

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

Juan Sebastián Gutierrez Lozano

Ômega-conotoxina MVIIC no trauma experimental da medula espinhal.

Belo Horizonte, MG

2017

Juan Sebastián Gutierrez Lozano

Ômega-conotoxina MVIC no trauma experimental da medula espinhal.

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.

Orientadora: Prof^a Dra. Eliane Gonçalves de
Melo

Área de concentração: Clínica e Cirurgia
Veterinária

Belo Horizonte, MG

2017



FOLHA DE APROVAÇÃO

JUAN SEBASTIAN GUTIERREZ LOZANO

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 VETERINARIAS.

Aprovada em 10 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Eliane Gonçalves de Melo

Prof^a. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador

B. S. B. Blanco

Prof. Benito Soto Blanco
Escola de Veterinária - UFMG

Nancy Scardua Binda

Prof^a. Nancy Scardua Binda
Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa Br. - IEP

Carla Maria Osório Silva

Dr^a. Carla Maria Osório Silva
Doutorado - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Cidade Universitária - CEP 31271-900
Belo Horizonte - Minas Gerais
Telefone: (51) 3409-3077/2099641
www.vet.ufmg.br
E-mail: cap@vet.ufmg.br



G984o Gutierrez Lozano, Juan Sebastián. 1988 -
Ômega-conotoxina MVIIC no trauma experimental da medula espinhal. / Juan Sebastián
Gutierrez Lozano. - 2019
77p. ; 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. Ômega-conotoxina MVIIC – Teses. 2. Rato animal de laboratório - Teses. 3. Lesão
medular – Teses. 4. Traumatismo medula espinhal – Teses. 5. Medicamentos – Teses. I. Melo,
Eliane Gonçalves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636. 089 7

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo uma vez possuído.”
(Confúcio).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Álvaro e Marcela, pela confiança e incentivo a continuar estudando não importando os obstáculos. A buscar a felicidade em tudo que realizaremos, pois só assim conseguiremos o sucesso.

Aos meus familiares, que mesmo estando longe, sempre me deram amor, incentivo e apoio incondicionais.

Agradeço especialmente a professora Eliane Gonçalves de Melo pelas orientações, por me permitir fazer parte dessa equipe de neurologia incrível, também pela paciência e por todos os conhecimentos compartilhados.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez pela parceria e por nos ajudar ao longo desse trabalho de pesquisa e nos permitir usar as instalações do laboratório.

Ao professor Benito Soto-Blanco por permitirem o desenvolvimento de parte deste trabalho no laboratório de Toxicologia e, principalmente pelo auxílio na diluição da toxina.

À toda equipe de neurologia. Especialmente a Maria Paula Rajão, uma verdadeira amiga que ganhei desde o momento que fui estagiário, com quem aprendi muitas coisas e ainda continua me ensinando, sempre disposta a me ajudar e a quem considero uma mulher incrível. Agradeço pela enorme ajuda, Carla Maria Osório, uma grande profissional e indispensável para a realização desse estudo, agradeço pelas orientações, pelo profissionalismo mostrado durante o desenvolvimento do trabalho e por todo o empenho na realização das cirurgias. Ao Pablo Herthel, pela boa vontade e disposição de seu tempo para a realização das cirurgias e por permitir assim o cumprimento do cronograma. Ao Sandro Coelho pela disposição e boa vontade de ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Aos alunos de iniciação científica, em especial, Marina Pinto Marlière, sem a qual o experimento não teria cumprido o cronograma, e agradeço-a por ter nos acompanhado desde o início do estudo, sempre com boa vontade em nos ajudar.

A todos os novos amigos e parceiros do IEP-Santa Casa, em especial Prof. Marcus Vinicius Gomez, Nancy Scardua, Fernando Rubatino e Cláudio Antonio, infinita gratidão pela ajuda proporcionada.

À CAPES pelo apoio financeiro da bolsa de estudos, e à FAPEMIG e ao CNPQ pelo investimento nos projetos de pesquisa da equipe.

Aos canalhas, Bernardo de Caro, Guilherme de Caro, Flávio Alonso, Leandro Caxito, Adonis Baldasso, Caian Stolf, Rodrigo Valadares, Bruno Paiva, Esteban Carmona, Diego Sancez, Santiago Jaramillo, pelo apoio, amizade e carinho.

A todo o Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, em especial Professores Paulo Ricardo de Oliveira Paes e Professora Fabíola de Oliveira Paes Leme, por permitirem a execução das análises clínicas no laboratório agradecendo aos residentes Marco Tulio, Manuela Amorim e Ludmila luza pelo processamento das análises.

Aos professores da Escola de Veterinária, Fernando Bretas, Elias Jorge Facury Filho, Felipe Pierezan, Paulo Ricardo, Rubens Carneiro, por todo incentivo e participação em minha formação pessoal e acadêmica.

Gostaria de expressar minha sincera e especial gratidão à Maria Paula Rajão por suas assistências técnicas, científicas e esforços muito além de suas obrigações, mas acima de tudo isso, por sua nobreza, por sua amizade e pela sua capacidade de fazer a gente sorrir mesmo nos momentos de dificuldades.

À Maria Adelaide Fernandes, José Batista (biotério da Faculdade de Farmácia – UFMG), pela cooperação na aquisição dos animais.

Aos professores Benito Soto Blanco, Nancy Scardua Binda, Fabíola de Oliveira Paes Leme e Carla Maria Osório, pela participação da banca examinadora, agradeço por terem aceitado o convite para contribuírem com o trabalho.

Agradeço especialmente ao Bernardo de Caro Martins por todos os ensinamentos na área de neurologia e por sempre ter disposição de ajudar.

Agradeço especialmente a Flávio Alonso pela sua amizade incondicional, por me aceitar e por sempre estar presente quando eu preciso, você é um verdadeiro amigo.

