MEDULAR AGUDO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rogéria Serakides

Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária - UFMG

2019

S487c Serra, Talita Lopes. 1989 -
Conotoxina MVIIC e células tronco mesenquimais, isoladas ou associadas no tratamento de
ratos submetidos ao trauma medular agudo. / Talita Lopes Serra. - 2019
63p. ; il.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo

Dissertação apresentada a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

1. Conotoxina MVIIC – Teses. 2. Rato animal de laboratório - Teses. 3. Lesão medular –
Teses. 4. Traumatismo medula espinhal – Teses. 5. Medicamentos – administração – Teses.
I. Melo, Eliane Gonçalves. II. Serakides, Rogéria. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. III. Título.

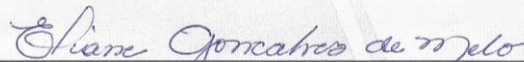
CDD – 636.0897

FOLHA DE APROVAÇÃO

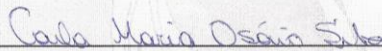
TALITA LOPES SERRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS .

Aprovada em 12 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof^a. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador



Prof^a. Carla Maria Osório Silva
Centro Universitário Newton Paiva



Prof. Benito Soto Blanco
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre cuidando de mim e dando forças nos momentos mais difíceis, mostrando-me por meios de diferentes caminhos e pessoas a não desistir da minha jornada.

A minha família, em especial aos meus pais, que estão sempre torcendo pelas minhas conquistas pessoais e profissionais, acreditando no meu potencial e me motivando nos momentos mais difíceis, não deixando desistir de trilhar o caminho da pós-graduação. Eles são as pessoas mais importantes, e devo tudo a eles, em especial a minha formação profissional que lutaram tanto para eu pudesse tê-la.

A professora Eliane Gonçalves de Melo, acreditou em mim como pessoa e profissionalmente durante todo o período da pós-graduação. Melhor pessoa que eu poderia ter conhecido, uma pessoa ética, responsável, amável, carinhosa, calma, que me orientou e me aconselhou em diversos momentos. Eu não teria concluído o mestrado sem o seu companheirismo na área acadêmica e na vida pessoal. Você é uma pessoa muito iluminada e especial para mim, muito obrigada!

Ao meu querido amigo Marcelo Carrijo da Costa presente em todos os momentos mesmo à distância, dando todo o suporte intelectual e emocional, além do incentivo necessário para a conclusão do mestrado, sempre cuidando de mim, muito obrigada pela sua grande amizade.

A Flaviani Emília dos Santos, uma grande amiga que ganhei no mestrado, sempre me apoiando e me incentivando em todos os momentos, muito obrigada pelo seu carinho e companheirismo, sem você não conseguiria ter concluído esta etapa. “O mestrado é bem melhor com você!”

A equipe de neurologia da UFMG pela paciência e valiosos ensinamentos, em especial a Maria Paula Rajão Costa Coelho e Carla Maria Osório Silva pela colaboração e execução no projeto, além de sua paciência e companheirismo nos ensinamentos da neurologia.

Às professoras Rogéria Serakides e Natália de Melo Ocarino do Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular (NCT-TCA) da UFMG, pela colaboração e disponibilização de todos os materiais para o cultivo celular. E a equipe do laboratório, em especial Fabrício Gomes Melo, Débora de Oliveira Spila, Camila Lana Rosa da Silva, Kênia Mara Magalhães Campos Cardoso e Lorena Alves Gomes, pelos ensinamentos passados no cultivo de células tronco, pela paciência nas explicações, pela amizade, boas risadas nos momentos tensos do experimento. Muito obrigada a todos pela participação neste projeto.

Aos alunos de iniciação científica Andrine Cristiane Soares de Souza, João Victor Primo e Daniel Rodrigues pelos cuidados aos animais, acompanhamento e dedicação durante todo o experimento.

Aos professores Marcus Vinícius Gomes e Karla Fernandes, e a equipe do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte pela parceria e apoio na execução das análises deste projeto.

A professora Érica Azedo Costa do departamento de Medicina Preventiva da UFMG e sua equipe pela colaboração e execução das análises de RT-qPCR em tempo real.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a Fapemig pelo apoio financeiro para realização e execução do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE QUADROS E TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Fisiopatologia do trauma medular	17
2.1.1 Alterações vasculares	18
2.1.2 Excitotoxicidade e desequilíbrio eletrolítico	19
2.1.3 Espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica	20
2.1.4 Inflamação	21
2.1.5 Morte celular	22
2.2 Terapias relacionadas ao trauma medular	25
2.2.1 Terapia com ω -conotoxina MVIIC	25
2.2.2 Terapia com células tronco	26
2.2.3 Células tronco mesenquimais (CTM)	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Extração, cultivo e caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais	29
3.2 Obtenção da ω -conotoxina MVIIC	30
3.3 Animais	30
3.4 Grupos Experimentais	31
3.5 Procedimentos anestésico e cirúrgico	32
3.6 Viabilidade celular, obtenção e administração das células tronco mesenquimais	33
3.7 Aplicação intratecal da ω -conotoxina MVIIC	34
3.8 Avaliação da função locomotora	34
3.9 Eutanásia e coleta de medula espinhal	34
3.10 Quantificação das espécies reativas de oxigênio	36
3.11 Avaliação da peroxidação lipídica	36
3.12 Avaliação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR)	37
3.13 Análise Estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Cultivo e caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais	40
4.2 Modelo experimental do trauma medular agudo	40
4.3 Avaliação da função locomotora em campo aberto	41
4.4 Quantificação das espécies reativas de oxigênio e mensuração do malondialdeído no tecido medular	45
4.5 Expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos no trauma medular	47
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7. ANEXO	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação das vias apoptóticas. Em resumo, na via extrínseca, um ligante como o fator de necrose tumoral (TNF) ou Fas se envolve com um receptor de membrana celular e forma o complexo que sinaliza a indução de morte celular (DISC). A caspase-8 (C8) é ativada pelo complexo citado e ativa as caspases 3 e 7 (C3/7), seja diretamente ou pela clivagem do Bid, e a mitocôndria torna-se permeável pelo Bax e Bak. Na via intrínseca, ocasionada pelos danos celulares como proteínas mal enoveladas (*unfolded protein*), radicais livres e lesão do DNA atuam no p53 e outras sensores ativando a proteína BH3, com ação antagonista das proteínas da família Bcl-2 (regulador do sistema mitocondrial), ocorrendo a permeabilização da mitocôndria por Bax e Bak. As duas vias convergem na liberação do citocromo c (Cyt. C) pela mitocôndria, com formação subsequente do apoptossomo, e este ativa a caspase-9 (C9) e, por sua vez ativa outras caspases efetoras. O Smac/DIABLO é liberado pelas mitocôndrias e são responsáveis por antagonizar os inibidores da caspase (IAPs). Fonte: Crawford e Wells, 2011. 24
- Figura 2** Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos *Wistar*. A) Remoção da lâmina dorsal da vértebra T12 com o *drill* pneumático neurológico. B) Medula espinhal exposta com hemorragia após a laminectomia. C) Aparelho MASCIS *Impactor* utilizado para induzir o trauma contusivo agudo na medula espinhal. 33
- Figura 3** Fotomicrografia de células tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea de ratos *Wistar*. Observe a característica morfológica semelhante a fibroblasto no cultivo celular em garrafa T75 cm² com DMEM e 10% de soro fetal bovino (objetiva 40x). 40
- Figura 4** Avaliação da função locomotora em campo aberto ao 7º dia pela escala de BBB em ratos *Wistar*. A) Animal do grupo CN, classificado no escore 21, observa-se sustentação do peso nos membros torácicos e pélvicos com estabilidade do tronco e cauda elevada. B) Animal do grupo CP, classificado no escore 0 a 1, nenhum movimento observável a movimento discreto de uma a duas articulações do membro pélvico. C) Animal do grupo CTM-MO, classificado no escore 20, observa-se sustentação do peso nos membros torácicos e pélvicos com instabilidade do tronco, e cauda elevada (esta última não observável na imagem). 43
- Figura 5** Representação gráfica do escore médio de avaliação da função motora em campo aberto durante os sete dias, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com PBS estéril (CP), ω -conotoxina (MVIIC), células tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) e sua associação (CTM-MO + MVIIC). Letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). 43

- Figura 6** Efeito da ω -conotoxina MVIIC, das células tronco mesenquimais (CTM-MO) e sua associação sobre a produção de espécies reativas de oxigênio sete dias após o trauma medular. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos níveis de ERO dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Nível de ERO nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $82,96 \pm 19,28$; CP $90,79 \pm 25,88$; MVIIC $78,85 \pm 19,33$; CTM-MO $84,30 \pm 14,01$; MVIIC + CTM-MO $114,64 \pm 19,27$. 45
- Figura 7** Efeito da ω -conotoxina MVIIC, das células tronco mesenquimais (CTM-MO) e sua associação sobre a peroxidação lipídica sete dias após o trauma medular. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos níveis de malondialdeído (MDA) dos grupos submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação de MDA nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $0,043 \pm 0,014$; CP $0,056 \pm 0,009$; MVIIC $0,058 \pm 0,027$; CTM-MO $0,070 \pm 0,030$ e MVIIC + CTM-MO $0,055 \pm 0,009$. 46
- Figura 8** Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico caspase-3 no tecido medular sete dias após o trauma contusivo. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação gênica da caspase-3 nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,19 \pm 0,78$; CP $1,12 \pm 1,18$; MVIIC $3,05 \pm 3,21$; CTM-MO $4,11 \pm 2,32$ e MVIIC + CTM-MO $5,47 \pm 10,37$. 47
- Figura 9** Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico caspase-8 no tecido medular sete dias após o trauma contusivo. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação gênica da caspase-8 nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,32 \pm 0,82$; CP $0,39 \pm 0,21$; MVIIC $7,05 \pm 12,66$; CTM-MO $2,50 \pm 2,60$ e MVIIC + CTM-MO $1,83 \pm 1,98$. 48

- Figura 10** Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico caspase-9 no tecido medular sete dias após o trauma contusivo. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Observou-se diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Quantificação gênica da caspase-9 nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,40 \pm 1,25$; CP $0,40 \pm 0,11$; MVIIC $5,49 \pm 7,68$; CTM-MO $0,55 \pm 0,20$ e MVIIC + CTM-MO $0,77 \pm 1,00$. Letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). 49
- Figura 11** Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico BAX no tecido medular sete dias após o trauma contusivo. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação gênica da BAX nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,18 \pm 0,71$; CP $0,81 \pm 0,54$; MVIIC $6,36 \pm 8,15$; CTM-MO $0,39 \pm 0,29$ e MVIIC + CTM-MO $0,08 \pm 0,18$. Letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). 50
-

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Escore de avaliação da função locomotora em ratos proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996) após o trauma medular torácico agudo.	35
Quadro 2	Genes e sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> iniciadores para RT-qPCR.	37
Tabela 1	Escore médio de avaliação da função locomotora em campo aberto, de ratos <i>Wistar</i> submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com PBS estéril (CP), ω -conotoxina (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (CTM-MO + MVIIC).	42

LISTA DE ABREVIATURAS

α	<i>Alfa</i>
β	<i>Beta</i>
Δ	<i>Delta</i>
μ	<i>Mi</i>
μg	Micrograma
μl	Microlitro
ω	<i>Ômega</i>
A	Absorbância
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
Apaf-1	<i>Apoptosis protease-activating factor 1</i> (fator de ativação das proteases pró-apoptóticas 1)
ATPase	Adenosina trifosfatase
ATP	Adenosina trifosfato
Bad	<i>Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Apoptosis regulador BAX</i>
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (fator neurotrófico derivado do encéfalo)
°C	Grau Celsius
Ca²⁺	Cálcio
CARD	<i>Caspase-recruitment domain</i>
CCVD	Canais de cálcio voltagem dependentes
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN	Controle negativo
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
CO₃	Carbonato
CP	Controle positivo
C_q	Ciclo quantitativo
C_T	<i>Threshold</i>
CT	Células tronco
CTA	Células tronco adultas
CTE	Células tronco embrionárias
CTM	Células tronco mesenquimais
CTM-MO	Células tronco mesenquimais da medula óssea
DCHF-DA	<i>2',7'-dichlorofluorescein diacetate</i>
DCF	Diclorofluoresceína
DED	<i>Death effector domain</i>

DHA	Docosaheptaenoic acid (ácido docosaheptaenóide)
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DNase	Desoxirribonuclease
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EPA	Eicosapentaenoic acid (ácido eicosapentaenoico)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EV	Escola de Veterinária
F	<i>Forward</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
Fas	<i>Cell-surface Fas receptor</i>
FLIP	<i>FADD-like-ICE-inhibitory protein or FLICE-inhibitory protein</i>
g	Gramma
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de nitrogênio
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen – DR isotype</i>
5-HT₃	Receptor de serotonina tipo 3
Hz	Hertz
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IEP-SCBH	Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IV	Intravenoso
kg	Kilograma
m	Metro
MASCIS	<i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i>
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MP	Membro pélvico
MT	Membro torácico
MVIA	ω -conotoxina MVIA
MVIIC	ω -conotoxina MVIIC
MVIIC + CTM-MO	ω -conotoxina MVIIC associado as células tronco mesenquimais da medula óssea
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCT-TCA	Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal
ng	Nanograma

nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
$\cdot\text{NO}_2$	Dióxido de nitrogênio
NSCISC	<i>National Spinal Cord Injury Statistical Center</i>
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superóxido altamente reativo
$\cdot\text{OH}$	Hidroxila
ONOO^{\cdot}	Peroxinitrito
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
pmol	Picomolar
R	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RNase	Ribonuclease
RO_2^{\cdot}	Peroxila
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase - quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SC	Subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/director IAP-binding protein with low pI</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
T	Vértebra torácica
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i> (ácido tiobarbitúrico)
TMA	Trauma medular agudo
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> (fator de necrose tumoral alfa)
TRIS-HCL	<i>Tris hydrochloride</i>
TRL-4	<i>Toll-like receptor 4</i> (receptor Toll-like 4)
u.a.	Unidade arbitrária
un	Unidade
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento do endotélio vascular)

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da ω -conotoxina MVIIC e das células tronco mesenquimais (CTM) de forma isolada e sua associação nos ratos submetidos ao trauma medular agudo. No estudo, foram utilizados trinta e seis *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, sendo seis animais, com trinta dias de idade, peso médio de 120 g, utilizados para a coleta e extração das CTM originadas da medula óssea, cultivadas até a terceira passagem. Os demais animais, machos, três meses de idade, com peso médio de 350 g, foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com seis animais: controle negativo (CN), controle positivo (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e associação (MVIIC + CTM-MO). O grupo CN foi submetido à laminectomia da vértebra T12 sem trauma medular, os demais grupos foram submetidos à laminectomia seguido de trauma medular contusivo. O grupo CP recebeu 10 μ l de PBS e o grupo MVIIC 10 μ l de PBS contendo 20 pmol da ω -conotoxina, ambos por via intratecal uma hora após o trauma medular. O grupo CTM-MO recebeu 0,2 ml de PBS contendo 1×10^6 de CTM via intravenosa na veia lateral da cauda 24 horas após o trauma, e o grupo MVIIC + CTM-MO recebeu 10 μ l contendo 20 pmol da ω -conotoxina MVIIC via intratecal uma hora após o trauma e 1×10^6 de CTM via IV após 24 horas do trauma medular agudo. Os animais foram observados durante sete dias. Foram avaliadas a função locomotora destes animais, a geração de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, e a expressão gênica dos fatores de apoptose. No tratamento com MVIIC + CTM-MO, observou-se recuperação da função motora dos animais após o trauma medular agudo e redução da expressão gênica do Bax ($p < 0,05$). Não houve redução do estresse oxidativo e dos fatores pró-apoptóticos caspases-3, 8 e 9 nos grupos estudados ($p > 0,05$). Pode-se concluir que, a associação da ω -conotoxina MVIIC às células tronco mesenquimais conferiu neuroproteção no TMA. A MVIIC agiu sinergicamente, melhorando sua ação e reduzindo a apoptose e, conseqüentemente, com recuperação da função motora.

Palavras-chave: conotoxina, terapia celular, lesão medular, bloqueadores de canais de cálcio, células tronco.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of ω -conotoxin MVIIC and mesenchymal stem cells (MSCs) isolated and its association in rats submitted to acute spinal cord trauma. Thirty-six *Rattus norvegicus*, Wistar strain, were used in the study. Six thirty-day-old animals, with an average weight of 120 g, were used for the collection and extraction of bone marrow-derived MSCs, cultivated until the third passage. The remaining animals, three-month-old males with an average weight of 350 g, were randomly distributed in five experimental groups with six animals: negative control (CN), positive control (CP), ω -conotoxin MVIIC (MVIIC), bone marrow mesenchymal stem cells (CTM-MO) and the association (MVIIC + CTM-MO). The CN group underwent T12 vertebra laminectomy without spinal cord trauma, and the other groups were submitted to laminectomy followed by contusive spinal cord trauma. The CP group received 10 μ l of PBS and the MVIIC group 10 μ l of PBS containing 20 pmol of ω -conotoxin, both intrathecally one hour after spinal cord trauma. The CTM-MO group received intravenously 0,2 ml of PBS, containing 1×10^6 of CTM, in the lateral tail vein 24 hours after the trauma, and the MVIIC + CTM-MO group received intrathecally 10 μ l containing 20 pmol of ω -conotoxin MVIIC, one hour after trauma, and 1×10^6 of CTM intravenously 24 hours after acute spinal cord trauma. The animals were observed for seven days. The locomotor function of these animals, the generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and gene expression of apoptosis factors were evaluated. In the treatment with MVIIC + CTM-MO, recovery of the motor function of the animals was observed after acute spinal cord trauma and reduction of Bax gene expression ($p < 0,05$). There was no reduction of oxidative stress and pro-apoptotic factors caspases-3, 8 and 9 in the studied groups ($p > 0,05$). It can be concluded that the association of ω -conotoxin MVIIC with mesenchymal stem cells conferred neuroprotection in acute medullar trauma. The MVIIC acted synergistically, improving its action and reducing apoptosis and, consequently, with recovery of motor function.

Keywords: conotoxin, cell therapy, spinal cord injury, calcium channel blockers, stem cells.

1. INTRODUÇÃO

O trauma medular agudo é uma afecção frequente na rotina da clínica de pequenos animais, e as lesões medulares são classificadas de acordo com sua origem. O trauma de origem endógena está relacionado a alterações degenerativas do disco intervertebral com extrusão ou protrusão, fraturas patológicas e anormalidades congênitas (Olby, 2010); aqueles de origem exógena, são decorrentes de atropelamentos, ferimentos por projéteis, quedas e brigas com outros animais. Na medicina veterinária existem poucos dados que informem quantos animais são acometidos por ano, porque muitos pacientes acometidos ao serem atendidos em clínicas e hospitais veterinários são submetidos a eutanásia pela gravidade da lesão ou pelo fator prognóstico desfavorável (Bahr Arias, Severo e Tudury, 2007; Mendes e Bahr Arias, 2012).

Na medicina humana existe uma base de dados atualizada anualmente, como exemplo citamos o Centro Nacional de Estatística de Lesão Medular dos Estados Unidos (NSCISC). Estima-se que a incidência de lesão medular seja de 54 casos/milhão de pessoas a cada ano, ou seja, 17.700 novos casos a cada ano, considerando o tamanho da população americana como 327 milhões de pessoas. Atualmente, a prevalência média é de 288 mil pessoas com lesão medular, e a maioria dos novos casos correspondem ao gênero masculino (75%). As principais causas destas lesões são em decorrência de acidentes automobilísticos, seguidos por quedas, incluindo também atos de violência (principalmente ferimentos a bala) e atividades esportivas e recreativas. Em humanos a tetraplegia incompleta (segmento medular parcialmente lesionado) é a lesão neurológica mais frequente, e menos de 1% dos pacientes apresentam a recuperação neurológica no momento da alta hospitalar (NSCISC, 2018).

Os indivíduos acometidos pela lesão medular convivem com esta patologia, que é considerada uma das mais debilitantes e com consequência devastadora para si e seus familiares. O trauma medular acarreta a redução da qualidade de vida para o paciente, pois as sequelas podem variar desde uma concussão medular até atingir *déficits* neurológicos transitórios ou provocar uma paralisia permanente (Kwon *et al.*, 2004; Eckert e Martin, 2017). A qualidade de vida se reduz drasticamente com desafios na recuperação e reabilitação desses pacientes. Além disso, existem também o sofrimento emocional, custos financeiros decorrentes de cirurgias, reabilitações e cuidados especiais que afeta o seu entorno familiar (Hulsebosch, 2000; Campagnolo, Bartlett e Keller, 2000, Hall e Springer, 2004; Wu e Ren 2009).

A fisiopatologia do trauma medular envolve mecanismos primários e secundários. A lesão primária é o resultado de forças mecânicas que incluem flexão, extensão, carga axial, rotação e distração no evento traumático (Yip e Malaspina, 2012; Witiw e Fehlings, 2015), provocando a ruptura de osteoligamentos e esmagamento de elementos neuronais (axônios, corpos neuronais, células da glia). Envolve eventos vasculares, celulares, bioquímicos com interrupção fisiológica e/ou morfológica dos impulsos nervosos (Li *et al.*, 1996; Delamarter e Coyle, 1999). Esses eventos são neurodegenerativos que promovem lesões secundárias com perda de tecido neuronal e comprometimento da integridade da medula espinhal (Janssens, 1991; Oyibo, 2011). É essencial que o paciente acometido por esta lesão traumática seja atendido de forma

emergencial, clinicamente e/ou cirurgicamente, no intuito de reduzir a extensão da lesão ao tecido neuronal (Bahr Arias, Severo e Tudury, 2007; Gupta *et al.*, 2010).

A lesão secundária é resultante de alterações locais intracelulares e extracelulares que podem se desenvolver alguns minutos a dias após o trauma (Jenssens, 1991; Delamarter e Coyle, 1999; Olby, 2010). Ocorrem anormalidades vasculares com diminuição do fluxo sanguíneo no segmento medular lesado e infarto isquêmico na substância cinzenta central com possibilidade de necrose dentro de 24 horas (Delamarter e Coyle, 1999; Olby, 2010). Na isquemia ocorre o esgotamento de adenosina trifosfato (ATP) e acúmulo de produtos do metabolismo celular com geração de radicais livres, determinando lesão de neurônios e células da glia. Imediatamente após o trauma, há o bloqueio da condução nervosa devido ao efluxo de potássio e influxo de cálcio, pois o dano neuronal devido a lesão ocasiona a liberação de glutamato em níveis tóxicos. O glutamato é responsável por abrir os canais de sódio, cloreto e principalmente o de cálcio (Matute *et al.*, 2011). O aumento de cálcio intracelular causa necrose e apoptose, além de iniciar uma resposta inflamatória decorrente dessas lesões. O processo inflamatório promove dano e morte celular a neurônios e axônios e, conseqüente deterioração funcional com comprometimento medular (Janssens, 1991; Lu, Ashwell e Waite, 2000; Bahr Arias, Severo e Tudury, 2007). Portanto, as lesões secundárias desencadeiam eventos em cascata que culminam na morte celular imediata e progressiva atingindo axônio e as células sobreviventes ao impacto mecânico do trauma, prejudicando a recuperação do tecido medular de forma imediata (Gupta *et al.*, 2010).

Na tentativa de interromper ou reduzir as lesões secundárias, tem-se estudado o uso de substâncias farmacológicas neuroprotetoras com o intuito de melhorar as funções neurológicas nestes pacientes. Os principais neuroprotetores utilizados são os bloqueadores de canais de sódio e cálcio, antioxidantes e inibidores do ácido aracdônico (Bahr Arias, Severo e Tudury, 2007). O estudo com agentes bloqueadores de canais para cálcio demonstram potencial terapêutico nessa afecção por impedir o fluxo exacerbado deste íon, reduzindo a progressão da lesão secundária (Choi, 1992; Bergman, Lanz e Shell, 2000).

A toxina de caramujos marinhos do gênero *Conus* é considerada uma substância com alto potencial terapêutico por apresentar estabilidade, facilidade de síntese e alta seletividade presente nas classes das conotoxinas (μ e ω) pelos canais de sódio e cálcio na membrana plasmática (Shen, Layer e McCabe, 2000; Lewis e Garcia, 2003; Olivera e Teichert, 2007). A ω -conotoxina, em modelo de isquemia cerebral, exerceu efeito neuroprotetor por antagonizar os canais de cálcio dependentes e inibirem a liberação excessiva de neurotransmissores relacionados ao desenvolvimento da lesão secundária (Minami *et al.*, 2001; Rajendra, Armugan e Jeyaseelan, 2004).

Por outro lado, a terapia com células tronco mesenquimais (CTM) tem se destacado pela sua capacidade de autorenovação e diferenciação celular, com função regenerativa. Apresentam algumas vantagens em relação às células tronco embrionárias (CTE), como a facilidade de obtenção, isolamento e expansão (Bydlowski *et al.*, 2009; Amorin *et al.*, 2012). Estudos

envolvendo as CTM em ratos no trauma medular agudo, demonstraram que o uso destas células é considerado uma opção promissora por promover neuroproteção em lesões espinhais (Takeuchi *et al.*, 2007; Osaka *et al.*, 2010; Carvalho, 2011; Silva *et al.*, 2018). Além de promover regeneração, reduzem a apoptose de neurônios e de células da glia e produzem citocinas pró e anti-inflamatórias que podem modular a reação inflamatória pelo trauma espinhal (Deans e Moseley, 2000; Monteiro, Argolo Neto e Del Carlo, 2010; Rosado *et al.*, 2017), diminuindo o dano do tecido nervoso durante a lesão secundária (Ide *et al.*, 2010; Carvalho, 2011).

Portanto, pelas características descritas acredita-se que a ω -conotoxina possa agir sinergicamente associada às CTM quando administradas em associação, exercendo efeitos neuroprotetores potencializados, sendo este o primeiro estudo a avaliar o efeito dessa associação no trauma medular *in vivo*. Assim, espera-se que a ω -conotoxina MVIIC bloqueie os canais de cálcio reduzindo os efeitos deletérios provocados pela lesão secundária do trauma medular, para que as células tronco mesenquimais da medula óssea possam regenerar células e tecidos afetados pelo trauma primário, contribuindo para a melhora da recuperação sensorial e/ou motora dos pacientes afetados.

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da associação da ω -conotoxina MVIIC às CTM da medula óssea no trauma medular agudo em ratos *Wistar*. Sendo os objetivos específicos avaliar a ação da ω -conotoxina MVIIC isoladamente e em associação com às CTM-MO na recuperação da função motora, no estresse oxidativo através da análise de geração de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica e, por fim, seu efeito anti-apoptótico por meio da expressão gênica dos fatores relacionados a apoptose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiopatologia do trauma medular

A lesão medular é originada por um trauma endógeno ou exógeno, resultando em dois mecanismos distintos: lesão primária decorrente do impacto mecânico no momento do trauma e lesão secundária que resulta na alteração vascular, celular e bioquímica do local acometido. No primeiro momento, ao impacto mecânico ocorre hemorragia e morte celular, em que a compressão da medula é classificada em quatro tipos morfológicos: impacto com compressão persistente, somente impacto com compressão transitória, distração medular e laceração ou transecção. A lesão morfológica causa morte celular instantânea e contribui para os danos secundários que acarretam a morte posterior de células que sobrevivem ao trauma. Os eventos biológicos, após a lesão, são divididos didaticamente em três fases, com sequência temporal sobrepostas: aguda (segundos a minutos), secundária (minutos a semanas) e crônica (meses a anos) (Olby, 2010; Oyinbo, 2011).

Porém, a expansão dos danos secundários determina maiores consequências limitando o processo regenerativo, pois lesões discretas provocam menos inflamações e sequelas secundárias quando comparadas às lesões moderadas ou graves (Oyinbo, 2011). O início do processo fisiopatológico da lesão medular está associado a diferentes processos que culminam na necrose e apoptose das células da medula espinhal. Estes mecanismos são interligados com *feedback* positivo, o que agrava a lesão (Kwon *et al.*, 2004).

Na fase aguda, ocorre choque espinal e hipotensão sistêmica, o vasoespasma e a morte celular são resultantes do trauma direto, além de isquemia, edema, desequilíbrio e alterações na homeostase iônica, acumulação de neurotransmissores, excitotoxicidade glutamatérgica, comprometimento da membrana plasmática e sua permeabilidade (Li *et al.*, 1996; Hall e Springer, 2004; Oyinbo, 2011). Com o avanço da injúria, são observados produção de radicais livres, peroxidação lipídica, excesso de óxido nítrico, bloqueio na condução, excesso de noradrenalina, diminuição do ATP, invasão de células imunes e liberação de citocinas, morte celular mediada por inflamação, fatores inibidores do crescimento de neurônios, cromatólise central, desmielinização dos axônios sobreviventes, apoptose, formação de cicatriz glial e formação de siringe na medula espinhal (Lu, Ashwell e Waite, 2000; Rowland *et al.*, 2008; Oyinbo 2011). Por fim, surgem os eventos da fase crônica, alteração dos canais iônicos e seus receptores, processo de regeneração com formação neuronal, alteração de neurocircuitos e seringomielia (Oyinbo, 2011).

2.1.1 Alterações Vasculares

O trauma mecânico rompe a microvasculatura local causando hemorragia petequial e trombose vascular que, em conjunto com os espasmos de vasos sanguíneos íntegros mais o edema local repercute em hipoperfusão e isquemia local profunda (Park, Velumian e Fehlings, 2004; Olby, 2010). Em virtude de os neurônios requererem uma alta demanda metabólica, faz com que a substância cinzenta seja sensível à lesão por isquemia com perda do mecanismo de autorregulação. Após o período de isquemia, a medula espinhal sofre o processo de reperfusão com aumento significativo de radicais livres de oxigênios agravando a lesão secundária (Kwon *et al.*, 2004).

Portanto, torna-se importante o desenvolvimento de estudos que objetivem entender a fisiopatologia dos eventos secundários objetivando reduzir o dano celular após a lesão medular. Pesquisas terapêuticas avançam em prol de combater ou amenizar as consequências dos mecanismos secundários, uma vez que a injúria primária ocorre nas primeiras horas e se perpetua até o momento em que o paciente é encaminhado ao atendimento especializado para que sejam administradas terapias no intuito de diminuir os efeitos deletérios (Gupta *et al.*, 2010; Oyinbo, 2011). Entender os mecanismos secundários da lesão medular é essencial para buscar estratégias terapêuticas que visem a regeneração axonal, neuroproteção com geração de novos neurônios e células da glia que serão responsáveis para promover no local a recuperação e funcionamento do tecido neural sobrevivente (Kwon *et al.*, 2004; Oyinbo, 2011).

2.1.2 Excitotoxicidade e Desequilíbrio Eletrolítico

A excitotoxicidade é o efeito deletério causado nas células decorrente do acúmulo de glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório e presente em maior quantidade no SNC. O glutamato é liberado imediatamente após a lesão medular e acumula-se rapidamente em resposta a isquemia e despolarização da membrana, atingindo níveis tóxicos 15 minutos após a lesão. Esse acúmulo causa danos direto ao tecido, alterando a microcirculação com isquemia secundária e contribuindo para produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) (Kwon *et al.*, 2004; Oyibo, 2011).

O glutamato age nos receptores ionotrópicos (N-metil-D-aspartato (NMDA) e o alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA)) e metabotrópicos, existindo ainda os receptores cainato que através deles passam os íons de cálcio e sódio. Os metabotrópicos atuam acoplados à proteína G mediando diversas funções celulares (Kwon *et al.*, 2004). A ativação de receptores NMDA, AMPA e cainato em oligodendrócitos permite o influxo de sódio e cálcio pela despolarização ativa dos canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD). Em condições fisiológicas normais, as concentrações de cálcio intracelular são extremamente baixas. Porém, o acúmulo de Ca^{2+} intracelular leva a despolarização mitocondrial e aumenta a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, com liberação de fatores pró-apoptóticos (Choi, 1992 e 1995; Sun e Chen, 1998; Lu, Ashwell e Waite, 2000; Matute *et al.*, 2007).

Os astrócitos e os oligodendrócitos são os maiores responsáveis pela captação de glutamato nas áreas sinápticas e não sinápticas, regulando a homeostase do glutamato, prevenindo a excitotoxicidade e a morte celular pela estimulação exacerbada dos receptores ionotrópicos. Ocorrendo falha no controle deste mecanismo, a microglia é ativada, secretando citocinas e gerando as espécies reativas de oxigênio, que prejudicam na captação e transporte do neurotransmissor. Desse modo, as alterações na homeostase do glutamato na substância branca lesionam os neurônios e oligodendrócitos, que são os mais vulneráveis a esse mecanismo de excitotoxicidade, conduzindo na morte neuronal por necrose ou apoptose e desmielinização dessas células (Sánchez e Matute, 1999; Sánchez-Gómez *et al.*, 2003; Káradóttir *et al.*, 2005; Matute *et al.*, 2007).

Em resposta à despolarização mitocondrial, o citocromo c é liberado e interage com os fatores pró-apoptóticos ativando as caspases. Nos oligodendrócitos, os insultos provocados pelos receptores cainatos ativam as caspases 3 e 9, enquanto que os receptores ativados pelo AMPA induzem apoptose pelo recrutamento das caspases 8 e 3, entre outros, ou causam necrose. O influxo de Ca^{2+} mediado somente pelos receptores cainatos ativa a calcineurina e desfosforila a Bad facilitando o processo de apoptose. E por fim, os receptores de NMDA causam morte de oligodendrócitos, sendo sua ativação dependente somente do influxo de cálcio, porém com mecanismos moleculares ainda desconhecidos (Choi, 1995; Sánchez-Gómez *et al.*, 2003; Káradóttir *et al.*, 2006, Matute *et al.*, 2007).

O excesso de sódio danifica os componentes axiais e gliais da substância branca, os receptores NMDA, AMPA e cainato são ativados pelos canais de sódio voltagem dependentes, causando o influxo intracelular de Ca^{2+} . Na microglia a ativação dos receptores AMPA e cainato culminam na liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (Sun e Chen, 1998; Matute *et al.*, 2007). A despolarização maciça e a perda de ATP (adenosina trifosfato) causam o acúmulo tóxico de sódio e, conseqüentemente, entrada de água para dentro do axônio, que culmina no edema citotóxico (Park, Velumian e Fehlings, 2004; Olby, 2010).

As altas concentrações de cálcio intracelular alteram o metabolismo com a ativação de enzimas líticas, como calpaína, fosfolipase A e lipoxigenase (Sun e Chen, 1998; Lu, Ashwell e Waite, 2000; Olby, 2010). A formação de radicais livres e a desregulação na fosforilação oxidativa da mitocôndria resultam em morte apoptótica das células. Assim, visa-se terapias que bloqueiem os receptores de NMDA na tentativa de diminuir esses efeitos deletérios do trauma medular, em outras lesões do SNC e em até distúrbios neurodegenerativos (Kwon *et al.*, 2004).

O bloqueio dos canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) conferiu neuroproteção dos axônios da coluna dorsal da medula espinhal, após a lesão anóxica da medula espinhal no estudo realizado por Imaizumi, Kocsis e Waxman (1999). Neste estudo os fármacos bloqueadores dos canais de cálcio tipo L (verapamil, diltiazem e nifedine) e tipo N (ω -conotoxina GVIA) conferiram proteção contra a perda de condução induzida pela anóxia, quando comparadas ao bloqueio não seletivos desses canais. A neomicina e a ω -conotoxina MVIIC apresentaram também neuroproteção, sugerindo que o influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes L, N e R participam da fisiopatologia da lesão desencadeada pela anóxia da medula espinhal.

2.1.3 Espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica

O estresse oxidativo é causado pelas mudanças do balanço redox em organelas, células e nos tecidos, alterando o fluxo de elétrons e o estado de redução e oxidação nas células. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são partes integrantes do metabolismo e observadas em condições fisiológicas, sendo importante na fagocitose, eliminando qualquer agente potencialmente agressor ao organismo. Ela é controlada pelo sistema antioxidante e o seu desequilíbrio é resultante do predomínio dos oxidantes ao nível celular (Lu, Ashwell e Waite, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2007).