RESUMO

O trauma medular é uma afecção comum na medicina veterinária. Ela pode acarretar graves consequências tais como déficit na função motora sensorial e autonômica para o animal acometido e pode determinar a eutanásia do mesmo. As lesões medulares causam danos no tecido nervoso por mecanismos primário e secundário. A lesão primária e de tipo irreversível, já no mecanismo secundário um influxo exacerbado de cálcio é produzido, principalmente devido à ativação de canais para cálcio voltagem-dependentes (CCVD). Esse evento é considerado crítico na fisiopatogênica da lesão medular. A Ômega-conotoxina MVIIC obtida da purificação do veneno de *Conus magus* é capaz de bloquear CCVD e, assim, reduzir o influxo de cálcio. O presente estudo avaliou o efeito da aplicação intratecal da Ômega-conotoxina MVIIC nas doses 15 e 30 pmol e nos tempos 5 minutos e uma hora após o trauma medular experimental em ratos. Foram utilizados 36 ratos machos adultos, variedade Wistar, aleatoriamente divididos em seis grupos. Os animais do grupo Controle Negativo (CN) foram submetidos à laminectomia dorsal. Nos demais grupos, além da laminectomia, os animais foram submetidos ao trauma medular agudo contusivo pelo aparelho MASCIS impactor. Realizou-se aplicação intratecal de placebo nos animais dos grupos Controle Positivo (CP). Nos Grupos G3 e G5 foram aplicadas doses de 15 e 30 pmol, respectivamente, da toxina Ômega-conotoxina MVIIC, nos animais tratados 5 minutos após o trauma. Nos Grupos G4 e G6 foram aplicadas as doses de 15 e 30, respectivamente, uma hora após o trauma. Os animais foram eutanasiados 48 horas após a intervenção cirúrgica e a aplicação da toxina. Por fim, coletaram-se amostras de sangue para avaliar os efeitos secundários, e segmentos de medula espinhal, para quantificação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica e para a avaliação da expressão gênica de fatores relacionados à apoptose por meio de técnica de qRT-PCR. Observou-se redução na produção de ERO's no grupo tratado com 15 pmol/5 minutos após o trauma, o que sugere tendência de redução dos níveis de ERO's, o que, provavelmente, estaria relacionado à redução dos eventos patogênicos devido ao acúmulo intracelular de cálcio pelo bloqueio de CCVD.

Palavras-chave: Ômega-conotoxina MVIIC, trauma medular, neuroproteção, MASCIS impactor, cálcio, apoptose, peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio, qRT-PCR, em tempo real.

ABSTRACT

Spinal cord trauma is a common condition in veterinary medicine. It can lead to serious consequences such as deficits in sensory and autonomic motor function for the affected animal and can determine the euthanasia of the affected animal. Marrow lesions cause damage to nerve tissue by primary and secondary mechanisms. The primary and irreversible lesion, already in the secondary mechanism an exacerbated influx of calcium is produced, mainly due to the activation of voltage-dependent calcium channels (CCVD). This event is considered critical in the pathophysiology of spinal cord injury. The Omega-conotoxin MVIIC obtained from the purification of the venom of *Conus magus* is able to block CCVD and thus reduce the influx of calcium. The present study evaluated the effect of intrathecal application of omega-conotoxin MVIIC at doses 15 and 30 pmol and at the times 5 minutes and one hour after the experimental bone marrow trauma in rats. Thirty - six adult male Wistar rats were randomly divided into six groups. The animals of the Negative Control (CN) group were submitted to dorsal laminectomy. In the other groups, in addition to laminectomy, the animals were submitted to acute medullary trauma by the device MASCIS impactor. Intrathecal application of placebo was performed in the animals of the Positive Control (CP) groups. In Groups G3 and G5 doses of 15 and 30 pmol, respectively, of the Omega-conotoxin toxin MVIIC, were applied in the treated animals 5 minutes after the trauma. In Groups G4 and G6 doses of 15 and 30, respectively, were applied one hour after the trauma. The animals were euthanized 48 hours after the surgical intervention and the application of the toxin. Finally, blood samples were collected to evaluate the side effects and spinal cord segments for the quantification of reactive oxygen species and lipid peroxidation and for the evaluation of the gene expression of factors related to apoptosis by means of the qRT-PCR. There was a reduction in ROS production in the treated group at 15 pmol / 5 minutes post trauma, suggesting a tendency to reduce ROS levels, which would probably be related to the reduction of the pathogenic events due to the intracellular accumulation of calcium by blocking CCVD.

Keywords: Omega-conotoxin MVIIC, neuroprotection, MASCIS impactor, calcium, apoptosis, lipid peroxidation, reactive oxygen species, qRT-PCR, in real time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática de formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	21
Figura 2 -	Mecanismo de falha energética e baixa síntese de ATP nas células neuronais da medula espinhal após TMA.....	23
Figura 3 -	Esquema das vias de apoptose após trauma medular espinhal.....	26
Figura 4 -	Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. A) Indução anestésica em câmara com isoflurano. B) Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa aquecida com bolsa térmica. Realização de antissepsia com iodopovidona degermante em região dorsal do tronco tricotomizada. Manutenção anestésica por meio de máscara com isoflurano em sistema semiaberto. C) Afastamento da musculatura epaxial e identificação dos processos espinhosos. D) Osteotomia do processo espinhoso com auxílio de pinça de Halsted. E) Desgaste da lâmina dorsal com drill pneumático neurológico. F) Visualização da medula espinhal após laminectomia dorsal. G) Utilização do sistema de estabilização vertebral “clamping system”.....	34
Figura 5 -	Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar com aparelho Mascis Impactor, recuperação anestésica e aplicação intratecal. A) Animal posicionado no aparelho indutor de trauma espinhal Mascis Impactor. Processos espinhosos de T10 e T12 individualizados e estabilizados pelo sistema de estabilização do aparelho, haste de impacto do aparelho tocando a medula na região de laminectomia dorsal (T11). B) Hemorragia sub-aracnóidea (seta) após trauma medular por queda de haste a 12.5 mm de altura. C) Recuperação anestésica em caixa individual com oxigenoterapia e aquecimento por colchão. D) Aplicação intratecal realizada por meio de punção do espaço subaracnóide entre a quinta e sexta vértebras lombares por seringa de Hamilton 10 microlitros acoplada a agulha 26G.....	35
Figura 6-	Avaliação da função motora em campo aberto por escala de BBB em ratos Wistar.	47
Figura 7-	Representação gráfica de medianas dos valores de hemoglobina de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal.....	49