As fontes de espécies reativas podem ser endógenas ou exógenas. A primeira é derivada de mitocôndrias, peroxissomas, lipoxigenases, NADPH oxidase, citocromo P450, citocinas inflamatórias, e a segunda, de raios ultravioleta, radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos (Sun e Chen, 1998). O sistema antioxidante enzimático é composto pela superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (Chain, 2001; Lu, Ashwell e Waite, 2000). O sistema não oxidante é representado pela glutathione (antioxidante intracelular), tocoferóis, ácido ascórbico, ácido úrico e β -caroteno, além dos metais de transição como a transferrina e a ceruloplasmina que devem ser transportados em associação a proteínas para

impedir que reajam com outros compostos e formarem espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 1986; Vasconcelos *et al.*, 2007).

No trauma medular, o ERO e ERN são formados em consequência do aumento do nível de cálcio intracelular, da disfunção mitocondrial, da degradação do ácido aracdônico e da ativação do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Chain, 2001). O excesso de produção desses oxidantes em peroxissomas causam danos às proteínas e aos ácidos nucleicos, lise da membrana celular e perda neuronal. Além disso, os radicais livres danificam o citoesqueleto e organelas, pois absorvem um elétron da molécula lipídica tornando-a instável e promovendo reação em cadeia culminando com a lise da membrana e morte celular. A disfunção mitocondrial promovida pelo processo oxidativo contribui para o excesso de cálcio intracelular, o que determina a ativação de proteases resultantes da quebra de proteínas do citoesqueleto (Sun e Chen, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Os radicais formados pelo ERO são: superóxido altamente reativo ($O_2^{\cdot -}$), hidroxila ($\cdot OH$) e peroxila (RO_2^{\cdot}), e os não radicais peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$). (Bains e Hall, 2011). O radical hidroxila ($\cdot OH$) é o mais reativo e o que causa maior dano no organismo que não dispõe de mecanismo de defesa, é responsável por modificar as bases do DNA e quebrar suas fitas, danificar e inativar proteínas, que culminam na peroxidação lipídica. Os radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) e alcóxila (RO^{\cdot}) são formados na decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica. Além disso, a decomposição do peroxinitrito gera o dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$) e o radical carbonato ($\cdot CO_3$) que são altamente citotóxicos, com danos a proteínas e lipídeos (membranas celulares e mitocondriais) (Halliwell e Gutteridge, 1986; Liu *et al.*, 1998; Sun e Chen, 1998; Bains e Hall, 2012; Hall *et al.*, 2016).

A peroxidação lipídica ocorre quando os radicais de oxigênio reagem com os ácidos graxos poli-insaturados como o ácido aracdônico, ácido linoléico, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoide (DHA) (Hall e Springer, 2004; Bains e Hall, 2012), essa reação propaga em cadeia pela superfície celular. Além de desabilitar as enzimas da “cadeia respiratória” na mitocôndria, alteram o DNA das proteínas e inibem a ATPase de sódio e potássio contribuindo para o colapso metabólico e necrose ou apoptose celular. Este processo é presente durante a hipoperfusão do tecido medular, com níveis superiores de malondialdeído observados no momento da reperfusão (Ferreira e Matsubara, 1997; Vasconcelos *et al.*, 2007).

2.1.4 Inflamação

A inflamação exerce papel primordial na patogênese dos processos neurodegenerativos, no trauma medular inicia imediatamente após o trauma, podendo persistir por semanas ou meses (Donnelly e Popovich, 2008). Sua exacerbação impede a regeneração neuronal, danifica o tecido saudável e ativa a cascata inflamatória que resulta em apoptose de neurônios e oligodendrócitos, com redução da função neuronal (Lu, Ashwell e Waite, 2000; Zhang *et al.*, 2012).

No trauma medular, os neutrófilos são as primeiras células ao chegar no local da lesão e são recrutados via circulação sanguínea, especialmente pelas células endoteliais vasculares, responsáveis pela remoção de bactérias e restos celulares. Estas células liberam citocinas, proteases e radicais livres que por sua vez, ativam outras células inflamatórias e as células da glia (astrócitos e microglia) nas primeiras 24 horas (Donnely e Popovich, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Genzel e Zhang, 2015). Os monócitos migram para o local da injúria após 2 a 3 dias e diferenciam-se em macrófagos que são indistinguíveis da microglia ativada. Secretam citocinas imunossupressoras (IL-10) e quimiocinas que atraem leucócitos anti-inflamatórios, aumentam os receptores fagocíticos e regulam a deposição da matriz celular e fatores de crescimento. O objetivo nesta primeira fase é reparar e remover o tecido danificado, facilitar a remoção dos neutrófilos, “organizar” os astrócitos, plaquetas e células endoteliais por meio da liberação de citocinas anti-inflamatórias (Taoka *et al.*, 1997; Genzel e Zhang, 2015).

As primeiras citocinas formadas após a injúria celular são a IL-1 β e o TNF- α que atuam nos neurônios sensitivos (Han *et al.*, 2015) e promovem a síntese em cascata de outras citocinas, quimiocinas, prostanóides, neurotrofinas, óxido nítrico, cininas, lipídeos, trifosfato de adenosina (ATP) (Donnely e Popovich, 2008). Na medula espinhal, a IL-1 β e o TNF- α aumentam as atividades dos receptores AMPA e NMDA, aumentando a excitabilidade dos neurônios. O TNF- α também reduz a receptação do glutamato que causa excitotoxicidade na substância cinzenta e branca, acarretando em morte neuronal (Lu, Ashwell e Waite, 2000; Park, Velumian e Fehlings, 2004; Zhang *et al.*, 2012).

2.1.5 Morte celular

No TMA, a lesão primária é instantânea ao momento do trauma e irreversível. A morte neuronal ocorre por necrose imediatamente a injúria celular traumática (Li *et al.*, 1996) e células apoptóticas surgem a partir de 6 horas pós-lesão, podendo permanecer durante 3 semanas, com os oligodendrócitos sujeitos a morte celular programada em decorrência dos efeitos deletérios citados anteriormente (Crowe *et al.*, 1997; Olby, 2010).

A apoptose é efetuada pela ativação das enzimas caspases, sendo classificadas como caspases inflamatórias e apoptóticas, e esta última subdivida em caspases iniciadoras e executoras (Chowdhury, Tharakan e Bhat, 2008; Burguillos *et al.*, 2011; Crawford e Wells, 2011; Poreba *et al.*, 2018). A inibição das caspases pode oferecer proteção contra a perda neuronal em casos de doenças cerebrais que envolvem a microglia, acidente vascular cerebral, meningite e no trauma medular (Burguillos *et al.*, 2011).

As caspases inflamatórias medeiam a ativação proteolítica de citocinas inflamatórias e os substratos das caspases apoptóticas que são responsáveis pela destruição celular. Elas atuam na indução, transdução e amplificação dos sinais apoptóticos intracelulares, determinam a regulação da imunidade inata, proliferação e diferenciação celular. Sua regulação é controlada por três mecanismos distintos: IAPs (inibidor de proteínas de apoptose), FLIP (proteína inibidora de FADD-like-ICE) e calpaína (Chowdhury, Tharakan e Bhat, 2008).

Elas atuam por meio da ativação e clivagem de zimogênio por proteases, utilizando um resíduo de cisteína catalizador de nucleófilo e, estas por sua vez clivam seus substratos em locais próximos que tenham resíduos de ácido aspártico em proteínas-alvo (Kuida, 2000; Boatright e Salvesen, 2003; Lamkanfi *et al.*, 2007; Chowdhury, Tharakan e Bhat, 2008). Os zimogênios são as formas precursoras das caspases presentes nas células, encontram-se na forma de monômeros inativos, e a dimerização deles para a conformação ativa não é necessariamente dependente de clivagem. A dimerização ocorre em complexos ativadores multiprotéicos, no qual os zimogênios são recrutados em relação ao N-terminal dominante, sendo o complexo ativador envolvido no processo dependente da via do estímulo letal, classificado como extrínseco ou intrínseco (Thornberry e Lazebnik, 1998; Degterev, Boyce e Yuan, 2003; Lamkanfi *et al.*, 2007; Chowdhury, Tharakan e Bhat, 2008; Crawford e Wells, 2011).

Os terminais N são denominados de domínio de morte (*death domain*) e estão envolvidos na transdução dos sinais apoptóticos. Os domínios de morte são membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), com dois subdomínios: o efetor de morte (DED) e o recrutador de caspases (CARD) (Crawford e Wells, 2011). Estes, por meio de complexos de sinalização que indicam a inflamação ou morte celular, recrutam as caspases iniciadoras ativando-as e iniciando a inflamação ou apoptose (Boldin *et al.*, 1996; Degterev, Boyce e Yuan, 2003; Martinon e Tschopp, 2004; Chowdhury, Tharakan e Bhat, 2008).

As caspases-1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14 desempenham funções na maturação de citocinas e nas respostas inflamatórias, e são designadas como inflamatórias e alocadas no subgrupo I. As caspases 8 e 10 possuem o domínio efetor de morte, e as caspases 2 e 9 contêm o domínio de recrutamento de caspases, consideradas iniciadoras de apoptose e pertencente ao subgrupo II. As caspases 3, 6 e 7 formam o subgrupo III e são chamadas de caspases efetoras ou executoras (Degterev, Boyce e Yuan, 2003; Zhang, Zhang e Herman, 2003; Chowdhury, Tharakan e Bhat, 2008; Poreba *et al.*, 2018).

A sinalização das caspases pode acontecer pela via extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é mediada pelo complexo sinalizador de indutor de morte transmembrana (Fas ou TNF), como complexo ativador de pró-caspases-8 e 10. A via intrínseca é mediada pela mitocôndria, por meio do apoptossomo com o complexo para o pró-caspase-9. São citadas outras vias, como a via da glicina B que é mediada pelo retículo endoplasmático (Degterev, Boyce e Yuan, 2003; Zhang, Zhang e Herman, 2003).

A ativação da caspase-8 é iniciada pelos receptores de morte, como Fas ou TNF, que requerem as caspases 8 ou 10 no complexo receptor (Thornberry e Lazebnik, 1998). Depois do recrutamento e ativação da caspase-8, esta cliva outras caspases, como a 3 e 7 que são responsáveis pela morte celular apoptótica e regulação da ativação ou não da microglia através de uma via dependente da proteína C quinase (Kuida, 2000; Burguillos *et al.*, 2011) (Fig. 1). A interrupção ou inibição química desta via, pode vir a reduzir a neurotoxicidade e demonstrar uma neuroproteção para a microglia (Burguillos *et al.*, 2011).

As caspases 2 e 9 atuam na via intrínseca, que após o acionamento da morte celular, as mitocôndrias tornam-se seletivamente permeabilizadas, liberando citocromo c no citosol e recrutando as pró-caspases-9, no complexo conhecido como apoptossomo. Dentro deste complexo existe a proteína Apaf-1 (fator apoptótico ativador de protease 1) que ativa outras caspases e se junta as caspase-8 e 10, que já estão ativadas. A caspase-2 surge em resposta apoptótica a privação de neutrófilos e quando o DNA é danificado (Kuida, 2000; Boatright e Salvesen, 2003; Zhang, Zhang e Herman, 2003; Crawford e Wells, 2011).

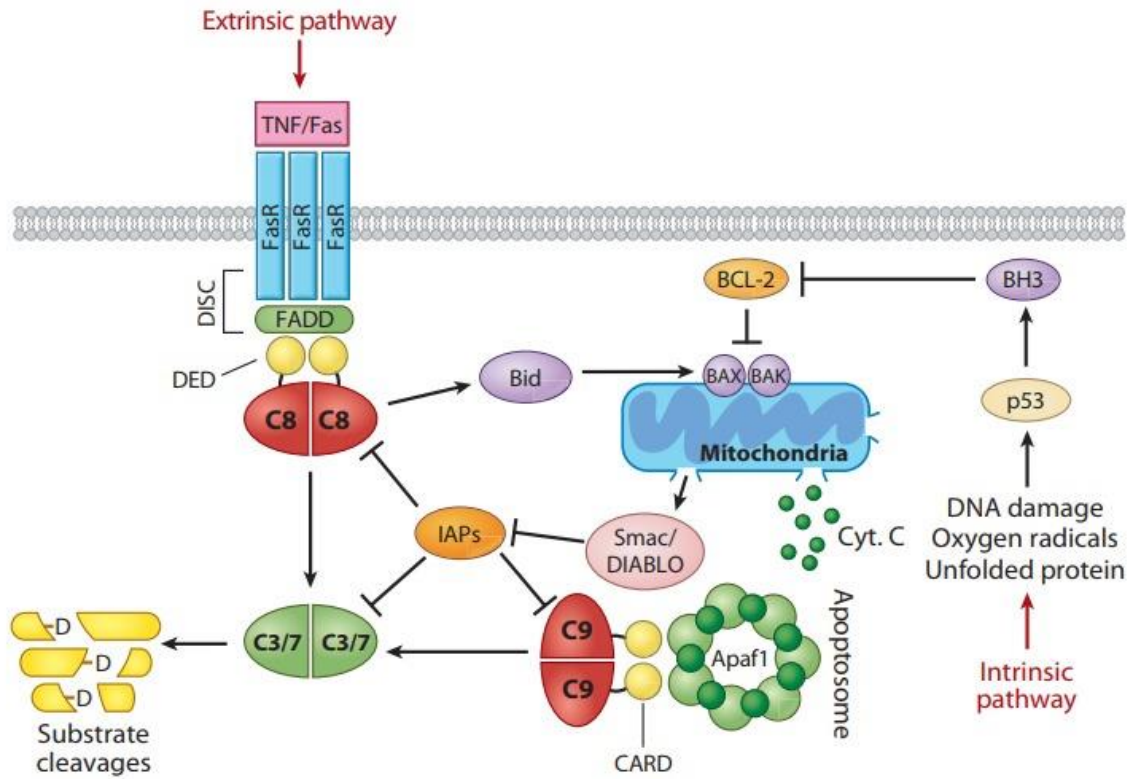


Figura 1. Representação das vias apoptóticas. Em resumo, na via extrínseca, um ligante como o fator de necrose tumoral (TNF) ou Fas se envolve com um receptor de membrana celular e forma o complexo que sinaliza a indução de morte celular (DISC). A caspase-8 (C8) é ativada pelo complexo citado e ativa as caspases 3 e 7 (C3/7), seja diretamente ou pela clivagem do Bid, e a mitocôndria torna-se permeável pelo Bax e Bak. Na via intrínseca, ocasionada pelos danos celulares como proteínas mal enoveladas (*unfolded protein*), radicais livres e lesão do DNA atuam no p53 e outros sensores ativando a proteína BH3, com ação antagonista das proteínas da família Bcl-2 (regulador do sistema mitocondrial), ocorrendo a permeabilização da mitocôndria por Bax e Bak. As duas vias convergem na liberação do citocromo c (Cyt. C) pela mitocôndria, com formação subsequente do apoptossomo, e este ativa a caspase-9 (C9) e, por sua vez, ativa outras caspases efetoras. O Smac/DIABLO é liberado pelas mitocôndrias e são responsáveis por antagonizar os inibidores da caspase (IAPs). Fonte: Crawford e Wells, 2011.

2.2 Terapias relacionadas ao trauma medular

Diversas terapias neuroprotetoras são estudadas com o objetivo de reduzir os danos causados pelo trauma medular em animais, no intuito de transformar os resultados encontrados em ensaios clínicos em humanos (Kwon *et al.*, 2011). As investigações focam no manejo agudo do trauma medular com a intervenção cirúrgica precoce, farmacoterapia (Baptiste e Fehlings, 2007; Gupta *et al.*, 2010), bloqueadores de canais de cálcio (Lu, Ashwell e Waite, 2000), uso de terapia celular (Rowland *et al.*, 2008; Gabel *et al.*, 2017), entre outros. Os bloqueadores de canais de CCVD podem preservar a integridade de axônios após a lesão medular (Lu, Ashwell e Waite, 2000) e as células tronco podem substituir tecidos lesionados (Gupta *et al.*, 2010), ambos com ações neuroprotetoras. É necessária uma ação multidisciplinar que aborde os diferentes mecanismos da lesão secundária, para evitar o máximo possível a morte neuronal e possibilitar a recuperação do tecido medular e a função motora dos pacientes.

2.2.1 Terapia com ω -conotoxina MVIIC

Os caramujos marinhos habitam os recifes de corais tropicais e existem 700 espécies identificadas, todas elas venenosas (Mir *et al.*, 2016). A biologia dos venenos produzidos por estes gastrópodes demonstra que os componentes tóxicos têm características de seletividade peculiar, tamanho pequeno na cadeia peptídica e estabilidade estrutural, que pode ser explorada de forma farmacológica para a criação de novas drogas. Em destaque, o veneno do caramujo *Conus* é rico em conotoxinas e cada espécie apresenta seu veneno com diferentes peptídeos, com especificidade para um alvo receptor em particular, portanto, com perfil farmacológico distinto (Shen, Layer e McCabe, 2000; Lewis e Garcia, 2003; Layer e McIntosh, 2006; Mir *et al.*, 2016).

As conotoxinas são estruturas peptídicas ricas em cisteína, que agem em alvos moleculares específicos, que podem ser canais iônicos voltagem-dependentes ou ionizados. Estas têm como alvos o receptor nicotínico, N-metil-D-aspartato, receptores de serotonina tipo 3 (5-HT₃), canais de cálcio, sódio e potássio, e em poucas circunstâncias ligados a receptores de proteína-G, incluindo os receptores α -adrenérgicos, neurotensina, vasopressina e a norepinefrina (Hamilton e Perez, 1987; Layer e McIntosh, 2006; Mir *et al.*, 2016).

Os conopeptídeos são nomeados de acordo com sua ação farmacológica. São denominados pelo alfabeto grego, seguido de uma ou duas letras e mais um número romano, especificando de qual espécie *Conus* é oriundo e o arranjo de cisteína do peptídeo isolado, respectivamente. Além de uma letra maiúscula que designa a superfamília. Estas toxinas em sua estrutura molecular, apresentam uma ou mais ligações dissulfeto (Mir *et al.*, 2016).