Figura 8-	Representação gráfica de médias dos valores de leucócitos de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal.....	50
Figura 9-	Representação gráfica de médias dos valores de hemácias de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal.....	51
Figura 10-	Representação gráfica de medianas dos valores plasmáticos de FA.....	53
Figura 11-	Representação gráfica de medianas dos valores plasmáticos de AST.....	54
Figura 12-	Representação gráfica de medianas dos valores plasmáticos de ALT.....	55
Figura 13-	Representação gráfica de medianas dos valores plasmáticos de ureia.....	56
Figura 14-	Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados à apoptose Bax.....	57
Figura 15-	Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados à apoptose Bcl-xl.....	58
Figura 16-	Representação gráfica de medianas e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados à apoptose Caspase-8.....	60
Figura 17-	Representação gráfica de medianas e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados à apoptose Caspase-9.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Principais eventos observados após lesão inicial.....	20
Quadro 2 -	Características de deambulação de membros pélvicos (MPs) e seus respectivos escores segundo avaliação de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação de capacidade motora em ratos após trauma medular torácico agudo.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Genes e sequências de nucleotídeos dos primeiros iniciadores para qRT-PCR em tempo real Bax.....	42
Tabela 2-	Valores médios de escores de deambulação por escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).	46
Tabela 3-	Relação da apresentação de efeitos colaterais com diferentes doses de aplicação da MVIIC 5 minutos e 1 hora após o trauma medular agudo em ratos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - Micrograma
µL - Microlitro
ADP - Difosfato de adenosina
AIF - Fator indutor de apoptose
AMP - Monofosfato de adenosina
ALT - Alanina aminotransferase
AMPA - Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropionato
ANOVA - Análise de variância
APAF- 1 - Protease ativadora da apoptose- 1
AST - Aspartato aminotransferase
ATP - Trifosfato de adenosina
BBB - Basso, Beattie e Bresnahan
Ca²⁺ - Cálcio
CCVD - Canais para cálcio voltagem dependentes
cDNA- DNA complementar
CEUA - Comissão de ética no uso de animais
Cm - Centímetro
CN - Controle negativo
CP - Controle positivo
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EROs - Espécies reativas de oxigênio
EV - Escola de veterinária
FA - Fosfatase alcalina
g - Grama
G3 - 15 pmol/5 minutos
G4 - 15pmol/ 1 hora
G5 - 30 pmol/5 minutos
G6 - 30 pmol/1 hora
GLU - Glutamato
ICAM-1 - Intercelular Adhesión Molecule-1
IM - Intramuscular
IT - Intratecal
LM - Lesão medular
LMA - Lesão medular aguda
MVIIC - Ômega-conotoxina MVIIC
MASCIS - Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
MDA - Malondialdeído
NMDA - N-Metil-D-aspartato
PCR- Reação em cadeia da polimerase
RE - Retículo endoplasmático
SC - Subcutâneo
SNC - Sistema Nervoso Central
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TM - Trauma medular
TMA - Trauma medular agudo
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM Vascular Cell Adhesion Molecule-1

α - Alfa

β - Beta

ω - Ômega

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1. Fisiopatogênica do trauma medular	20
3.1.1. Produção de espécies reativas de oxigênio	23
3.1.3. Excitotoxicidade	24
3.1.4. Inflamação e resposta imunológica	26
3.1.5. Morte celular: necrose e apoptose.....	26
3.1.6. O papel do cálcio no trauma medular.....	29
3.2. Bloqueadores de canais de cálcio na neuroproteção.	30
3.3. Toxina ômega-conotoxinas MVIIC	31
3.4. Estudo experimental das lesões medulares	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Animais	33
4.2. A toxina MVIIC.....	33
4.3. Grupos experimentais.....	33
4.4. Procedimentos anestésico e cirúrgico e cuidados pós-operatórios.....	34
4.5. Tratamentos	35
4.6. Avaliação dos efeitos colaterais	37
4.7. Avaliação da capacidade motora em campo aberto	38
4.8. Eutanásia e coleta de materiais	42
4.9. Avaliação hematológica e bioquímica plasmática	42
4.10. Avaliação das espécies reativas de oxigênio	42
4.11. Peroxidação lipídica por método TBARS	43
4.12. Teor de proteína pelo método de Bradford.....	43
4.13. Avaliação da expressão gênica relativa de Bax, Bcl-xl, caspase-8 e caspase-9 por qRT-PCR em tempo real	44
4.14. Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1. Modelo experimental de trauma medular agudo.....	46
5.2. Tratamentos	46

5.3. Avaliação da capacidade motora em campo aberto	47
5.4. Avaliação clínica e laboratorial dos efeitos colaterais da MVIIC.....	49
5. Efeito da MVIIC sobre expressão gênica de fatores relacionados à apoptose após lesão medular	58
5.6. Efeito da ômega-conotoxina MVIIC sobre níveis de ERO após lesão medular.....	63
5.7. Efeito da ômega-conotoxina MVIIC sobre peroxidação lipídica 48 horas após lesão medular.....	66
6. CONCLUSÕES	68
7. ANEXO.....	69
8. REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Na medicina humana, o trauma medular (TM) é importante causa de morbimortalidade, notadamente entre as camadas mais jovens da população (BRITO et al., 2001). Dentre as principais causas de TM, destacam-se acidentes automobilísticos, quedas de altura, acidentes por mergulho em água rasa, ferimentos por arma de fogo e ferimentos por arma branca (PICKETT et al., 2006). Estima-se que a cada ano ocorram mais de 10.000 novos casos de lesão medular somente no Brasil, sendo o trauma a causa predominante (CAMPOS et al., 2008). Trata-se de afecção de grande repercussão física e psíquica para o paciente acometido e para a família, não apenas pela diminuição da habilidade de locomoção, mas também devido à dor e possíveis disfunções urinária, fecal e sexual (TORRES, 2011; RODRIGUES et al., 2012). Além disso, a doença tem grande impacto econômico e social por, muitas vezes, incapacitar indivíduos em idade produtiva e gerar gasto monetário adicional para o sistema de saúde, sendo estimado dispêndio de quase 200.000 dólares durante os primeiros dois anos após a lesão, quando incluídos o atendimento domiciliar, serviços médicos e complicações secundárias (JOHNSON et al., 1996).

Na medicina veterinária, o trauma medular é um dos problemas neurológicos mais comuns em animais domésticos, apesar de sua incidência real não ser bem documentada (Braund, 2003). Estão comumente associados a acidentes e quedas, além de alterações degenerativas do disco intervertebral. O trauma medular pode ocasionar disfunções e complicações em diversos órgãos e sistemas, causando impacto na vida de indivíduos por meio de déficits neurológicos graves e de longa duração (Araújo, 2005; Hagg e Oudega, 2006). Assim como na medicina humana, a principal causa de lesão medular nos cães e gatos são os traumas, sobretudo devido a atropelamentos (66%), violência (9%) e quedas (7%) (FIGHERA et al., 2008; MENDES; ARIAS, 2012).

Há décadas, a fisiopatologia e a terapia das lesões medulares têm sido muito pesquisadas, existindo um profundo interesse em reconhecer e entender os diferentes mecanismos de degeneração e reparo dos tecidos neuronais, o que pode favorecer os resultados benéficos na recuperação do paciente (DRUMMOND et al., 2010). Dessa forma, as diferentes terapias se concentram na inibição da cascata de eventos desencadeados logo após o trauma medular (OYINBO, 2011; JIA et al., 2013).

O trauma medular tem adquirido grande importância devido ao fato do sistema nervoso central, diferente do sistema nervoso periférico, apresentar alterações irreversíveis que vão impedir o restabelecimento do tecido neuronal lesado (BANDTLOW, 2000). Quando ocorre uma lesão medular, o dano inicial localiza-se no epicentro levando a uma deformação secundária e compressão persistente, o que desencadeará interrupção dos axônios, da microvasculatura e das membranas celulares, o que levando a morte celular primária com alterações vasculares progressivas dando início a lesão medular secundária (BALLESTEROS et al., 2012).

Os eventos fisiopatológicos no trauma medular secundário existem três fases: fase aguda, fase subaguda e fase crônica. A fase aguda começa imediatamente após o trauma e estende-se até sétimo dia após a lesão. Nessa fase, a injúria mecânica provoca hemorragia, redução no fluxo sanguíneo, o que posteriormente leva a necrose isquêmica e a falha da função neuronal. Além disso, iniciam-se a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o processo de ativação de células da micróglia e a migração de neutrófilos e monócitos para o foco da lesão. Na fase subaguda, que ocorre de sete a quatorze dias após o trauma, a reação inflamatória persiste e a produção de radicais livres aumenta consideravelmente. Essas alterações secundárias provocam peroxidação

lipídica, induzem apoptose em neurônios e oligodendrócitos, o que culmina com perda de tecido. Na fase crônica que se estende de duas semanas a meses após o trauma ocorre a formação de cicatriz glial e a degeneração dos axônios e suas bainhas de mielina. Portanto, uma característica importante da fisiopatogênica do trauma de medula espinhal é que a lesão final é bem maior do que a existente nas primeiras horas. Dessa forma, a instituição rápida do tratamento é essencial para interromper esses eventos secundários e limitar a perda de tecido (NOVIKOVA et al., 1996; POPOVICH et al., 1997; HWAN et al., 2006).

Os déficits neurológicos estão relacionados ao trauma inicial e, principalmente, à extensão das lesões secundárias neurodegenerativas que limitam o processo de regeneração. Dessa forma, as estratégias terapêuticas focam no combate à cascata de eventos secundários desencadeada logo após o trauma medular (OLIVEIRA, 2014). O influxo de cálcio intracelular é marcante na fisiopatogênica da lesão medular secundária, sendo importante via de morte neuronal (GREENBERG, 1997; MELO et al., 2013; OLIVEIRA, 2014) e importante alvo farmacológico na neuroproteção.

Estratégias farmacológicas neuroprotetoras vêm sendo desenvolvidas na tentativa de interromper ou reduzir a injúria secundária e com isso melhorar a função neurológica dos pacientes com TMA. Os agentes bloqueadores de canais para cálcio mostram-se com grande potencial na redução de injúrias cerebrais e medulares, por impedir o influxo exacerbado desse íon, e assim, prevenir a progressão da lesão secundária (CHOI, 1992; LANZ et al., 2000).

As conotoxinas ou conopeptídeos são formadas por 12 até 30 resíduos de aminoácidos, têm como alvo canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD), chamando atenção pela sua capacidade de diminuir os processos na cascata do trauma medular secundário (GARATEIX et al., 2003; ESSACK et al., 2012). As ômega-conotoxinas são específicas para CCVD, a alfa- e a psi-conotoxinas bloqueiam receptores nicotínicos causando o bloqueio neuromuscular, enquanto a mu- e delta-conotoxinas são seletivas para canais para potássio voltagem dependentes, todas aumentam a excitabilidade neuronal (OLIVEIRA, 2014). Além dessas, a gama-conotoxina inibe canais iônicos inespecificamente e a sigma-conotoxina antagoniza receptores de serotonina.

As ω -conotoxinas, provenientes de *Conus magus* e *Conus geographus*, mostraram-se valiosas na pesquisa para identificação dos subtipos de CCVD envolvidos em determinados processos celulares. Com essas descobertas, as conotoxinas tornaram-se alvos de terapias direcionadas contra dores crônicas, lesões isquêmicas cerebrais e medulares, algumas formas de epilepsia e ataxia. Ao antagonizar CCVD, mostraram também efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral (HILLYARD et al., 1992).

A MVIIC é uma toxina da família das ω -conotoxinas de caramujos marinhos da espécie *C. magus*, caçadores de peixes, constituída por 26 aminoácidos, primeiramente descrita por Hillyard e colaboradores, em 1992 (OLIVEIRA, 2012).

A ômega-conotoxina MVIIC é um bloqueador seletivo e reversível dos canais para cálcio voltagem dependente do tipo N e P/Q (LIU et al., 1996; SATO et al., 1997; McDONOUGH et al., 2002) e, por isso, consegue inibir a liberação de neurotransmissores que determinarão a progressão da lesão medular secundária (MINAMI et al., 2001). McDONOUGH e colaboradores (1996) relataram que o bloqueio do canal tipo N é potente, entretanto, rápido e reversível, enquanto do tipo P é potente e lentamente reversível. Isso justifica as contradições encontradas na literatura a respeito do bloqueio ou não dos canais do tipo N por essa toxina.

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos das doses de 15 e 30 pmol da ômega-conotoxina MVIIC cinco minutos e uma hora após do trauma medular agudo, pela via

intratecal por meio de avaliações clínica e laboratorial de toxicidade, classificação da locomoção em campo aberto, quantificação de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e avaliação da expressão gênica de fatores relacionados a apoptose.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.

- Avaliar o efeito da ômega-conotoxina MVIIC nas doses 15 e 30 pmol empregada nos tempos de 5 minutos e uma hora após o trauma medular agudo sobre a capacidade motora dos animais

2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar o trauma de medula espinhal com intensidade de leve a moderado por meio da queda da haste de uma altura de 12.5 mm com o emprego do aparelho MASCIS - *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*.
- Avaliar efeitos sistêmicos após aplicação da ômega-conotoxina MVIIC através de exames hematológicos (hemograma) e bioquímicos (ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)).
- Avaliar a ação da ômega-conotoxina MVIIC sobre a expressão gênica de fatores relacionados a apoptose Bax, Bcl-xl, caspase-8 e caspase-9 após o trauma medular agudo.
- Avaliar o efeito da ômega-conotoxina MVIIC na expressão de genes pro e anti apoptóticos, formação de EROs e liberação de radicais livres na medula espinhal através da técnica de PCR em tempo real, peroxidação lipídica por método TBARS e quantificação de espécies reativas de oxigênio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Fisiopatogênica do trauma medular

Na medicina veterinária é comum a lesão da medula espinhal em cães e gatos. Esse tipo de lesão medular pode ser causado por fatores extrínsecos, principalmente por atropelamento, quedas e brigas, sendo essas as principais causas (ACKERY et al., 2004; TALAC et al., 2004). Além disso, há lesões intrínsecas decorrentes de extrusão e protrusão do disco intervertebral, fraturas patológicas, anormalidades congênitas e instabilidade de vértebras (SEVERO; TUDURY; ARIAS, 2007).