A ω -conotoxina tem como alvo os receptores de membrana de canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes, pertencendo ao grupo GVIA de proteínas peptídicas (Hamilton e Perez, 1987; Sher *et al.*, 1992; Mir *et al.*, 2016). A ω -conotoxina MVIIC bloqueia os canais de cálcio voltagem dependentes do tipo P/Q e preferencialmente o tipo N (Hillyard *et al.*, 1992; Liu *et*

al., 1996; McDonough *et al.*; 1996), enquanto a MVIIA bloqueia somente os canais tipo N. Estes canais regulam a liberação de neurotransmissores nos terminais nervosos pré-sinápticos do sistema nervoso central com diferentes funções (Boot, 1994; Wu e Saggau, 1995; Sasaki *et al.*, 2000).

Oliveira e colaboradores (2014a; 2014b e 2018) avaliaram os efeitos das ω -conotoxinas MVIIC e MVIIA, aplicadas vias intralésional e intratecal, respectivamente, no trauma medular agudo em ratos *Wistar* em diferentes concentrações. Os estudos demonstraram que as toxinas não apresentaram efeitos colaterais e atuaram bloqueando os canais de cálcio, com efeito neuroprotetor, caracterizado pela preservação e redução de morte neuronal, além da observação na recuperação motora dos animais com TMA.

Devido suas características, a ω -conotoxina é considerada um fármaco que age no bloqueio dos CCVD (Hannon e Atchison, 2013), assim pode vir a inibir a liberação de neurotransmissores e reduzir os efeitos deletérios da lesão secundário no TMA, como o excesso de influxo de cálcio e a excitotoxicidade glutamatérgica (Matute *et al.*, 2007), promovendo neuroproteção na lesão medular (Oliveira *et al.*, 2014a e 2014b; Azevedo, 2018).

2.2.2 Terapia com células tronco

As células tronco (CT) são células indiferenciadas que possuem características interessantes com finalidade terapêutica. Elas possuem capacidade de autorrenovação, por meio de divisões mitóticas, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos. Diferenciam-se em diversos tipos celulares tendo função regenerativa em tecidos lesionados (Bydlowski *et al.*, 2009; Amorin *et al.*, 2012). Com essas características a terapia celular apresenta potencial terapêutico e torna a perspectiva da regeneração tecidual uma realidade clínica (Del Carlo, Monteiro e Argolo Neto, 2010).

As CT são classificadas de acordo com seu local de origem em: células tronco embrionárias (CTE), que são células derivadas da massa interna do blastocisto embrionário durante a fase de gastrulação e com alto poder de diferenciação celular; e células tronco adultas (CTA), que podem ser obtidas do cordão umbilical (Amorin *et al.*, 2012), da medula óssea e do tecido adiposo (Alves *et al.*, 2016), da polpa dentária (Ishikawa *et al.*, 2017; Dissanayaka *et al.*, 2011), do epitélio olfatório (Krudewig, Deschl e Wewetzer, 2006; Mazzarella *et al.*; 2016), do tecido adiposo do omento (Bahamondes *et al.*, 2017) e do âmnio (Cardoso *et al.*, 2014).

As CTE são células totipotentes que apresentam grande plasticidade e ilimitada capacidade de proliferação *in vitro*, com possibilidade de formar células derivadas dos três folhetos embrionários: ectoderma, endoderma e mesoderma (Sylvester e Longaker, 2004; Amorin *et al.*, 2012). Podem originar todas as células somáticas e células da linha germinativa (Sylvester e Longaker, 2004). Embora as CTE possuam maior potencial de diferenciação, existem limitações ao seu uso devido ao comportamento biológico ainda não totalmente esclarecido (Pinto Filho *et al.*, 2013).

As CTA são células indiferenciadas mantidas no organismo adulto, atuando na homeostase tecidual, produzindo novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma injúria. As células hematopoiéticas provenientes da medula óssea foram as primeiras CTA estudadas, capazes de se diferenciar em células mielóides e linfóides do sangue. São utilizadas com sucesso terapêutico em transplantes para pacientes com falência medular ou câncer (Amorin *et al.*, 2012).

2.2.3 Células Tronco Mesenquimais (CTM)

As células tronco mesenquimais (CTM) são uma população heterogênea de células que, sob condições adequadas de cultivo, são aderentes ao plástico e exibem morfologia semelhante ao fibroblasto (Dominici *et al.*, 2006; Bydlowski *et al.*, 2009; Monteiro, Argolo Neto e Del Carlo, 2010). São capazes de se dividir e diferenciar em vários fenótipos mesenquimatosos, como osteoblastos, condrócitos, miócitos, células estromais da medula, fibroblastos de tendão e ligamentos, e adipócitos (Caplan e Dennis, 2006).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (*ISCT – Internacional Society for Cellular Therapy*) define que, para serem classificadas dessa forma, as células tronco mesenquimais de pluripotência devem atender os seguintes critérios: aderência plástica, expressão do antígeno na superfície específica e potencial de diferenciação de multipotência. Além disso, as CTMs devem expressar em 95% os fenótipos CD105, CD 73 e CD90 detectados por meio de citometria de fluxo e não devem expressar os fenótipos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR classe II na superfície de moléculas. Devem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições padrões de diferenciação *in vitro*, no qual são demonstrados por meio de coloração de cultura destas células. Os osteoblastos podem ser demonstrados pela coloração de Alizarin Red ou Von Kossa, os adipócitos pela coloração Oil Red O e os condroblastos por Alcian Blue ou pela coloração de imunohistoquímica para colágeno tipo II (Dominici *et al.*, 2006).

É a linhagem mais estudada por apresentar maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis (Del Carlo, Monteiro e Argolo Neto, 2010). Ensaios clínicos com a administração de CTM para o tratamento de várias doenças têm mostrado viabilidade e segurança nas terapias, incentivando que haja mais pesquisas para determinar o seu uso como um tratamento genético estabelecido (Ikebi e Suzuki, 2014).

As CTM possuem capacidade imunomoduladora e imunossupressora, secretam várias citocinas e fatores de crescimento com atividades parácrinas e autócrinas. Estes fatores suprimem o sistema imunológico local, inibem a fibrose e a apoptose, aumentam a angiogênese, estimulam a mitose e diferenciam-se em outras células para regeneração celular ou em células tronco para reparação tecidual (Morrison, Shah e Anderson, 1997; Caplan e Dennis, 2006).

A medula óssea é um dos principais sítios de obtenção das CTM (Monteiro, Argolo Neto e Del Carlo, 2010), pela facilidade de isolamento e à capacidade de expansão *in vitro*. Estas células podem ser transplantadas no próprio indivíduo doador sem riscos de rejeição (Thuret, Moon e Gage, 2006; Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008). Para aplicações terapêuticas podem ser utilizadas desde a fração celular mononuclear da medula óssea que contém pequenas quantidades de CTM, até as células provenientes de culturas expandidas em laboratório (Monteiro, Argolo Neto e Del Carlo, 2010).

O método mais comum para isolar as CTM é por meio do gradiente de densidade para obtenção de células mononucleares que são isoladas e cultivadas em um meio com soro fetal. Pela propriedade de adesão ao plástico, as CTM permanecem na cultura após sucessivas trocas do meio. Este procedimento elimina a maior parte das células contaminantes e, com a progressão das diversas passagens, ocorre a diminuição da heterogeneidade remanescente da cultura, permanecendo apenas a fração que se autorrenova, que são as CTM (Bydlowski *et al.*, 2009).

Existem muitos estudos com as células tronco como terapia na lesão medular, na tentativa que estas células promovam a regeneração celular e minimizem os efeitos secundários do trauma. Neste contexto, as CTM conferem proteção à substância branca da medula espinhal evitando progressão da degeneração, diferenciando-se em células da glia. Elas são capazes de migrar para o local da lesão quando aplicados de forma intravenosa e promover neuroproteção por meio da secreção de fatores anti-inflamatórios, vasculares, VEGF e BDNF (Han *et al.*, 2014),

Elas podem modular o ambiente que sofreu a injúria celular por meio de seus efeitos parácrinos. Huang e colaboradores (2017) investigaram a administração de exossomos gerados a partir das CTM observando a atenuação da lesão medular, diminuição da inflamação e apoptose. Os níveis de Bax e das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) reduziram de forma significativa e promoveram a angiogênese do tecido medular lesionado. Han *et al.* (2014) observaram que as CTM-MO em ratos, foram efetivas na redução de IL-1 β e TNF- α no tecido medular, diminuindo a reação inflamatória produzida no local, comprovada pela diminuição da sinalização celular mediada pelo receptor *Toll-like 4* nas vias metabólicas.

As CTM demonstraram neuroproteção em ratos submetidos ao trauma medular agudo, constatado pelo aumento da expressão dos fatores tróficos BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (Caldeira, 2011; Torres, 2014; Rosado *et al.*, 2017 Silva *et al.*, 2018), melhora na recuperação motora (Torres *et al.*, 2018), e o aumento de neurônios íntegros e astrócitos ativados na medula espinhal (Carvalho, 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob protocolo nº 369/2017 (Anexo), seguindo os princípios éticos de experimentação animal. Para a execução deste trabalho, utilizou-se as dependências físicas e a infraestrutura do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV), do Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal (NCT-TCA) ambos da Escola de Veterinária da UFMG, e do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (IEP-SCBH).

3.1 Extração, cultivo e caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais

A extração e o cultivo das células tronco mesenquimais da medula óssea foram realizadas conforme o protocolo adotado no Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal da UFMG (Ocarino *et al.*, 2008; Boeloni *et al.*, 2009). Seis *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, trinta dias de idade, com 100 gramas de massa corporal, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram utilizados para a coleta da medula óssea e obtenção das CTM-MO. Os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico¹ (100 mg/kg) e lidocaína² (10 mg/kg), via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a tricotomia da região posterior do animal e coleta de sangue, via punção cardíaca, com o objetivo de diminuir a contaminação durante a coleta dos ossos. Após a eutanásia, os animais foram imersos em dois frascos contendo álcool 70%, durante um minuto em cada frasco. Logo após, realizou-se antissepsia de toda a região depilada com iodopovidona³. Os ossos dos membros posteriores (fêmures e tíbias) foram coletados cirurgicamente em capela de fluxo laminar com instrumental cirúrgico estéril e colocado em tubo Falcon de 50 ml estéril contendo meio de cultura DMEM⁴ (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), e transportados para a sala de cultura celular. Em uma capela de fluxo laminar, as epífises proximais e distais ósseas foram removidas e o canal medular foi lavado empregando-se seringa estéril de 3 ml acoplada a agulha de insulina. Todo o conteúdo foi coletado em tubo Falcon de 50 ml com DMEM⁵ enriquecido com gentamicina (60 µg/ml), penicilina (10.000 un/ml), estreptomicina (1000 µg/ml) e anfotericina (25 µg/ml). O lavado resultante dos canais medulares foi centrifugado a 1.400 rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 20 ml de DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino⁶ (SFB). As células foram cultivadas em garrafas T75⁷cm² com 10 ml de DMEM⁵ e SFB⁶, mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

¹ Thiopentax® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil.

² Xylestein® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil.

³ Riodeine® - Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴ Gibco® - Invitrogen, Life Technologies, NY, USA.

⁵ Gibco® - Invitrogen, Life Technologies, NY, USA.

⁶ Gibco® - Invitrogen, Grand Island, NY, USA.

⁷ TPP® - Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland.

Após 24 horas, o meio de cultura foi lavado com solução de PSB (tampão fosfato salino) para remoção das células tronco que não aderiram, e o meio de cultivo foi trocado três vezes por semana até atingir a confluência de 80 a 90% das células. Ao atingir essa confluência, era realizada a tripsinização⁸ e o repique do cultivo celular.

As CTM foram caracterizadas fenotipicamente pela expressão do antígeno de superfície celular (CD – *cluster of differentiation*) em citômetro de fluxo. Para o procedimento, as células aderentes foram tripsinizadas, centrifugadas por 5 minutos a 1200 x g e diluídas, em seguida distribuídas em cada poço da placa de 96 poços contendo 1×10^6 , sendo um poço para o controle sem marcação e dois para cada anticorpo. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais primários⁹: anti-CD 45 (clone 69 mouse), anti-CD 54 (clone 1A29 mouse), anti-CD 73 (clone 5F/B9 mouse) e anti-CD 90 (clone OX-7 mouse). Os anticorpos foram incubados por 30 minutos a 4°C e, posteriormente lavados com PBS. As células foram incubadas novamente com os anticorpos secundários¹⁰, durante 30 minutos a 4°C. Empregou-se o citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*)¹¹ para a leitura e análise dos dados, com o auxílio do Software BD *CellQuest*¹² Pro software.

3.2 Obtenção da ω -conotoxina MVIIC

A ω -conotoxina MVIIC¹³ foi fornecida pelo professor Marcus Vinícius Gomes, da Faculdade de Medicina da UFMG com apresentação comercial liofilizada de 100 μ g. A conotoxina foi suspensa em solução de PBS estéril e o volume aliquoteado em tubos de plásticos siliconizados na concentração de 20 pmol/ μ l, armazenado em freezer a -20°C até o momento da aplicação.

3.3 Animais

Foram utilizados trinta ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, três meses de idade e com peso médio de 350 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos no Centro Experimental de Pequenos Animais da EV-UFMG e acondicionados em caixas plásticas de dimensões de 17cm x 41cm x 33cm forradas com maravalha, com três ratos cada. O período de adaptação e aclimatação ao local durou quatorze dias, em ambiente submetido a ciclos de claro-escuro de 12 horas e com temperatura controlada de 22°C. Foram mantidos com ração comercial para roedores¹⁴ e água *ad libitum* e foi realizado o protocolo de desverminação com tiabendazol¹⁵ (100 mg/kg) por via oral.

⁸ Trypsin 0,05% EDTA GIBCO® - Invitrogen, Grand Island, NY, USA.

⁹ BD Biosciences - San Jose, CA, USA.

¹⁰ Alexa Flúor 488 Molecular Probes® - Invitrogen, Oregon, USA.

¹¹ FACScan™ - Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA.

¹² The Cell Quest™ Software - Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA.

¹³ Conotoxin MVIIC (ω -)® - Latoxan, Valence, France.

¹⁴ Presence – Paulínia, SP, Brasil.

¹⁵ Thiaben® - UCI-FARMA Indústria Farmacêutica, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

3.4 Grupos Experimentais

Os trinta animais, após o período de adaptação, foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com seis animais em cada: controle negativo (CN), controle positivo (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), CTM da medula óssea (CTM-MO) e ω -conotoxina MVIIC associada às CTM-MO (MVIIC + CTM-MO).

Grupo 1: Controle Negativo (CN) – os animais foram submetidos à laminectomia na vértebra T12 e a medula espinhal manteve-se exposta durante 5 minutos.

Grupo 2: Controle Positivo (CP) – os animais foram submetidos à laminectomia na vértebra T12, seguido de trauma medular contusivo, empregando o dispositivo de trauma MASCIS *Impactor* e receberam 10 μ l de PBS estéril, por via intratecal, 1 hora após o trauma.

Grupo 3: ω -conotoxina MVIIC 20 pmol (MVIIC) – os animais foram submetidos à laminectomia na vértebra T12, seguido de trauma medular contusivo, empregando o dispositivo de trauma MASCIS *Impactor* e receberam 20 pmol da conotoxina diluída em 10 μ l de PBS estéril, por via intratecal, 1 hora após o trauma.

Grupo 4: CTM da medula óssea (CTM-MO) – os animais foram submetidos à laminectomia na vértebra T12, seguido de trauma medular contusivo, empregando o dispositivo de trauma MASCIS *Impactor* e receberam 24 horas após o trauma, 0,2 ml de solução PBS estéril contendo 1×10^6 de CTM suspensas, via intravenosa.

Grupo 5: ω -conotoxina MVIIC 20 pmol associada às CTM da medula óssea (MVIIC + CTM-MO) – os animais foram submetidos à laminectomia na vértebra T12, seguido de trauma medular contusivo, empregando o dispositivo de trauma MASCIS *Impactor* e receberam 20 pmol da conotoxina diluída em 10 μ l de PBS estéril, por via intratecal, 1 hora após o trauma. Após 24 horas aplicou-se 0,2 ml de solução PBS estéril contendo 1×10^6 de CTMs suspensas, via intravenosa.

3.5 Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais receberam antibioticoprofilaxia com cefalotina sódica¹⁶, na dose de 60 mg/kg/IM e para analgesia, sulfato de morfina¹⁷, na dose de 5 mg/kg/IM, 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. A indução anestésica foi realizada em câmara com isofluorano¹⁸ e manutenção do plano anestésico cirúrgico com o mesmo agente em máscara facial em sistema de não-reinalação. Após a tricotomia, os ratos foram posicionados em decúbito esternal sobre a mesa do dispositivo de trauma MASCIS *Impactor*. Em seguida, a antisepsia da região dorsal do tronco foi realizada com solução aquosa de digliconato de clorexidina 2%¹⁹ e solução alcoólica de digliconato de clorexidina 0,5%²⁰.

O procedimento cirúrgico iniciou com incisão de pele e de tecido subcutâneo na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica à primeira vértebra lombar, com divulsão lateral dos músculos epiaxiais de T8 a L1. Os processos espinhosos de T10, T11 e T12 foram individualizados e a osteotomia do processo espinhoso T12 realizada com pinça hemostática de Kocher. A laminectomia dorsal do segmento vertebral T12 foi realizada empregando-se o *drill* pneumático neurológico²¹ (Fig. 2A) e auxílio de uma pinça hemostática de Halsted, sob irrigação intermitente com solução de NaCl 0,9%²².

Após a exposição da medula (Fig. 2B), realizou-se o trauma medular pelo sistema de estabilização vertebral do aparelho estereotáxico MASCIS *Impactor* (Fig. 2C), obedecendo o protocolo internacional utilizado no *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*. O trauma contusivo agudo foi gerado pela queda da haste de impacto de 10 g a uma altura de 25 mm durante cinco segundos. O dispositivo foi conectado ao *Software Impactor 7.0* no computador, para acompanhamento das curvas de trajetória do impacto, com o objetivo de apontar possíveis erros de velocidade, tempo e altura de queda conforme Santos *et al.* (2011). Os músculos foram aproximados com padrão de sutura Reverdin e redução do espaço morto com sutura simples contínua e dermorrafia com ponto simples separados, todos utilizando o fio inabsorvível sintético nylon 2-0²³.