Independente da causa inicial, o TMA resulta em mecanismos de lesão à medula espinhal, que podem ser divididos nas fases aguda, subaguda e crônica que se sobrepõem durante o desenvolvimento da lesão (Quadro 1) (CHACÓN; NIETO-SAMPIETRO, 2005; OYINBO, 2011). O trauma medular primário do tipo compressiva-compressiva é aquele em que acontece um deslocamento dos tecidos da coluna vertebral, fragmentos ósseos, disco intervertebral e ligamentos, transmitindo energia cinética-mecânica para medula espinhal (HAGG; ODUEGA, 2006). Além disso, outros mecanismos físicos como transecção, concussão, laceração, estiramento e movimentos de aceleração-desaceleração podem estar envolvidos na injúria à medula (SEKHON; FEHLINGS, 2001).

Na fase aguda do TM ocorre uma ruptura da barreira hematoencefálica e dos vasos sanguíneos locais imediatamente após o trauma ocasionando uma alteração na microvasculatura da substância cinzenta, induzindo hemorragias petequeais. As células sanguíneas e as proteínas do soro invadem a área lesada acarretando edema. A destruição dos capilares provoca isquemia, além de anóxia e hipoglicemia. A necrose e degeneração da mielina dos axônios lesados ocorrerão de oito a vinte quatro horas mais tarde. Após quarenta e oito horas do TM os fagócitos sanguíneos se acumulam no local para eliminar a mielina degenerada e outros debris celulares. As alterações no fluxo sanguíneo e a hipoperfusão pós trauma afetam principalmente a substância cinzenta o que vai induzir a morte neuronal primária (HOULE, 2003). Instala-se, em minutos, a fase subaguda ou lesão secundária, definida pela cascata de eventos secundários como alterações vasculares, edema, isquemia, excitotoxicidade, resposta inflamatória e produção de radicais livres, que podem levar à morte celular por necrose ou apoptose e ao impedimento da recuperação neurológica (SEKHON; FEHLINGS, 2001; CADOTTE; FENLINGS, 2011; JIA et al., 2013). Esses efeitos secundários determinam a perda progressiva de neurônios e oligodendrócitos próximo ao local da injúria, associada à desmielinização, reação astrocitária, proliferação da microglia e apoptose neural (McTIGUE, 2008; PATERNITI et al., 2009; SIMON et al., 2009; WEBB et al., 2010).

Quadro 1 - Principais eventos observados após lesão inicial.

TIPO DE LESSÃO	CARACTERÍSTICAS
Lesão primaria	<ul style="list-style-type: none"> - Morte celular pela lesão direta - Hemorragia - Isquemia - Edema - Desequilíbrio iônico - Acúmulo de neurotransmissores - Comprometimento de membrana plasmática - Vaso espasmo - Necrose
Lesão secundaria	<ul style="list-style-type: none"> - Morte celular pela lesão direta - Hemorragia - Isquemia - Edema - Desequilíbrio iônico - Acúmulo de neurotransmissores - Comprometimento de membrana plasmática - Vaso espasmo - Necrose - Progressão das alterações funcionais - Produção de espécies reativas de oxigênio - Peroxidação lipídica - Excitotoxicidade - Depleção energética e redução de ATP - Recrutamento e invasão de células imunológicas - Liberação de citocinas - Morte celular mediada por inflamação - Desmielinização de axônios sobreviventes - Apoptose
Lesão crônica	<ul style="list-style-type: none"> - Desmielinização de axônios sobreviventes - Apoptose - Cavitação central contínua - Continuidade de formação de cicatriz glial - Degeneração Walleriana - Estabilização da lesão - Processos neuroregenerativos

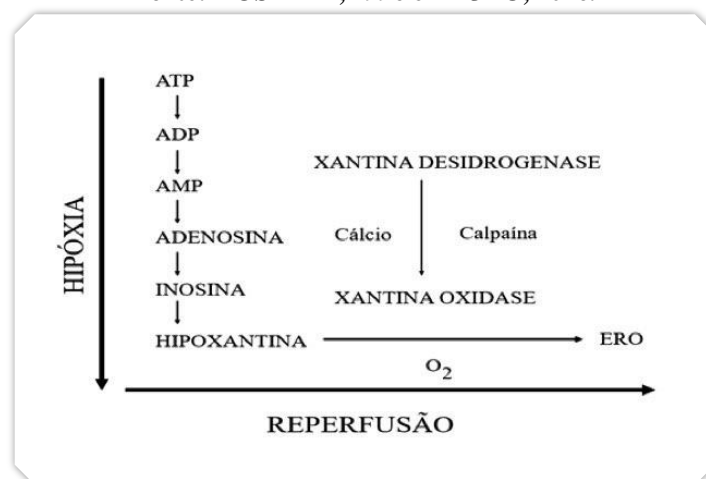
Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos de Hausmann (2003).

3.1.1 Produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) é parte integrante do metabolismo celular sendo uma condição fisiológica do organismo desempenhando um papel biológico como regulação do fluxo sanguíneo, regulação da expressão gênica, aumento da permeabilidade de Ca^{2+} e modulação do sistema imune sejam pela ativação de citocinas pró-inflamatórias ou na fagocitose (VASCONCELOS, 2007; BROOKES, 2008; ROWLAND et al., 2008). Na mitocôndria, não ocorre a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa, processo em que o oxigênio (O_2) é reduzido a H_2O . Em condições fisiológicas normais a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) geralmente é de 5%, porém, essa produção pode aumentar, quando a concentração de Ca^{2+} ou Na^+ aumenta subitamente como resposta a um evento excitotóxico. Um excesso de O_2 pode provocar a formação de muitas outras espécies reativas, incluindo os radicais hidroxila (OH) e radicais livres (RL) de peroxihidroxila (OH_2). Em pH fisiológico, o O_2 tende a dismutar-se formando H_2O_2 e oxigênio, através das diversas isoformas da superóxido dismutase (SOD). As concentrações H_2O_2 são mediadas pela catalase, enzima que encontra-se localizada nos peroxisomas, assim também pela glutatona peroxidase citosólica (SCHWAB, 2006).

Figura 1 – Representação esquemática de formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

Fonte: YOSHIDA, 1996 e RAJÃO, 2016.



O H_2O_2 não é um radical livre mas tem fácil difusão através das membranas biológicas semelhante ao O_2 , o que pode gerar um dano citotóxico em sítios distantes do local de sua geração. A reação destas moléculas tem sido descrita como Reação de Haber-Weiss, processo que favorece a produção do radical OH (Rowland et al., 2008). Há diversas vias de formação de ERO como ativação da cadeia respiratória mitocondrial, NADPH oxidase, reação de Fenton e xantina oxidase, sendo esta última considerada a via principal (RIBEIRO et al., 2005) (Figura 2).

Além disso, o estresse oxidativo também é capaz de alterar o metabolismo mitocondrial, gerar dano ao DNA e proteínas associadas, lise celular, alteração da homeostase do cálcio e inibir a bomba de sódio e potássio, contribuindo para a indução de colapso metabólico e consequente morte celular de neurônios e células da glia (CUZZOCREA et al., 2001).

Durante o processo isquêmico, ocorre aumento de cálcio intracelular secundário a uma alteração na bomba de cálcio, levando a ativação das proteases intracelulares moduladas pela calmodulina (principalmente a calpaína), que se encarregará de desdobrar a xantina desidrogenase em xantina oxidase, causando um acúmulo dessa enzima nas células. O consumo desta enzima se dá na presença de oxigênio e, é nesse momento que ela promove a oxidação da hipoxantina, produto do metabolismo da adenosina-trifosfato (ATP) que também se acumula na ausência de aporte de oxigênio. A reperfusão determina a oxidação da hipoxantina pela xantina oxidase e se tornando em ERO.

3.1.2. Excesso de cálcio intracelular

O cálcio é um mediador nos diferentes processos neuronais, como a liberação de neurotransmissores, transcrição gênica, proliferação celular, dentre outros. Sua concentração intracelular vai depender dos diferentes estímulos que acarretam seu influxo e liberação de reservas intracelulares (BERRIDGE, 1998; TRIGGLE, 2003; TERLAU; OLIVERA, 2004). Após lesão medular, ocorre o influxo exacerbado de Na^+ e Ca^{2+} pelos receptores ionotrópicos e metabotrópicos, além da entrada de Ca^{2+} pelos canais de cálcio voltagem dependente (CCVD) abertos com a despolarização da membrana. Na tentativa de interromper os potenciais eventos letais, o cálcio é sequestrado pela mitocôndria. Entretanto, o excesso de cálcio mitocondrial contribui para o início do apoptose pela formação de poros transitórios na membrana interna mitocondrial, e também pela geração de espécies reativas de oxigênio. Ocorre edemaciamento da mitocôndria com ruptura da membrana externa e liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c, fator indutor de apoptose, dentre outros que ativam caspases executoras, como caspase-3 e caspase-7 (BERRIDGE, 2002; HALL; SPRINGER, 2004; SULLIVAN et al., 2004; RUIZ et al., 2009; DECUYPERE et al., 2011).

Em condições normais, a associação da liberação das reservas internas de cálcio ao influxo através de canais ligados a receptores para glutamato tem a finalidade de amplificar a sinalização dependente de Ca^{2+} . Este processo está envolvido em funções fisiológicas dos neurônios, como transporte axonal e geração do potencial de ação (MORTON-JONES et al., 2008). Entretanto, o excesso de glutamato decorrente de trauma medular estimula a liberação de grandes quantidades de Ca^{2+} intracelular proveniente de reservas internas, o que pode determinar a morte celular por apoptose. Portanto, a apoptose é decorrente do esgotamento das reservas internas de Ca^{2+} , ou pela ativação de proteases e endonucleases que degradam alguns constituintes celulares (LAM et al., 1994; WANG et al., 2002; OUARDOUZ et al., 2003).

3.1.3. Excitotoxicidade

Além do aumento intracelular de Ca^{2+} , existe um aumento de Na^+ e Cl^- , que associado à saída de K^+ levam a morte celular por excitotoxicidade, sendo os oligodendrocitos os mais vulneráveis (SCHWAB, 2006; BAUCHET, 2009). O termo excitotoxicidade refere-se a ativação excessiva dos receptores pelo efeito de glutamato (Glu) e do ácido kainico (AK) que levam a um aumento do Ca^{2+} intracelular e ao início de uma cascata de eventos deletérios dependentes deste íon (KWON, 2005; SCHWAB, 2006).

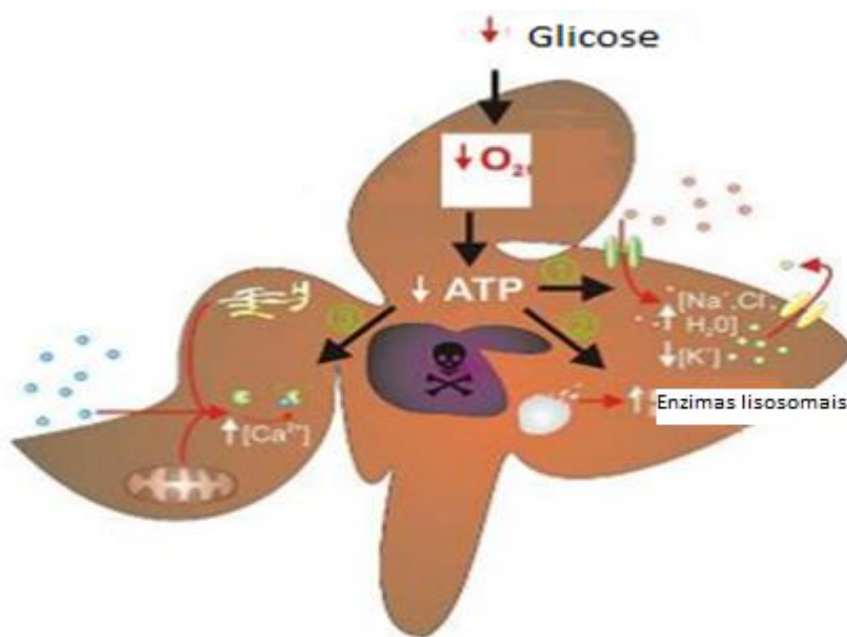
Na membrana plasmática, existem receptores para glutamato que são divididos em dois subtipos principais, os ionotrópicos (iGLUr) (N-metil-D-aspartato, NMDA; ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico, AMPA; e cainato) e metabotrópicos (mGLUr). Os iGLUr estão associados a canais iônicos e, quando estimulados, são permeáveis a cátions, como cálcio e

sódio. Os mGLUR estão acoplados à proteína G e ligados a um sistema de segundos mensageiros, ativando ou inibindo eventos de transdução do sinal celular. Com a ativação desses receptores, iniciam-se diversos processos celulares como aumento intracelular de cálcio, ativação da proteína quinase G, aumento da liberação de glutamato (KWON et al., 2004). O Glu é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso central (SNC), atua sobre os receptores, NMDA e o AMPA. A ativação dos receptores NMDA e AMPA também libera Ca^{2+} dos depósitos intracelulares (retículo endoplasmático), causando um aumento dentro do citosol e da mitocôndria. Este aumento do íon altera o metabolismo celular gerando disfunção mitocondrial, falha do metabolismo energético aeróbio, produção de óxido nítrico pela ativação da síntese constitutiva do óxido nítrico (SON) que é dependente do Ca^{2+} , além de enzimas como calpaínas, proteases (Figura 2) (TATOR, 1995; SPRINGER, 1999; KWON, 2004; SCHWAB, 2006).