Os animais foram mantidos aquecidos durante o procedimento cirúrgico e no pós-operatório imediato com bolsa térmica aquecida. Após o término da cirurgia, receberam solução de NaCl 0,9% na taxa de manutenção de 15 ml/kg/SC e oxigenoterapia até a completa recuperação anestésica. A analgesia foi realizada com sulfato de morfina na dose de 5 mg/kg/SC a cada oito horas durante três dias e massagem vesical duas vezes ao dia para o esvaziamento da bexiga até o dia da eutanásia.

¹⁶ Keflin® - ABL, Antibióticos do Brasil Ltda., Cosmópolis, SP, Brasil.

¹⁷ Dimorf® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil.

¹⁸ Isoforine® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil.

¹⁹ Riohex® 2% Solução com tensoativos - Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil.

²⁰ Riohex® 0,5% Solução alcoólica - Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil.

²¹ ECCOS® Aesculap - Laboratório B. Braun S.A., São Gonçalo, RJ, Brasil.

²² Cloreto de sódio 0,9% - Laboratório Sanobiol Ltda., Pouso Alegre, MG, Brasil.

²³ Procure® Fio agulhado de nylon - Lamidid, Osasco, SP, Brasil.

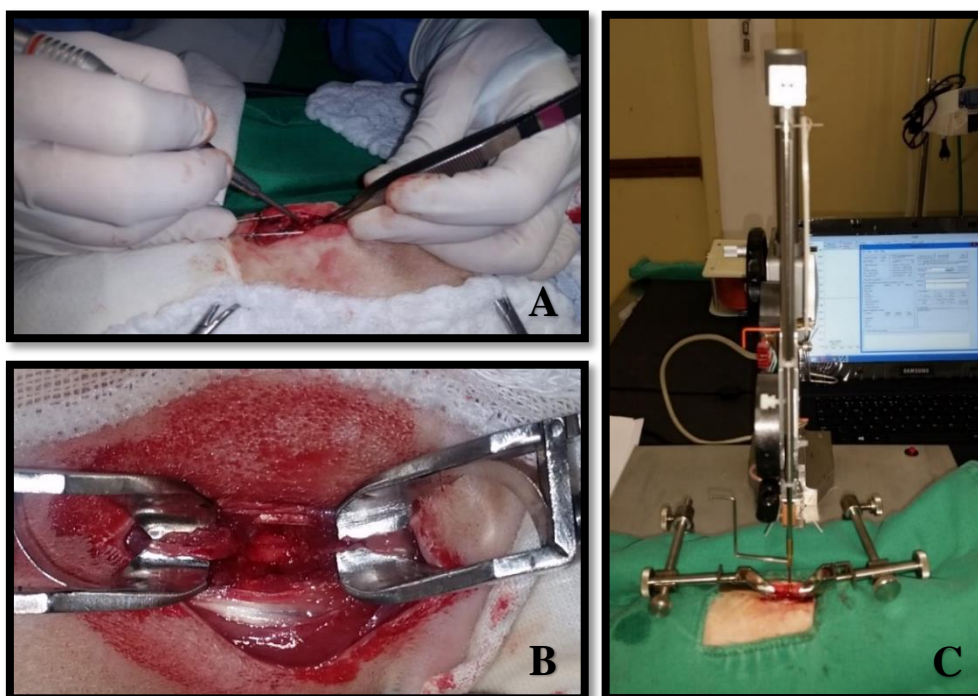


Figura 2. Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos *Wistar*. A) Remoção da lâmina dorsal da vértebra T12 com o *drill* pneumático neurológico. B) Medula espinhal exposta com hemorragia após a laminectomia. C) Aparelho MASCIS *Impactor* utilizado para induzir o trauma contusivo agudo na medula espinhal.

3.6. Viabilidade celular, obtenção e administração das células tronco mesenquimais

As CTM-MO foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripán, sendo ressuspensas com tripsina e DMEM⁴ acrescido de 10% de soro fetal bovino⁶, centrifugadas e o *pellet* suspenso em 2 ml de DMEM⁴. Retirou-se 2µl dessa suspensão e adicionou-se a 49 µl de PBS 0,15M e 49 µl de azul de Tripán, determinando a viabilidade celular e o número total de células. Utilizando este valor foi determinado o volume de tampão fosfato salino estéril a ser adicionado no *pellet* de células para a concentração final de 6×10^6 células/ml utilizada para o transplante celular. As células foram centrifugadas e ressuspensas três vezes com PBS com a finalidade de retirar todo o SFB, evitando possível risco de rejeição. Na última lavagem, as CTM-MO foram ressuspensas com o volume necessário para se obter 1×10^6 CTM em 0,2 ml de PBS.

A injeção de células tronco mesenquimais nos grupos CTM-MO e CTM-MO + MVIIC ocorreu 24 horas após o procedimento de indução do trauma medular, com uma única aplicação na veia caudal. Todos os animais foram induzidos na câmara anestésica com isofluorano¹⁸ para contensão física, no entanto, sem atingir plano anestésico cirúrgico e realizado compressão da veia caudal e injeção de 1×10^6 de CTM. Os grupos CP e MVIIC receberam o mesmo volume de 0,2 ml de PBS.

3.7 Aplicação intratecal da ω -conotoxina MVIIC

A conotoxina foi empregada na concentração de 20 pmol diluído em PBS estéril em volume total de 10 μ l, com administração intratecal (Mestre *et al.*, 1994) da MVIIC no espaço subaracnóideo entre a quinta e sexta vértebras lombares, utilizando uma seringa de Hamilton 701LT²⁴ acoplada a agulha 26 G²⁵. Nos grupos MVIIC e CTM-MO + MVIIC, a aplicação da conotoxina foi realizada 1 hora após o trauma medular, e os grupos CP e CTM-MO receberam somente 10 μ l de PBS estéril 1 hora após o trauma. Todos os animais foram induzidos a anestesia geral com isoflurano¹⁸ para contenção e para evitar possível trauma espinhal decorrente da aplicação.

3.8 Avaliação da função locomotora

Os animais foram avaliados 24 horas antes do procedimento cirúrgico e diariamente até o 7º dia após o TMA e antecedendo o momento da eutanásia. Esta avaliação foi realizada posicionando cada animal em uma superfície plana em campo aberto em uma área de 1 m² e filmado durante dois minutos. Os vídeos foram analisados por dois avaliadores sem conhecimento da identificação dos animais e seus respectivos grupos. Foi realizada a classificação dos níveis de recuperação locomotora dos membros pélvicos após a lesão na medula espinhal torácica de ratos *Wistar*, de acordo com a escala de avaliação locomotora proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996). Foram atribuídos escores de 0-21, sendo o zero caracterizado por nenhum movimento dos membros pélvicos e o escore 21 que apresenta todas as funções locomotoras preservadas (Quad. 1).

3.9 Eutanásia e coleta de medula espinhal

Os animais foram eutanasiados sete dias após a indução do trauma medular, com sobredose de tiopental sódio¹ (100 mg/kg) e lidocaína² (10 mg/kg) via intraperitoneal. A coluna vertebral foi dissecada para coleta de segmentos medulares de 1,0 cm craniais e caudais ao epicentro da lesão. Os segmentos medulares craniais foram acondicionados em tubos plásticos siliconizados e congelados a -20°C para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. Os caudais foram acondicionados em tubos plásticos siliconizados livre de RNase/DNAase e imediatamente congelados a -80°C para análise de expressão gênica dos fatores relacionados a apoptose.

²⁴ 10 microL Model 701 LT SYR – Hamilton® Company, Reno, NV, USA.

²⁵ Agulha descartável 26G – BD Biosciences Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

Quadro 1. Escore de avaliação da função locomotora em ratos proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996) após o trauma medular torácico agudo.

Escore	Descrição das características avaliadas
0	Nenhum movimento observável dos membros pélvicos (MP).
1	Movimento discreto de uma ou duas articulações (coxofemoral ou femorotibiopatelar).
2	Movimento extenso de uma articulação e ou movimento extenso de uma articulação e discreto da outra articulação.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto das três articulações do MP.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira.
7	Movimento extenso de todas as três articulações do MP.
8	Movimento discreto sem suporte de peso ou apoio plantar sem suporte de peso.
9	Apoio plantar com suporte de peso apenas quando parado ou apoio de peso de forma ocasional, frequente ou consistente na passada dorsal e ausência de passada plantar.
10	Suporte de peso ocasional na passada plantar, sem coordenação entre os membros torácicos (MT) e membros pélvicos (MP).
11	Suporte de peso frequente a consistente na passada plantar e sem coordenação entre os MT e MP.
12	Suporte de peso frequente a consistente na passada plantar e coordenação ocasional entre os MT e MP.
13	Suporte de peso frequente a consistente na passada plantar e coordenação frequente entre os MT e MP.
14	Suporte de peso na passada plantar e coordenação entre os MT e MP consistentes, com rotação interna ou externa da pata no contato inicial com a superfície de apoio e antes de liberação final dos dígitos. Ou passada plantar frequente, coordenação consistentes dos MT e MP e passos dorsais ocasionais.
15	Passo plantar e coordenação entre os membros consistentes, e os dígitos permanecem encostados entre si durante o percurso de avanço dos membros. A posição da pata é predominante paralela ao corpo no contato inicial.
16	Passo plantar e coordenação entre os membros consistentes e os dígitos permanecem encostados ocasionalmente durante o avanço da marcha. A posição da pata é predominante paralela ao corpo no contato inicial e rotacionada ao final do movimento.
17	Passo plantar e coordenação entre os membros consistentes durante o avanço da marcha, com os dígitos permanecem encostados ocasionalmente na superfície de apoio. A posição da pata é predominante paralela no contato inicial e ao final do movimento.
18	Passo plantar e coordenação entre os membros consistentes, com os dígitos elevados consistentemente durante o avanço da marcha. A posição da pata é predominante paralela no contato inicial e rotacionada ao final do movimento.
19	Passo plantar e coordenação entre os membros consistentes durante a marcha, com os dígitos elevados consistentemente. A posição da pata é predominante paralela no contato inicial e ao final do movimento, e a cauda permanece abaixada em parte ou na totalidade do tempo de avaliação.
20	Passo plantar e marcha coordenada consistentes, a posição da pata é predominante paralela no contato inicial e quando o animal avança, porém com instabilidade de tronco e a cauda consistentemente elevada.
21	Passo plantar e marcha coordenada consistentes, a posição da pata é predominante paralela no contato inicial e quando o animal avança, com estabilidade de tronco e a cauda consistentemente elevada.

3.10 Quantificação das espécies reativas de oxigênio

No estresse oxidativo há o desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) e os antioxidantes, com oxidação de biomoléculas (Sun e Chen, 1998). É possível quantificar os níveis de ERO presente no tecido medular por meio do ensaio com DCHF-DA (*2',7'-dichloroflorescein diacetate*) em conjunto com espectrofluorimetria (LeBel, Ischiropoulos e Bondy, 1992). O DCHF-DA é uma sonda sensível e permeável às células, e por ser um composto lipofílico e não fluorescente, é incorporado às células pelo processo de difusão passiva na membrana plasmática. Posteriormente, é desacetilado pelas enzimas esterases ao nível celular produzindo o composto oxidante não fluorescente DHCF e que está preso no interior das células. Na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em combinação com peroxidases e outros catalisadores de proteínas do grupo heme, o DCHF é oxidado a níveis altamente fluorescentes, gerando o DCF que é o produto final da desacetilação. O DCF é altamente fluorescente com espectro de emissão a 523 nm. Ele é facilmente medido e é a base do ensaio intracelular para detecção dos níveis de ERO, e a intensidade da fluorescência é proporcional aos níveis presentes no citosol celular (Loetchutinat *et al*, 2005; Bonini *et al*, 2006).

A determinação dos níveis das espécies reativas de oxigênio foi baseada na metodologia descrita por Loetchutinat *et al.* (2005) com adaptações. Nas amostras dos segmentos medulares coletadas cranial ao epicentro da lesão, foram adicionadas 750 µl de solução tampão TRIS-HCL. A solução resultante de cada amostra foi homogeneizada em sonicador por 2 minutos e centrifugada a 2.500 rpm a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico siliconizado para a análise da peroxidação lipídica. Em uma cubeta de acrílico adicionou-se 2 ml de solução de PBS e 5µl da amostra para a realização da leitura de fluorescência (502/523 nm) em aparelho espectrofluorímetro *Shimadzu RF-5301*²⁶. Após a estabilização da linha de base em 30 segundos, ocorreu a adição de 2 µl à 40 nM de DCHF-DA para quantificação de ERO. A taxa de aquisição foi de uma leitura por segundo em temperatura controlada à 37°C, em um tempo de 380 segundos de leitura.

3.11 Avaliação da peroxidação lipídica

O ensaio da peroxidação lipídica foi realizada de acordo a metodologia descrita por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), determinando o conteúdo de malondialdeído (MDA) presente no sobrenadante do homogenato, por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico (TBA) em altas temperaturas, produzindo um complexo de coloração rósea que é quantificado no espectrofotômetro.

Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante obtido anteriormente, foi incubado com 500 µl de solução tampão de ácido acético em pH 3,4, 200 µl de solução de dodecil sulfato de sódio 8,1%, 100 µl de água e 500 µl de ácido tiobarbitúrico 0,8%, durante 90 minutos à 95°C. A leitura espectrofotométrica do conteúdo de MDA foi realizada no comprimento de onda de 532 nm no espectrofotômetro *UVmini – 1240*²⁷ após o resfriamento das amostras.

3.12 Avaliação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR)

O RT-qPCR quantifica os níveis de expressão gênica ao medir a quantidade de RNA celular, por meio da conversão do RNA em DNA complementar (cDNA) por meio da transcriptase reversa (Nolan, Hands e Bustin, 2006). Este método mede a fluorescência da amostra biológica durante a ciclagem térmica e neste caso combinado com o corante de ligação de DNA de cadeia dupla *SYBR[®] Green*. A técnica permite que a amplificação, detecção e quantificação do DNA sejam produzidas em uma única etapa, proporcionando agilidade na obtenção de resultados e a diminuição nos riscos de ocorrer contaminação das amostras (Pryor e Wittwer, 2006).

Nesta reação é determinado o valor de C_q (Ciclo quantitativo) que representa o número de ciclos necessários para que a fluorescência atinja o seu limiar de detecção, e com este valor é realizado a quantificação absoluta e relativa dos ácidos nucleicos. Neste trabalho, realizou-se a quantificação relativa que se baseia na comparação de um gene alvo em relação ao gene de referência (“*housekeeping*”). O método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para análise de dados (Livak e Schmittgen, 2001).

Avaliou-se a expressão gênica relativa dos genes Bax²⁸, caspase-3²⁹, caspase-8³⁰ e caspase-9³¹ por meio da técnica de RT-qPCR. Analisou-se o material coletado do segmento medular 1,0 cm caudal adjacente ao epicentro da lesão. Utilizou-se os *primers* das proteínas relacionadas à apoptose Bax, caspase-3, caspase-8, caspase-9 que são pró-apoptóticas e a proteína constitutiva beta-actina³² como o gene normalizador (“*housekeeping gene*”) (Quad. 2).

Quadro 2. Genes e sequência de nucleotídeos dos *primers* iniciadores para RT-qPCR.

Gene	Sequência de Nucleotídeos Iniciadores (5'a 3')
Bax	F: CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC R: AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA
Caspase-3	F: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA R: CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT
Caspase-8	F: TAAGACCTTTAAGGAGCTTCATTTTGA R: AGGATACTAGAACCTCATGGATTTGAC
Caspase-9	F: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA R: CCACAGCTCCGCGACTTGCA
Beta-actina	F: GCGTCCACCCGCGAGTACAA R: ACATGCCGGAGCCGTTGTCG

Fonte: Fukushima, 2012.

²⁶ Shimadzu Corporation – Kyoto, Japan.

²⁷ Shimadzu Corporation – Kyoto, Japan.

²⁸ Primer Bax F e Primer Bax R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

²⁹ Primer Cas-3 F e Primer Cas-3 R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

³⁰ Primer Cas-8 F e Primer Cas-8 R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

³¹ Primer Cas-9 F e Primer Cas-9 R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

³² Primer Beta-act. F e Primer Beta-act. R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

- Extração do RNA

As amostras foram retiradas do freezer -80°C e mantidas em gelo para permitir o descongelamento gradativo. Iniciou-se a extração do RNA com a adição de $750\ \mu\text{l}$ do reagente Trizol³³ em cada amostra (relação 3:1) e homogeneização no aparelho *Tissue Lyser II*³⁴ na frequência de 30 Hz, durante 2 minutos. As soluções homogeneizadas foram incubadas à temperatura ambiente e, após 5 minutos foram adicionados $0,2\ \text{ml}$ de clorofórmio PA livre de RNAses e incubadas novamente a temperatura ambiente por 15 minutos. Ao término desse período, as amostras foram centrifugadas a $12.000\ \times\ \text{g}$ durante 15 minutos a 4°C para separação de três fases distintas: inferior rosada (proteínas), intermediária branca (DNA) e superior aquosa (RNA). A fase aquosa encontrada na parte superior foi pipetada e transferida para um novo microtubo estéril livre de RNase e adicionado $0,5\ \text{ml}$ de álcool isopropílico 100% absoluto livre de RNase e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, com o objetivo de precipitar o RNA. Procedeu-se a centrifugação da solução a $12.000\ \times\ \text{g}$ por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo, cuidadosamente a fim de não perder o precipitado obtido. O precipitado foi lavado com $1\ \text{ml}$ de etanol a 75% e homogeneizado durante 15 segundos e centrifugado a $7.500\ \times\ \text{g}$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado, deixando as amostras secarem em temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. O precipitado de RNA foi ressuspensionado em $75\ \mu\text{l}$ de água livre de RNase e homogeneizado por repetidas pipetagens, e foi retirado $0,5\ \mu\text{l}$ para quantificação de RNA no espectrofotômetro *NanoVue™ plus*³⁵ e as amostras congeladas a -80°C para síntese do DNA complementar (cDNA). A concentração final de RNA foi determinada em $\text{ng}/\mu\text{l}$ e as absorbâncias das amostras foram obtidas em 230, 260 e 280 nm, assim o equipamento avaliou as razões A260/230 e A260/280, RNA/fenólicos e RNA/proteínas, respectivamente. Foram considerados os valores entre 1,7 a 2,0, para ambas as razões.

As reações de PCR foram realizadas com o kit *QuantiFast SYBR® Green RT-qPCR*³⁶ de acordo com as recomendações do fabricante, no aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System*³⁷ e com o auxílio da plataforma *ABI Prism® 7900HT*³⁷. As amostras foram preparadas individualmente com uma solução “mix” contendo $12,5\ \mu\text{l}$ de *SYBR® Green* e $1\ \mu\text{l}$ de Rox presentes no kit, $7,5\ \mu\text{l}$ de água ultrapura, $1\ \mu\text{l}$ do primer iniciador *forward* e $1\ \mu\text{l}$ do *reverse* do gene estudado. Ao final da reação, foi adicionado $2,0\ \mu\text{l}$ do cDNA, com volume final de $25\ \mu\text{l}$ em cada poço da placa de cultura que foi selada com adesivo óptico. Em seguida, a placa foi centrifugada a $1\ \times\ \text{g}$ por 1 minuto.

³³ TRIzol® - Invitrogen, Life Technologies, CA, USA.

³⁴ Qiagen® Inc. - Valencia, CA, USA

³⁵ GE Healthcare Lifescience – São Paulo, SP, Brasil

³⁶ Qiagen® Inc. - Germantown, MD, USA.

³⁷ Applied Biosystems – Foster City, CA, USA.

As reações de amplificação do cDNA foram realizadas em duplicata, com as seguintes condições de ciclo: 30 minutos a 48°C para transcriptase reversa; 10 minutos a 95° C para ativação da DNA polimerase e, em sequência 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação da fita dupla e um minuto a 60°C para anelamento e extensão dos *amplicons*.

O *Software 7500 v.2.1 (Applied Biosystems)* apresentou em gráficos as curvas de amplificação gênica do DNA em relação ao número de ciclos. O ciclo limiar ou *threshold* (C_T) é o que determina quantos ciclos foram necessários para o início desta amplificação, pela emissão de fluorescência específica do alvo molecular quando atinge o limiar basal estabelecido. Portanto, quanto maior a expressão do gene estudado, mais cópias serão sintetizadas em ciclos iniciais e menor será o C_T (Nolan, Hands e Bustin; 2006; Pabinger *et al.*, 2014). Determinou-se o gene beta-actina como normalizador por não apresentar influência na análise, uma vez que é presente nos tecidos biológicos de forma constitutiva (Rebouças *et al.*, 2013). Assim, o C_T relativo do RNA mensageiro de cada amostra foi normalizado em relação ao C_T do gene beta-actina, gerando o valor ΔC_T , esses valores foram comparados ao ΔC_T médio do grupo controle negativo (CN) formando o $\Delta\Delta C_T$ e a expressão gênica foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

3.13 Análise Estatística

Neste estudo utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. A normalidade dos parâmetros foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e constatou-se que todas elas eram não-paramétricas. Os escores referentes à avaliação motora dos animais foram submetidas ao teste Friedman entre os dias e os grupos foram comparados no 7º dia pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados referentes as espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e a expressão gênica foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas entre pares de tratamento pelo teste *post-hoc* de Dunn, adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o *software* estatístico *InfoStat* versão 2016 (Universidade Nacional de Córdoba, Argentina).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivo e caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais da medula óssea de ratos *Wistar*, foram cultivadas até a terceira passagem e apresentaram as características morfológicas típicas *in vitro* descritas em literatura, morfologia semelhante ao fibroblasto (Fig. 3), aderência ao material plástico e rápida expansão celular (Caplan e Dennis, 2006; Dominici *et al.*, 2006).

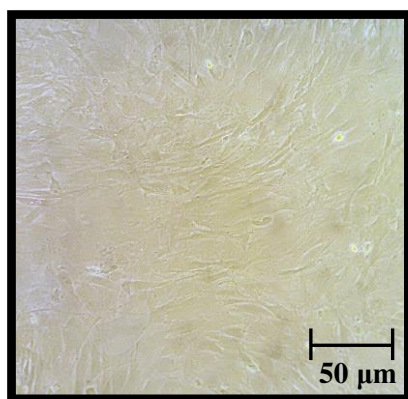


Figura 3. Fotomicrografia de células tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea de ratos *Wistar*. Observe a característica morfológica semelhante a fibroblasto no cultivo celular em garrafa T75 cm² com DMEM e 10% de soro fetal bovino (objetiva 40x).

Realizou-se a caracterização fenotípica das CTM da medula óssea, considerando a expressão dos marcadores fenotípicos nos seguintes antígenos, com suas respectivas porcentagens: CD45 3,06%, CD73 93,99%, CD54 95,10% e CD90 86,77% (Ocarino *et al.*, 2008). As células cultivadas apresentam as características necessárias para serem consideradas como células tronco, e não pertencendo a linhagem hematopoiética, conforme determinado pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of International Society for Cellular Therapy*.

4.2. Modelo experimental do trauma medular agudo

Os modelos animais de laboratório são necessários para compreender os aspectos da lesão medular traumática, avaliando as alterações moleculares, bioquímicas e histológicas decorrentes dessa patologia (Onifer, Rabchevsky e Scheff, 2007). No intuito de descobrir e desenvolver novos fármacos e terapias que visem a prevenção da perda neuronal (Rowland *et al.*, 2008), ainda é necessário o uso de animais em modelos experimentais. Os ratos de laboratório são animais de baixo custo de obtenção, fácil manuseio, e possibilidade de utilizar um número maior de animais nas pesquisas (Taoka e Okajima, 1998). O trauma medular induzido por haste com queda de peso (Kwon *et al.*, 2004) é o modelo mais aceito pelos pesquisadores por mimetizar a situação semelhante que ocorre com os seres humanos (Rodrigues *et al.*, 2010).

A utilização do dispositivo de trauma estereotáxico MASCIS *Impactor*, permitiu a realização de um trauma medular contusivo padronizado em todos os grupos submetidos ao trauma, o que permitiu acompanhamento do processo de injúria medular, corroborando os estudos realizados por Santos *et al.* (2011), Coelho (2016) e Azevedo (2018). Todos os animais desses grupos apresentaram o escore BBB entre 0 a 1 na primeira avaliação após a lesão medular.

Os animais submetidos a contusão com 25 mm de altura apresentaram paraplegia nos membros pélvicos, e alguns animais apresentaram hematúria nos primeiros dias após a lesão medular. Os resultados apontam que o trauma obtido com uma haste de 10 g em queda livre a 25 mm de altura foi considerado grave, contrapondo Rodrigues *et al.* (2010) e Santos *et al.* (2011), que obtiveram trauma moderado em modelos experimentais de trauma semelhantes. Essa diferença pode ser devido ao tamanho e peso dos animais, bem como a localização da lesão. Entretanto, Agrawal e colaboradores (2010) realizaram o trauma contusivo utilizando o MASCIS com classificação das seguintes alturas de impacto: 6,25 mm (leve), 12,5 mm (moderado), 25 mm (grave) 50 mm (muito grave); assim, os dados obtidos corroboram os deste estudo.

O grupo controle negativo (CN) não teve nenhuma alteração motora, demonstrando que o procedimento cirúrgico de laminectomia não comprometeu a integridade da medula espinhal e, consequentemente a função motora, conforme observado em outros estudos com o trauma medular agudo em ratos *Wistar* (Costa, 2010; Drummond, 2010; Torres *et al.*, 2010 e 2016; Caldeira, 2011; Fukushima, 2012; Oliveira *et al.*, 2014a, 2014b e 2018; Coelho, 2016, Silva *et al.*, 2018).

O comportamento dos animais não foi alterado ao longo dos sete dias do experimento. Não houve demonstração de dor e alteração da ingestão diária de água e alimento, o que sugere que a analgesia realizada com a administração de sulfato de morfina foi eficiente. A ausência de complicações pós-operatórias como infecção, deiscência de pontos na ferida cirúrgica ou automutilação, demonstrou eficácia da assepsia cirúrgica, bem como o emprego de antibiótico profilático.

Não houve alteração clínica nos animais que receberam as células tronco mesenquimais, a ω-conotoxina MVIIC e a associação das duas terapias, sendo indicativo a ausência de efeitos colaterais clínicos decorrentes desses tratamentos.

4.3. Avaliação da função locomotora em campo aberto

O teste BBB permitiu uma avaliação de fácil execução e aplicável nos animais, sem causar nenhum dano ou estresse. Os ratos avaliados previamente ao trauma apresentaram o escore máximo 21, caracterizado pela ausência de déficit neurológico, portanto com a deambulação normal, suporte de peso nos quatro membros, estabilidade do tronco e cauda elevada.

Os animais do grupo CN mantiveram o escore 21 na avaliação durante todo o experimento, demonstrando que o procedimento cirúrgico de laminectomia sem o trauma medular não ocasionou nenhuma lesão na medula espinhal (Fig. 4A). Os demais grupos submetidos ao TMA apresentaram paraplegia dos membros posteriores imediatamente após o trauma, representado pelo escore médio de 0 a 1 (Fig. 4B). Este resultado demonstra que o trauma efetuado foi padronizado e grave, e estes animais gradualmente recuperaram a função locomotora em diferentes graus classificados de acordo com escore BBB (1 a 21) (Fig. 4C).

Os animais do grupo CP apresentaram escore médio 1 no 1º dia e 5 no 7º dia de avaliação. O grupo MVIIC apresentou escore 0 e 2 no 1º e 7º dia, respectivamente. Já o grupo CTM-MO apresentou escore médio 1 no 1º dia e 6 no 7º dia e o grupo MVIIC + CTM-MO apresentou 1 e 10, no 1º e 7º dia, respectivamente (Tab.1).

Tabela 1. Escore médio de avaliação da função locomotora em campo aberto, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com placebo (CP), ω -conotoxina (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (CTM-MO + MVIIC).

Dias/Grupos	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
CN	21	21	21	21	21	21	21
CP	1	1	2	3	3	4	5
MVIIC	0	0	1	1	1	2	2
CTM-MO	1	2	2	3	4	5	6
MVIIC + CTM-MO	1	2	3	4	5	8	10

Observa-se que os animais do grupo MVIIC + CTM-MO atingiram uma melhor classificação no escore BBB, demonstrado pela apresentação clínica com suporte de peso ocasional na passada plantar, sem coordenação entre os membros torácicos e pélvicos. Ressalta-se que dois animais desse grupo apresentaram escores 18 e 21, sugerindo que a associação da ω -conotoxina MVIIC às CTM-MO possa ter determinado a recuperação motora desses animais. Outro aspecto importante é o fato de que no grupo CP houve um animal que apresentou escore 20 ao 7º dia, o que contribuiu para a aumentar a sua média.

Os animais foram comparados entre os dias de avaliação em cada grupo pelo teste de Friedman, demonstrando que, com exceção do grupo CN que não apresentou déficits neurológicos, os demais grupos apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Quando se comparou os grupos ao 7º dia de avaliação, observou-se diferença estatística significativa dos grupos CP, MVIIC e CTM-MO em relação ao grupo CN. Entretanto, o grupo MVIIC + CTM-MO foi semelhante ao grupo controle negativo (Fig. 5). Esse resultado indica que houve a recuperação motora rápida do grupo MVIIC + CTM-MO, sugerindo que as células tronco em associação com a MVIIC apresentaram efeito neuroprotetor no TMA.



Figura 4. Avaliação da função locomotora em campo aberto ao 7º dia pela escala de BBB em ratos *Wistar*. A) Animal do grupo CN, classificado no escore 21, observa-se sustentação de peso nos membros torácicos e pélvicos com estabilidade do tronco e cauda elevada. B) Animal do grupo CP, classificado no escore 0 a 1, nenhum movimento observável a movimento discreto de uma a duas articulações do membro pélvico. C) Animal do grupo CTM-MO, classificado no escore 20, observa-se sustentação de peso nos membros torácicos e pélvicos com instabilidade do tronco, e cauda elevada (esta última não observável na imagem).

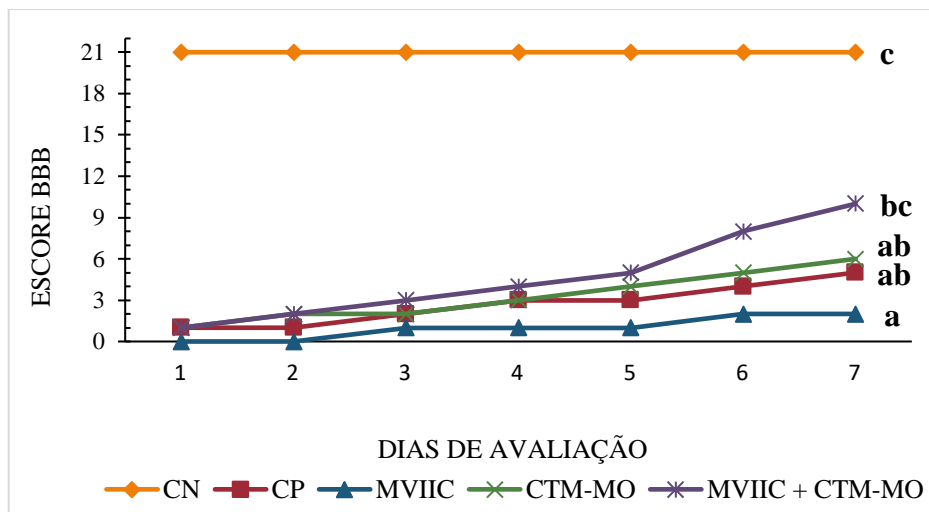


Figura 5. Representação gráfica do escore médio de avaliação da função locomotora em campo aberto durante os sete dias, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular associado aos tratamentos com PBS estéril (CP), ω -conotoxina (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (CTM-MO + MVIIC). Letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Estudos com a ω -conotoxina MVIIC no TMA observaram melhora na função motora quando aplicadas pelas vias intralésional e intratecal (Oliveira *et al.*, 2014a; Lozano, 2017; Azevedo, 2018), o que não foi observado no presente estudo. Essas diferenças de resultados podem ser pelos tempos diferentes de estudos e administração da conotoxina, além da via de aplicação. Conclui-se que este tratamento não trouxe benefício para os animais dos grupos tratados em comparação ao grupo positivo.

As células tronco mesenquimais em sua aplicação isolada ou associada a conotoxina demonstraram que os animais tiveram uma melhor recuperação motora, corroborando com os resultados de outros estudos. Osaka e colaboradores (2010) constataram que a aplicação de CTM (6 h, 1º e 3º dia) em animais após o trauma medular contusivo, determinou a rápida recuperação da função motora avaliada pela escala de BBB, em comparação com os grupos que receberam estas células tardiamente no 7º, 10º, 14º, 21º e 28º dias pós-trauma. Outros pesquisadores observaram os mesmos efeitos sobre a recuperação da função motora com aplicações, vias intralésional e intravenosa de CTM (Caldeira, 2011; Carvalho, 2011 e 2016; Silva *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2018).

O grupo MVIIC + CTM-MO foi considerado o melhor grupo no teste de BBB, alcançando escores mais altos em relação aos outros grupos, verificando que houve sinergia entre as terapias favorecendo a recuperação neurológica, comprovado pela não diferença estatística entre este grupo e o controle negativo. A melhora da função motora neste grupo, poderia ser pelo fato da ação da conotoxina no bloqueio dos CCVD diminuindo os efeitos deletérios da lesão secundária, e as células tronco que teriam agido na regeneração do tecido medular lesionado.

Portanto, os resultados indicaram que a aplicação intravenosa para o transplante de células tronco apresentou efeito terapêutico na recuperação motora na lesão medular, corroborando outras pesquisas realizadas (Osaka *et al.*, 2010, Caldeira, 2011; Silva *et al.*, 2018; Carvalho, 2011 e 2016; Torres *et al.*, 2016 e 2018). O procedimento é considerado não invasivo, as células possuem a capacidade de atingir o local da injúria, dispensando a cirurgia para sua aplicação intralésional. Dessa forma, evita-se uma nova exposição e lesão na medula espinhal (Osaka *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2014; Ohta *et al.*, 2017).

4.4 Quantificação das espécies reativas de oxigênio e mensuração do malondialdeído no tecido medular

A geração das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são eventos precoces que se iniciam imediatamente após a lesão medular. O excesso de radicais livres desestabiliza a homeostase iônica com destruição de proteínas e ácidos nucleicos, com feedback positivo para mais formação de ERO. Esse reage com ácidos graxos poliinsaturados causando a degradação oxidativa de lipídeos, denominado de peroxidação lipídica (Liu *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2007; Bains e Hall, 2012). Nesse estudo, não se observou diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$) na geração de ERO e peroxidação lipídica (Fig. 6 e 7).

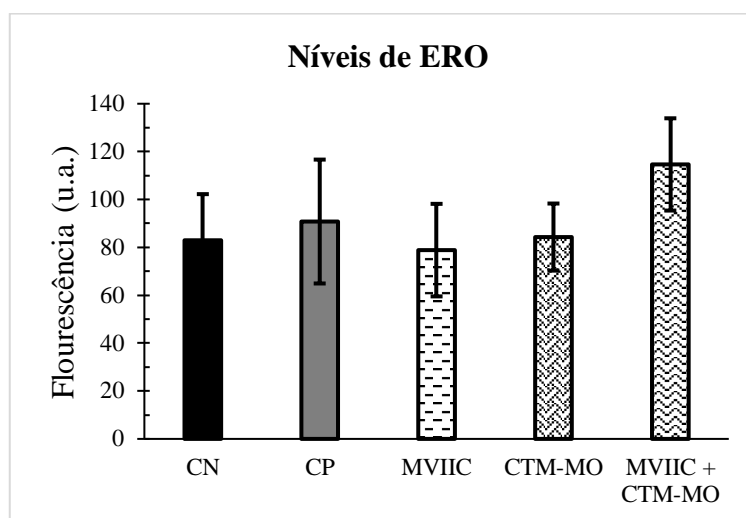


Figura 6. Efeito da ω -conotoxina MVIIC, das células tronco mesenquimais (CTM-MO) e sua associação sobre a produção de espécies reativas de oxigênio sete dias após o trauma medular. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos níveis de ERO dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Nível de ERO nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $82,96 \pm 19,28$; CP $90,79 \pm 25,88$; MVIIC $78,85 \pm 19,33$; CTM-MO $84,30 \pm 14,01$; MVIIC + CTM-MO $114,64 \pm 19,27$.