Na excitotoxicidade, a liberação excessiva de glutamato leva ao rompimento da homeostasia do Ca^{2+} . O glutamato ativa receptores pós- sinápticos, incluindo receptores NMDA, AMPA e cainato. Após essa ativação, esses receptores permitem o influxo de Ca^{2+} e Na^{+} . O aumento excessivo de Ca^{2+} é produzido por essa ativação de receptores, principalmente através do receptor NMDA e, também, pela liberação de estoques internos e, portanto podem levar a perda dessa homeostasia e culminar em morte celular (CHOI, 1992), aumento da liberação de glutamato (HERRERO et al., 1994), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e isquemia secundária, os quais levam à morte celular (NAKAMURA et al., 1994; LIU et al., 1999; MILLS et al., 2001; BROUNS et al., 2009; OYINBO, 2011).

A liberação e o acúmulo de glutamato (Glu) e ácido kainico (AK) ocorrem rapidamente depois da lesão medular em resposta ao processo isquêmico e à despolarização da membrana celular. Durante este processo, níveis tóxicos destes neurotransmissores são atingidos 15 minutos após a lesão (WRATHALL, 2003).

Figura 2 - Mecanismo de falha energética e baixa síntese de ATP nas células neuronais da medula espinhal após TMA.



Fonte: PROFYRIS e COLS, 2004.

A cascata da morte celular é mediada por de 3 mecanismos: (i) perda da permeabilidade da membrana; (ii) liberação do conteúdo lisossomal intracelularmente iniciando autofagia e (iii) o incremento nos níveis de cálcio intracelular gerando ativação de proteases dependentes de cálcio (PROFYRIS e COLS, 2004).

3.1.4. Inflamação e resposta imunológica

Após um TMA, inicia-se uma resposta inflamatória caracterizada pela produção de diversas citocinas e quimosinas proinflamatórias sintetizadas pelas células endoteliais (Ebadi, 1995). Essas células aumentam a expressão de diversas moléculas de adesão, como as seletinas, as ICAM-1 e as VCAM (pelos seus acrônimos em inglês Intercelular Adhesión Molecule-1 e Vascular Cell Adhesion Molecule-1, respectivamente). Em poucos minutos, os neutrófilos se unem a estas moléculas através de seus receptores, iniciando-se a migração ao tecido lesionado (HAUSMANN, 2003), subsequentemente os macrófagos também iniciam a migração. Tanto os neutrófilos como os macrófagos realizam a fagocitose de detritos, desencadeando produção excessiva de RL e estresse oxidativo. Nas lesões medulares, no entanto, a resposta inflamatória apresenta, ao mesmo tempo, propriedades de neuroproteção e neurotoxicidade, contribuindo tanto para o reparo do tecido quanto para a progressão da lesão medular (FLEMMING et al., 2006). Após a lesão medular, o resultado secundário à resposta inflamatória pode derivar numa alteração na recuperação funcional causada pela formação de cicatriz glial e também pela morte de neurônios e células da glia desencadeada pelos processos de necrose e apoptose (HAUSMANN, 2003).

3.1.5. Morte celular: necrose e apoptose

Necrose e apoptose são duas formas distintas de morte celular, que provocam diferentes alterações nos tecidos adjacentes. O tipo de morte celular depende da intensidade e da duração de exposição aos insultos, e de sua interferência na função mitocondrial e no metabolismo energético celular. A necrose frequentemente ocorre quando as células sofrem injúrias física ou química intensas (WANG, 2000).

A morte celular por necrose ocorre pela transferência inicial de energia cinética do trauma para o tecido neuronal, onde o insulto ultrapassa a taxa celular de manutenção dos mecanismos da homeostase, resultando na edemaciação passiva das células, lesão de membrana e organelas, interrupção da produção de energia celular (ATP) e eventual ruptura da célula com liberação do conteúdo intracelular, que é capaz de gerar reação inflamatória local (KWON et al., 2004).

A apoptose é um mecanismo essencial durante o desenvolvimento do sistema nervoso central responsável pela eliminação de células excessivas. Entretanto, após o TMA, a apoptose tem-se mostrado como um fator importante na perda celular, sendo detectada de horas a semanas após a lesão em diversos tipos celulares como oligodendrócitos, neurônios, neutrófilos, microglia e macrófagos (HALL; SPRINGER, 2004). et al., 2003; DAS et al., 2005). Ela também é observada quando se tem uma grande redução no metabolismo celular e nas concentrações de ATP (SAKURAI et al., 2003). É um processo onde ocorre tumefação das células e de suas organelas, apresentando ruptura e extravasamento para o meio extracelular, resultando em infiltração local por células inflamatórias, que vão coadjuvar na expansão da lesão (ANKARCRONA, et al., 1995).

A apoptose é a morte celular programada que ocorre em condições fisiológicas, e é necessária para manter a população de células normais nos diversos tecidos. Entretanto, ela ocorre