O grupo MVIIC apresentou o menor valor do nível de ERO, corroborando os estudos de Oliveira *et al.* (2014a e 2014b). Porém, as médias não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), sugerindo apenas que houve uma tendência na diminuição da produção de ERO. Provavelmente a via subaracnóidea não é a melhor via para a aplicação da conotoxina, uma vez que Oliveira e colaboradores (2014a) aplicaram pela via intralésional a MVIIC na dose 15 pmol obtendo a redução significativa dos níveis de ERO.

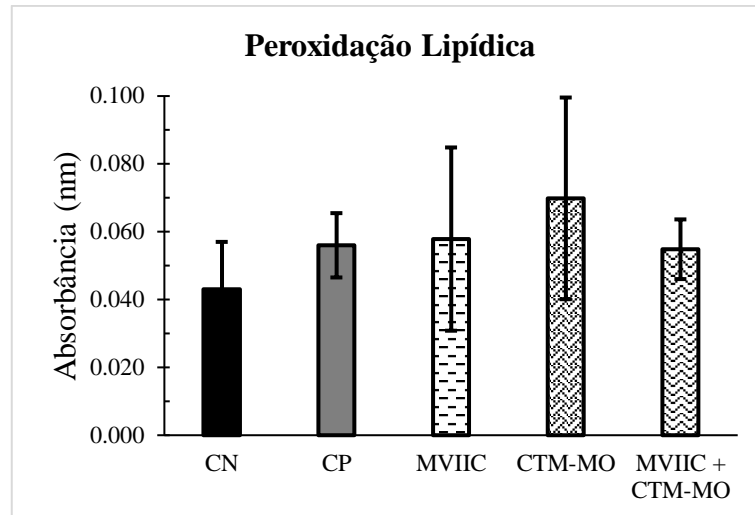


Figura 7. Efeito da ω -conotoxina MVIIC, das células tronco mesenquimais (CTM-MO) e sua associação sobre a peroxidação lipídica sete dias após o trauma medular. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos níveis de malondialdeído (MDA) dos grupos submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular espinal tratado com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação de MDA nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $0,043 \pm 0,014$; CP $0,056 \pm 0,009$; MVIIC $0,058 \pm 0,027$; CTM-MO $0,070 \pm 0,030$ e MVIIC + CTM-MO $0,055 \pm 0,009$.

Não houve diferença estatística na mensuração dos níveis malondialdeído no tecido medular entre os grupos estudados, apesar do grupo MVIIC + CTM-MO ter exibido um valor menor de MDA quando comparados aos grupos MVIIC e CTM-MO. Portanto, a ω -conotoxina MVIIC e as CTM não foram capazes de reduzir os efeitos deletérios da peroxidação lipídica no TMA.

A produção das espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica são dois eventos que estão intimamente correlacionados (Bains e Hall, 2012). Os efeitos tóxicos de ERO na membrana lipídica causam o aumento da permeabilidade na membrana plasmática, permitindo a passagem de íons e outras substâncias prejudiciais a células (Farooqui e Horrocks, 2001). Quando o sistema antioxidante é ativado de maneira eficaz ele consegue reduzir o ERO e, consequentemente a peroxidação lipídica. Para verificarmos melhor a ação em conjunto destes dois tratamentos, seria interessante mensurar outras enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante como a SOD catalase e glutatona peroxidase, avaliando a homeostase celular no tecido injuriado (Chan, 2001).

4.5 Expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos no trauma medular

As análises dos fatores pró-apoptóticos Bax, caspases-3, 8 e 9 foram realizadas com o segmento caudal ao epicentro da lesão medular. A escolha deste segmento foi determinada por estudos que constataram que há maior quantidade de células apoptóticas em relação ao segmento cranial (Citron *et al.*, 2000; Dasari *et al.*, 2007; Torres, 2014).

A expressão gênica relativa das caspases 3 e 8 após a indução do TMA em ratos *Wistar* não demonstraram diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Fig. 8 e 9). Porém, é importante ressaltar o valor obtido para o grupo CP em todos os fatores pró-apoptóticos analisados. Era esperado que este grupo apresentasse um valor maior em comparação ao grupo CN ou aos demais grupos, mas o observado foi que o trauma contusivo grave resultou em um maior índice de necrose no tecido medular, uma vez que não foi possível constatar a apoptose. Já nos grupos tratados MVIIC, CTM-MO e MVIIC + CTM-MO houve uma redução do índice de necrose o que possibilitou a avaliação destes parâmetros, os quais se apresentaram maiores que o CN, como esperado.

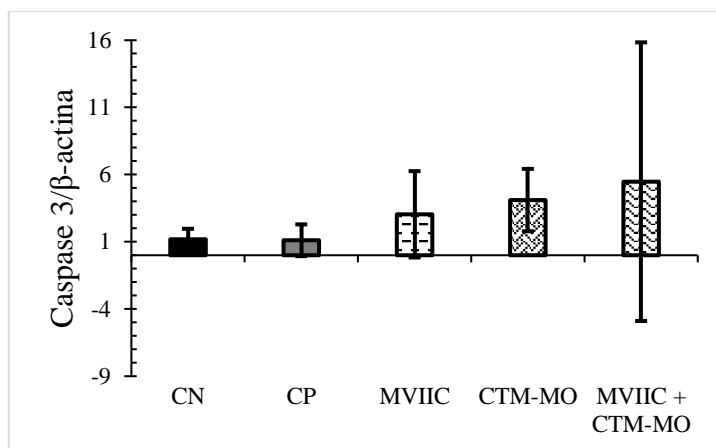


Figura 8. Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico caspase-3 no tecido medular sete dias após o trauma medular contusivo. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratado com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação gênica da caspase-3 nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,19 \pm 0,78$; CP $1,12 \pm 1,18$; MVIIC $3,05 \pm 3,21$; CTM-MO $4,11 \pm 2,32$ e MVIIC + CTM-MO $5,47 \pm 10,37$.

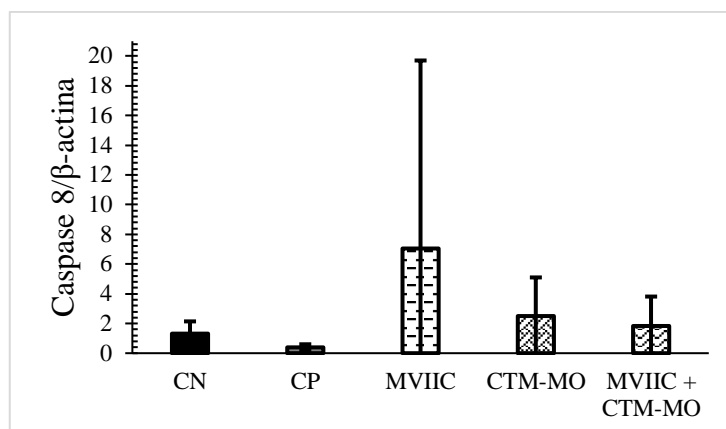


Figura 9. Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico caspase-8 no tecido medular sete dias após o trauma medular contusivo. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação gênica da caspase-8 nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,32 \pm 0,82$; CP $0,39 \pm 0,21$; MVIIC $7,05 \pm 12,66$; CTM-MO $2,50 \pm 2,60$ e MVIIC + CTM-MO $1,83 \pm 1,98$.

A apoptose é regulada por dois caminhos: a via extrínseca e intrínseca. As caspases 3 e 8 atuam na via extrínseca, e a caspase-8 é considerada uma enzima iniciadora induzida pelos receptores de morte (Fas ou TNF) presentes na membrana plasmática (Boldin *et al.*, 1996; Thornberry e Lazebnik, 1998). Uma vez ativadas, as caspases clivam substratos protéicos desencadeando outros fenótipos modulados pela expressão ou ativação de outras proteínas pró e anti-apoptóticas que efetivam ou bloqueiam a morte celular (Poreba *et al.*, 2018). A caspase-8 atua na clivagem da proteína Bid aumentando a permeabilidade mitocondrial, favorecendo o *feedback* positivo da cascata apoptótica (Crawford e Wells, 2011).

Sabe-se que o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio elevam a expressão dos receptores mencionados na membrana plasmática. Os tratamentos propostos não diminuíram os níveis de estresse oxidativo, sugerindo que este fato pode estar relacionado a não diminuição dos fatores apoptóticos. Assim, são necessários mecanismos que preservem as mitocôndrias no intuito de reduzir a formação adicional de ERO, e consequentemente diminuir a apoptose.

Em relação a expressão gênica da caspase-9, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos (Fig. 10). Os grupos que receberam as células tronco mesenquimais de forma isolada (CTM-MO) ou associada a ω -conotoxina MVIIC (MVIIC + CTM-MO) apresentaram valores menores em comparação ao grupo CN, sugerindo que possa ter ocorrido neuroproteção, apesar de não ter diferido estatisticamente em relação aos grupos CN e CP.

A ω -conotoxina MVIIC apresentou maior indução apoptótica em comparação ao grupo CP, que recebeu somente 10 μ l de PBS via intratecal. A conotoxina isoladamente não promoveu neuroproteção, apesar de seu resultado ser semelhante ao grupo CN, e maior que os grupos CN, CTM-MO e MVIIC + CTM-MO. Este resultado não corrobora com os estudos realizados por Oliveira (2012) e Azevedo (2018), que demonstraram que a aplicação da MVIIC por vias intralesional e intratecal, respectivamente, reduziram os níveis desta caspase no TMA. Contudo, deve-se atentar que no estudo de Azevedo (2018), o trauma contusivo gerado pelo dispositivo estereotáxico MASCIS *Impactor* nos animais é considerado como leve (12 mm de altura) em comparação a este estudo que foi trauma grave (25 mm de altura).

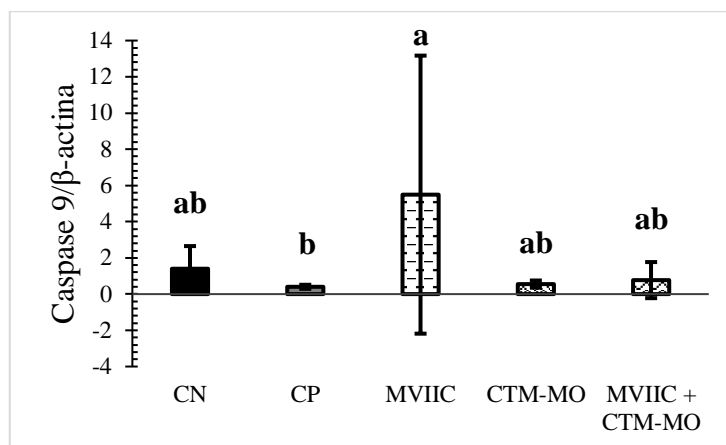


Figura 10. Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico caspase-9 no tecido medular sete dias após o trauma medular contusivo. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Observou-se diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Quantificação gênica da caspase-9 nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,40 \pm 1,25$; CP $0,40 \pm 0,11$; MVIIC $5,49 \pm 7,68$; CTM-MO $0,55 \pm 0,20$ e MVIIC + CTM-MO $0,77 \pm 1,00$. Letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

A expressão relativa do gene Bax demonstrou que o grupo MVIIC + CTM-MO promoveu redução deste fator pró-apoptótico ($p < 0,05$). O tratamento isolado com as CTM-MO apresentou menor valor da expressão gênica em comparação com os grupos CN e CP, sugerindo a diminuição de apoptose no tecido medular (Fig. 11).

O Bax atua na via intrínseca de apoptose; e se transloca do citoplasma para a superfície mitocondrial, permitindo a permeabilidade seletiva e liberando o citocromo c, recrutando as pró-caspases 9. A redução desse fator pró-apoptótico pode ter contribuído para a redução da expressão gênica da caspase-9 dos grupos tratados (CTM-MO e CTM-MO + MVIIC). O resultado encontrado corrobora Oliveira *et al.* (2018), que também observou a redução das caspases 3 e 8, o aumento da expressão do fator anti-apoptótico Bcl-xL após a aplicação de outro bloqueador de CCVD, a ω -conotoxina MVIIC no TMA em ratos. Portanto, o tratamento da MVIIC associado as CTM-MO demonstrou efeito neuroprotetor, agindo na via intrínseca da apoptose.

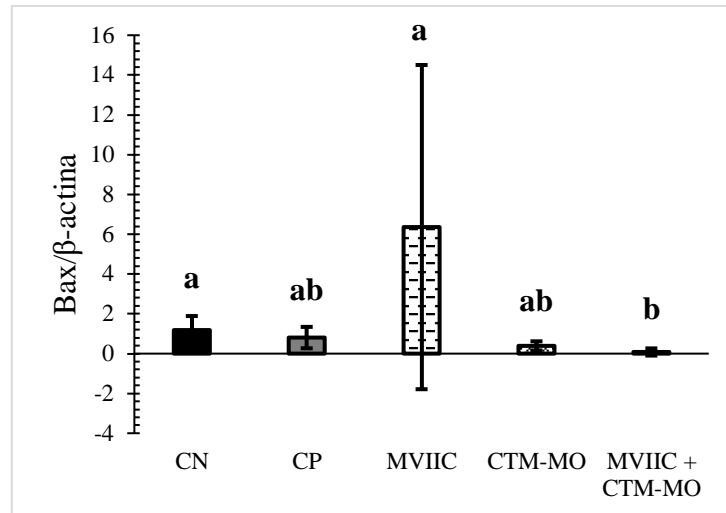


Figura 11. Mensuração da expressão gênica relativa do fator pró-apoptótico Bax no tecido medular sete dias após o trauma medular. Representação gráfica de médias e desvios-padrões dos grupos submetidos a laminectomia (CN) e ao trauma medular espinhal tratados com PBS estéril (CP), ω -conotoxina MVIIC (MVIIC), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e sua associação (MVIIC + CTM-MO). Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Quantificação gênica da Bax nos grupos com suas respectivas médias e desvios-padrões: CN $1,18 \pm 0,71$; CP $0,81 \pm 0,54$; MVIIC $6,36 \pm 8,15$; CTM-MO $0,39 \pm 0,29$ e MVIIC + CTM-MO $0,08 \pm 0,18$. Letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÕES

- A administração da ω -conotoxina MVIIC associada as células tronco mesenquimais da medula óssea promoveram rápida recuperação da função locomotora após o trauma medular agudo experimental.
- A ω -conotoxina MVIIC, as células tronco mesenquimais da medula óssea isolada e a associação das duas formas terapêuticas, não reduziram os níveis da produção das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica.
- A ω -conotoxina MVIIC, as células tronco mesenquimais da medula óssea e sua associação não reduziram a expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos das caspases 3, 8 e 9.
- A associação da ω -conotoxina MVIIC com as células tronco mesenquimais da medula óssea promoveu a redução da expressão gênica do fator pró-apoptótico Bax.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, G.; KERR, C.; THAKOR, N. V.; ALL, A. H. Characterization of graded multicenter animal spinal cord injury study contusion spinal cord injury using somatosensory-evoked potentials. *Spine*, v. 35, n. 11, p. 1122–1127, 2010.

ALVES, E. G. L.; SERAKIDES, R.; BOELONI, J. N. et al. Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 36, p. 21–32, 2016.

AMORIN, B.; VALIM, V. D. S.; LEMOS, N. E. et al. Células-tronco mesenquimais - caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. *Rev HCPA*, v. 32, n. 1, p. 71–81, 2012.

AZEVEDO, S. C. *Ômega conotoxina MVIIIC no tratamento do trauma medular agudo em ratos Wistar*. 2018, 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BAHAMONDES, F.; FLORES, E.; CATTANEO, G. et al. Omental adipose tissue is a more suitable source of canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet. Res.*, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2017.

BAHR ARIAS, M. V.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. *Semin. Ciências Agrárias*, v. 28, n. 1, p. 115–134, 2007.

BAINS, M.; HALL, E. D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, v. 1822, n. 5, p. 675–684, 2012.

BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Update on the treatment of spinal cord injury. *Prog. Brain Res.*, v. 161, p. 217–233, 2007.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.*, v. 139, n. 2, p. 244–256, 1996.

BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Initial assessment of patients with spinal cord trauma. *Vet. Med.*, v. 95, n. 11, p. 851–854, 2000.

BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 15, n. 6, p. 725–731, 2003.

BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; MELO, A. B. et al. Dose-Dependent Effects of Triiodothyronine on the Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Horm. Res.*, v. 72, n. 2, p. 88–97, 2009.

BOLDIN, M. P.; GONCHAROV, T. M.; GOLTSEV, Y. V.; WALLACH, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, v. 85, n. 6, p. 803–815, 1996.

- BONINI, M. G.; ROTA, C.; TOMASI, A.; MASON, R. P. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy? *Free Radic. Biol. Med.*, v. 40, n. 6, p. 968–975, 2006.
- BOOT, J. R. Differential effects of ω -conotoxin GVIA and MVIIC on nerve stimulation induced contractions of guinea-pig ileum and rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 258, n. 1–2, p. 155–158, 1994.
- BURGUILLOS, M. A.; DEIERBORG, T.; KAVANAGH, E. et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*, v. 472, n. 7343, p. 319–324, 2011.
- BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 31, p. 25–35, 2009.
- CALDEIRA, F. M. C. *Células-tronco mesenquimais indiferenciadas no tratamento do trauma medular espinhal de ratos lewis*. 2011, 100f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAMPAGNOLO, D. I.; BARTLETT, J. A.; KELLER, S. E. Influence of neurological level on immune function following spinal cord injury: A review. *J. Spinal Cord Med.*, v. 23, n. 2, p. 121–128, 2000.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.*, v. 98, n. 5, p. 1076–1084, 2006.
- CARDOSO, M. T.; VIDANE, A. S.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E. A melhor fonte de células-tronco: O âmnio do cão e do gato. *Acta Vet. Bras.*, v. 8, n. 2, p. 269–274, 2014.
- CARVALHO, P. H. *Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinhal de ratos wistar, tratados com células-tronco mesenquimais*. 2011. 95f. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CARVALHO, P. H. *Transplante alogênico de células-tronco mesenquimais induz a alteração do perfil de citocinas pró e antiinflamatórias e de fatores neurotrófico no tratamento da lesão espinal*. 2016, 102f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CHAN, P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 21, n. 1, p. 2–14, 2001.
- CHOI, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.*, v. 18, n. 2, p. 58–60, 1995.
- CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.*, v. 23, n. 9, p. 1261–1276, 1992.
- CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G. K. Caspases - An update. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, v. 151, n. 1, p. 10–27, 2008.

CITRON, B. A.; SMIRNOVA, I. V.; ARNOLD, P. M.; FESTOFF, B. W. Upregulation of Neurotoxic Serine Proteases, Prothrombin, and Protease-Activated Receptor 1 Early After Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, v. 17, n. 12, p. 1191–1203, 2000.

COELHO, M. P. R. C. *Efeito neuroprotetor da toxina Pha1 β recombinante no trauma medular agudo em ratos*. 2016, 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, P. M. *Avaliação anátomo-clínica do dantroleno sódico no trauma medular agudo experimental em ratos por período prolongado*. 2010, 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CRAWFORD, E. D.; WELLS, J. A. Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 80, n. 1, p. 1055–1087, 2011.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.*, v. 28, n. 8, p. 875–884, 2000.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. *Oncogene*, v. 22, n. 53, p. 8543–8567, 2003.

DELAMARTER, R. B.; COYLE, J. Acute management of spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg*, v. 7, n. 3, p. 166–75, 1999.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGOLÔ NETO, N. M. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Revista Ceres*, v. 56, n. 4, p.446-450, 2010.

DISSANAYAKA, W. L.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIN, L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J. Endod.*, v. 37, n. 8, p. 1074–1080, 2011.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol.*, v. 209, n. 2, p. 378–388, 2008.

DRUMMOND, B. L. *Subfração PnTx 3-6 do veneno da aranha armadeira (Phoneutria nigriventer) no tratamento de ratos Wistar submetidos ao trauma agudo compressão à medula espinhal*. 2010, 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ECKERT, M. J.; MARTIN, M. J. Trauma: Spinal Cord Injury. *Surg. Clin. North Am.*, v. 97, n. 5, p. 1031–1045, 2017.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A. Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *J. Mol. Neurosci.*, v. 16, n. 2–3, p. 263- 72; discussion 279-84, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos e mecanismo de lesão. *Rev Ass Med Brasil*, v. 43, n. 1, p. 61–69, 1997.

FUKUSHIMA, F. B. *Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol e do etomidato em ratos submetidos ao trauma medular espinal*. 2012, 85f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GENSEL, J. C.; ZHANG, B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 1619, p. 1–11, 2015.

GUPTA, R.; BATHEN, M. E.; SMITH, J. S. et al. Advances in the management of spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg*, v. 18, n. 4, p. 210–22, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 246, n. 2, p. 501–514, 1986.

HAMILTON, S. L.; PEREZ, M. Toxins that affect voltage-dependent calcium channels. *Biochem. Pharmacol.*, v. 36, n. 20, p. 3325–3329, 1987.

HAN, D.; WU, C.; XIONG, Q. et al. Anti-inflammatory Mechanism of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rat Model of Spinal Cord Injury. *Cell Biochem. Biophys.*, v. 71, n. 3, p. 1341–1347, 2015.

HANNON, H. E.; ATCHISON, W. D. Omega-conotoxins as experimental tools and therapeutics in pain management. *Mar Drugs*, v. 11, n. 3, p. 680–699, 2013.

HILLYARD, D. R.; MONJE, V. D.; MINTZ, I. M. et al. A new conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron*, v. 9, n. 1, p. 69–77, 1992.

HUANG, J.-H.; YIN, X.-M.; XU, Y. et al. Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Attenuates Apoptosis, Inflammation, and Promotes Angiogenesis after Spinal Cord Injury in Rats. *J. Neurotrauma*, v. 34, n. 24, p. 3388–3396, 2017.

HULSEBOSCH, C. E. Recent Advances in Pathophysiology and Treatment of Spinal Cord Injury. *Adv. Physiol. Educ.*, v. 26, n. 4, p. 238–255, 2002.

IDE, C.; NAKAI, Y.; NAKANO, N. et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain Res.*, v. 1332, p. 32–47, 2010.

IKEBE, C.; SUZUKI, K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: Optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res. Int.*, v. 2014, n. 1, p.1–11, 2014.

IMAIZUMI, T.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S. G. The role of voltage-gated Ca²⁺ channels in anoxic injury of spinal cord white matter. *Brain Res.*, v. 817, n. 1–2, p. 84–92, 1999.

- ISHIKAWA, S.; HORINOUCI, C.; MURATA, D. et al. Isolation and characterization of equine dental pulp stem cells derived from Thoroughbred wolf teeth. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 79, n. 1, p. 47–51, 2017.
- JANSSENS, L. A. A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. *J. Small Anim. Pract.*, v. 32, n. 11, p. 572–578, 1991.
- KÁRADÓTTIR, R.; CAVELIER, P.; BERGERSEN, L. H.; ATTWELL, D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, v. 438, n. 7071, p. 1162–1166, 2005.
- KRUDEWIG, C.; DESCHL, U.; WEWETZER, K. Purification and in vitro characterization of adult canine olfactory ensheathing cells. *Cell Tissue Res.*, v. 326, n. 3, p. 687–696, 2006.
- KUIDA, K. Caspase-9. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 32, n. 2, p. 121–4, 2000.
- KWON, B. K.; OKON, E. B.; TSAI, E. et al. A Grading System To Evaluate Objectively the Strength of Pre-Clinical Data of Acute Neuroprotective Therapies for Clinical Translation in Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, v. 28, n. 8, p. 1525–1543, 2011.
- KWON, B. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N. et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.*, v. 4, n. 4, p. 451–464, 2004.
- LAMKANFI, M.; FESTJENS, N.; DECLERCQ, W. et al. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.*, v. 14, n. 1, p. 44–55, 2007.
- LAVOR, M. S. L.; BINDA, N. S.; FUKUSHIMA, F. B. et al. Ischemia-reperfusion model in rat spinal cord: Cell viability and apoptosis signaling study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v. 8, n. 9, p. 9941–9949, 2015.
- LAYER, R. T.; MCINTOSH, J. M. Conotoxins: Therapeutic potential and application. *Mar. Drugs*, v. 4, n. 3, p. 119–142, 2006.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 5, n. 2, p. 227–31, 1992.
- LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 2, n. 10, p. 790–802, 2003.
- LI, G. L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M.; FUNA, K.; HOLTZ, A.; WANG, W. L.; OLSSON, Y. Apoptosis and Expression of Bcl-2 after Compression Trauma to Rat Spinal Cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v. 55, n. 3, p. 280–289, 1996.
- LIU, H.; DE WAARD, M.; SCOTT, V. et al. Identification of Three Subunits of the High Affinity ω -Conotoxin MVIIC-sensitive Ca^{2+} Channel. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 23, p. 13804–13810, 1996.

- LIU, D.; SYBERT, T. E.; QIAN, H.; LIU, J. Superoxide Production After Spinal Injury Detected by Microperfusion of Cytochrome c. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 25, n. 3, p. 298–304, 1998.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 72, n. 2–3, p. 323–331, 2005.
- LOZANO, J. S. G. *Efeito neuroprotetor da ômega-conotoxina MVIIC no trauma experimental da medula espinhal em ratos*. 2017. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LU, J.; ASHWELL, K. W.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*, v. 25, n. 14, p. 1859–66, 2000.
- MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory Caspases. *Cell*, v. 117, n. 5, p. 561–574, 2004.
- MATUTE, C.; ALBERDI, E.; DOMERCQ, M. et al. Excitotoxic damage to white matter. *J. Anat.*, v. 210, n. 6, p. 693–702, 2007.
- MAZZARELLA, R.; GARNICA, T. K.; ROBALLO, K. C. S.; AMBRÓSIO, C. E. Células-tronco derivadas do epitélio olfatório: perspectivas terapêuticas na medicina veterinária. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, n. 8, p. 787–792, 2016.
- MCDONOUGH, S. I.; SWARTZ, K. J.; MINTZ, I. M. et al. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by ω -conotoxin MVIIC. *J. Neurosci.*, v. 16, n. 8, p. 2612–2623, 1996.
- MENDES, D. S.; ARIAS, M. V. B. Traumatismo da medula espinhal em cães e gatos: estudo prospectivo de 57 casos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, n. 12, p. 1304–1312, 2012.
- MESTRE, C.; PÉLISSIER, T.; FIALIP, J. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 32, n. 4, p. 197–200, 1994.
- MINAMI, K.; RAYMOND, C.; MARTIN-MOUTOT, N. et al. Role of Thr 11 in the binding of ω -conotoxin MVIIC to N-type Ca^{2+} channels. *FEBS Lett*, [s. l.], v. 491, n. 1–2, p. 127–130, 2001.
- MIR, R.; KARIM, S.; AMJAD KAMAL, M. et al. Conotoxins: Structure, Therapeutic Potential and Pharmacological Applications. *Curr. Pharm. Des.*, v. 22, n. 5, p. 582–589, 2016.
- MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. *Cienc. Rural*, v. 40, n. 1, p. 238–245, 2010.
- MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. in Stem Cell Biology. *Cell*, v. 88, n. 3, p. 287–98, 1997.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER. *Facts and Figures at a Glance*. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2018.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.*, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006.

OCARINO, N. M.; BOELONI, J. N.; GOES, A. M. et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*, v. 19, n. 4, p. 320–325, 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OHTA, Y.; HAMAGUCHI, A.; OOTAKI, M. et al. Intravenous infusion of adipose-derived stem/stromal cells improves functional recovery of rats with spinal cord injury. *Cytotherapy*, v. 19, n. 7, p. 839–848, 2017.

OLBY, N. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.*, v. 40, n. 5, p. 791–807, 2010.

OLIVERA, B. M.; TEICHERT, R. W. Diversity of the Neurotoxic Conus Peptides: A Model for Concerted Pharmacological Discovery. *Mol. Interventions*, v. 7, n. 5, p. 251–260, 2007.

OLIVEIRA, K. M. *Efeitos de diferentes doses de ω -conotoxina MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo*. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, K. M.; BINDA, N. S.; LAVOR, M. S. L. et al. Conotoxin MVIIA improves cell viability and antioxidant system after spinal cord injury in rats. *PLOS ONE*, v. 13, n. 10, p. 1–26, 2018.

OLIVEIRA, K. M.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, C. M. O. et al. Omega-conotoxin MVIIC attenuates neuronal apoptosis in vitro and improves significant recovery after spinal cord injury in vivo in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v. 7, n. 7, p. 3524–3536, 2014. a.

OLIVEIRA, K. M.; SILVA, C. M. O.; LAVOR, M. S. L. et al. Systemic effects induced by intralesional injection of ω -conotoxin MVIIC after spinal cord injury in rats. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2014. b.

ONIFER, S. M.; RABCHEVSKY, A. G.; SCHEFF, S. W. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J.*, v. 48, n. 4, p. 385–395, 2007.

OSAKA, M.; HONMOU, O.; MURAKAMI, T. et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.*, v. 1343, p. 226–235, 2010.

OYINBO, C. A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascada. *Acta Neurobiol. Exp.*, v. 71, n. 2, p. 281–299, 2011.

- PABINGER, S.; RÖDIGER, S.; KRIEGNER, A. et al. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomol. Detect. Quantif.*, v. 1, n. 1, p. 23–33, 2014.
- PARK, E.; VELUMIAN, A. A.; FEHLINGS, M. G. The Role of Excitotoxicity in Secondary Mechanisms of Spinal Cord Injury: A Review with an Emphasis on the Implications for White Matter Degeneration. *J. Neurotrauma*, v. 21, n. 6, p. 754–774, 2004.
- PINTO FILHO, S. T. L.; TREICHEL, T. L. E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J. S. et al. Células-Tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. *Vet. e Zootec.*, v. 20, p. 49–59, 2013.
- POREBA, M.; GROBORZ, K.; NAVARRO, M. et al. Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ.*, v. 26, n. 2, p. 229–244, 2018.
- PRYOR, R. J.; WITTEWER, C. T. Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis. In: *Clinical Applications of PCR*. New Jersey: Humana Press, 2006. v. 336, p. 19–32.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Res. Rev.*, v. 45, n. 2, p. 125–141, 2004.
- REBOUÇAS, E. L.; COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J. et al. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 56, n. 1, p. 143–154, 2013.
- RODRIGUES, N. R.; LETAIF, O. B.; CRISTANTE, A. F. et al. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras.*, v. 18, n. 4, p. 182–186, 2010.
- ROSADO, I. R.; CARVALHO, P. H.; ALVES, E. G. L. et al. Immunomodulatory and neuroprotective effect of cryopreserved allogeneic mesenchymal stem cells on spinal cord injury in rats. *Genet. Mol. Res.*, v. 16, n. 1, p. 1–24, 2017.
- ROWLAND, J. W.; HAWRYLUK, G. W. J.; KWON, B.; FEHLINGS, M. G. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*, v. 25, n. 5, p. 1–17, 2008.
- RUZICKA, J.; MACHOVA-URDZIKOVA, L.; GILLICK, J. et al. A Comparative Study of Three Different Types of Stem Cells for Treatment of Rat Spinal Cord Injury. *Cell Transplant.*, v. 26, n. 4, p. 585–603, 2017.
- SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; ALBERDI, E.; IBARRETXE, G. et al. Caspase-Dependent and Caspase-Independent Oligodendrocyte Death Mediated by AMPA and Kainate Receptors. *J. Neurosci.*, v. 23, n. 29, p. 9519–9528, 2003.
- SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; MATUTE, C. AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiol. Dis.*, v. 6, n. 6, p. 475–485, 1999.
- SANTOS, G. B.; CRISTANTE, A. F.; MARCON, R. M. et al. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortop Bras.*, v. 19, n. 2, p. 87–91, 2011.

SASAKI, T.; KOBAYASHI, K.; KOHNO, T.; SATO, K. Combinatorial synthesis of ω -conotoxin MVIIC analogues and their binding with N- and P/Q-type calcium channels. *FEBS Lett.*, v. 466, n. 1, p. 125–129, 2000.

SHER, E.; BIANCARDI, E.; POLLO, A.; CARBONE, E.; LI, G.; WOLLHEIM, C. B.; CLEMENTI, F. ω -Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca²⁺ channels in insulin-secreting cells. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 216, n. 3, p. 407–414, 1992.

SHEN, G. S.; LAYER, R. T.; MCCABE, R. T. Conopeptides: From deadly venoms to novel therapeutics. *Drug Discov. Today*, v. 5, n. 3, p. 98–106, 2000.

SILVA, C. M. O.; OLIVEIRA, K. M.; LAVOR, M. S. L. et al. Benefícios da condroitinase abc associada a células-tronco mesenquimais na lesão espinhal aguda em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 70, n. 3, p. 857–872, 2018.

SUN, A. Y.; CHEN, Y. M. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *J. Biomed. Sci.*, v. 5, n. 6, p. 401–14, 1998.

SYLVESTER, K. G.; LONGAKER, M. T. Stem cells: review and update. *Arch Surg*, v. 139, n. 1, p. 93–9, 2004.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol.*, v. 56, n. 3, p. 341–358, 1998.

TAKEUCHI, H.; NATSUME, A.; WAKABAYASHI, T. et al. Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner. *Neurosci. Lett.*, v. 426, n. 2, p. 69–74, 2007.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. *Science*, v. 281, n. 5381, p. 1312–1316, 1998.

THURET, S.; MOON, L. D. F.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 7, n. 8, p. 628–643, 2006.

TORRES, B. B. J. *Dantrolene e células-tronco mesenquimais no tratamento do trauma medular agudo em ratos Wistar*. 2014, 80f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TORRES, B. B. J. *Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular agudo experimental*. 2008, 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TORRES, B. B. J.; MARTINS, B. C.; SILVA, C. M. O. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells and Dantrolene Promote Functional Locomotor Improvement in Wistar Rats after Spinal Cord Injury. *JSM Neurosurg Spine*, v. 4, n. 2, p. 1–5, 2016.

TORRES, B. B. J.; MARTINS, B. C.; SILVA, C. M. O. et al. Dantrolene e células-tronco mesenquimais promovem melhora funcional em ratos Wistar com trauma espinhal agudo. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 38, n. 4, p. 703–709, 2018.

TORRES B. B. J., Silva C.M.O., Almeida Á. E. R. F., Caldeira F. M. C. et al. Experimental model of acute spinal cord injury produced by modified stereotaxic equipment. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, n. 1, p. 92-99, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

WILLERTH, S. M.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. Cell therapy for spinal cord regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, n. 2, p. 263–276, 2008.

WITIW, C. D.; FEHLINGS, M. G. Acute Spinal Cord Injury. *J. Spinal Disord. Tech.*, v. 28, n. 6, p. 202–210, 2015.

WU, B.; REN, X. Promoting Axonal Myelination for Improving Neurological Recovery in Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*, v. 26, n. 10, p. 1847–1856, 2009.

WU, L. G.; SAGGAU, P. Block of multiple presynaptic calcium channel types by ω -conotoxin-MVIIC at hippocampal CA3 to CA1 synapses. *J Neurophysiol.*, v. 73, n. 5, p. 1965–1972, 1995.

YIP, P. K.; MALASPINA, A. Spinal cord trauma and the molecular point of no return. *Mol. Neurodegener.*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2012.

ZHANG, J. H.; ZHANG, Y.; HERMAN, B. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Res. Rev.*, v. 2, n. 4, p. 357–366, 2003.

ZHANG, N.; YIN, Y.; XU, S. J. et al. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Indian J. Med. Res.*, v. 135, n. 3, p. 287–296, 2012.

7. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da omega-conotoxina MVIIIC associado à aplicação de células tronco mesenquimais no trauma medular agudo", protocolo do CEUA: 389/2017 sob a responsabilidade de Eliane Gonçalves de Melo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/02/2018.

Vigência da Autorização	26/02/2018 a 25/02/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	350g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	350g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	350g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	350g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6

Peso/Idade	150g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério

Considerações posteriores:

27/02/2018	Aprovado na reunião do dia 26/02/2018. Validade: 26/02/2018 à 25/02/2023
------------	--

Belo Horizonte, 31/12/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br