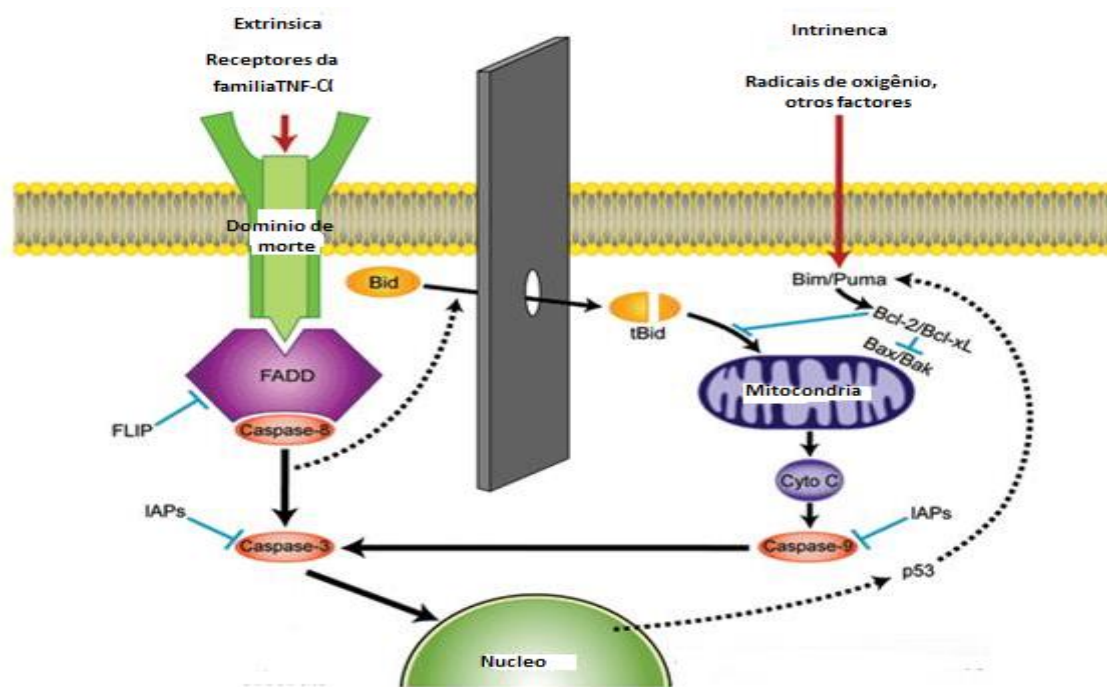
em condições patológicas como forma de mecanismo de defesa quando as células são danificadas por diferentes condições e fatores tóxicos (ASLAN et al., 2009). As caspases são as principais proteínas desencadeadoras de apoptose. Podem ser ativadas pela calpaína (RAY et al., 2003; DAS et al., 2005; COLAK et al., 2009), e pelas vias intrínseca e extrínseca. A calpaína é uma protease intracelular que é ativada pelo Ca^{2+} e degrada proteínas do citoesqueleto (LIU et al., 2002; DAS et al., 2005), de receptores de membranas (WANG, 2000) e da mielina, podendo provocar morte celular por necrose ou apoptose (RAY et al., 2003; COLAK et al., 2009). A mitocôndria exerce um papel fundamental na via intrínseca pois, na tentativa de controlar a homeostase do Ca^{2+} , ela retira o excesso desse íon do citoplasma, e com isso ele se acumula em seu interior, provocando despolarização de suas membranas (CARRIEDO et al., 2000; SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2003). Quando as concentrações de Ca^{2+} continuam elevando-se, e a despolarização torna-se persistente, ocorre abertura dos poros de permeabilidade das membranas (ANKARCORONA et al., 1995; KRUMAN; MATTSON, 1999), liberação de citocromo C no citoplasma, que ativa a caspase-9, e em seguida a caspase-3 (KRUMAN; MATTSON, 1999; WANG, 2000; LIU et al., 2002; SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2003). A caspase-3 é uma protease que degrada proteínas do citoesqueleto, enzimas, e proteínas relacionadas à reparação do DNA, desencadeando morte celular por apoptose (WANG, 2000; McEWEN; SPRINGER, 2005; COLAK et al., 2009).

A via extrínseca ocorre mediante ação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) que, ao se ligarem a seus receptores, ativam a caspase-8 e, em seguida a caspase-3, desencadeando a morte celular também por apoptose (GROSS et al., 1999). A abertura dos poros de permeabilidade, que estão diretamente envolvidos na apoptose, pode ser influenciada pelas proteínas da família BCL-2. Esta família é composta por proteínas pró-apoptóticas, como por exemplo a Bax (DARGUSCH et al., 2001), e anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e Bcl-xL (LAM et al., 1994; SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2003; LEE et al., 2008). As proteínas pró-apoptóticas localizam-se no citoplasma, e após serem ativadas sofrem alteração conformacional e ligam-se às membranas, especialmente da mitocôndria, onde atuam promovendo abertura dos poros de permeabilidade (GROSS, et al., 1999; DARGUSCH et al., 2001). Por outro lado, as anti-apoptóticas são encontradas nas membranas perinucleares do retículo endoplasmático e das mitocôndrias, onde exercem suas funções anti-apoptóticas através do bloqueio da abertura dos poros de permeabilidade na superfície da mitocôndria (Lee et al., 2008), da inibição da peroxidação lipídica (KRUMAN; MATTSON, 1999), e também pela redução na liberação de Ca^{2+} de reservas internas (LAM et al., 1994). Dessa forma, a proporção entre Bax e Bcl-2 ou Bcl-xL determina a ocorrência ou não de apoptose (GROSS et al., 1999; DARGUSCH et al., 2001; RAY et al., 2003).

A via intrínseca é ativada/regulada principalmente pela mitocôndria, havendo liberação de citocromo C e ativação de caspase-9 que, por sua vez, ativa a caspase-3 (KRAJEWSKI et al., 1999; PORTT et al., 2011). Em resposta, a mitocôndria envolve membros pro-apoptóticos da família Bcl-2 e, mais precisamente, elementos da sub-família BH3. Estas proteínas, que incluem a Bid, a Bim, a Harakiri, a Noxa, entre outras, possuem apenas um dos domínios de homologia (o BH3) característicos da família Bcl-2 (CANDE et al., 2002; SAELENS et al., 2004; PORTT et al., 2011). Em resposta a um estímulo, comprometem um outro conjunto de membros proapoptóticos, a sub-família da Bax, que inclui a Bax, a Bak e, provavelmente, a Bok, que normalmente se encontram fracamente associados à membrana externa da mitocôndria, prevalecendo maioritariamente no citosol (SAELENS et al., 2004). A interação entre proteínas das subfamílias BH3 e Bax leva à oligomerização dos elementos do último grupo, seguida de inserção na membrana externa da mitocôndria (GREEN, 1998; KAWAGUCHI et al., 2005). Estas moléculas passam, então, a constituir canais de saída de proteínas intermembranares, desde a mitocôndria até o citoplasma, incluindo o citocromo c e o factor indutor da apoptose. O citocromo

c, uma vez libertado, activa uma proteína citoplasmática designada de Apaf-1, a qual recruta e activa a pro-caspase-9, constituindo um complexo proteico denominado de apoptossoma (FULDA; DEBATIN, 2006). A caspase-9, na sua função de “caspase iniciadora”, irá requerer e activar a caspase-3 “executora”, a qual degradará proteínas importantes para a viabilidade celular e, também, outras caspases. As proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, bloqueiam a morte celular por prevenirem a libertação das proteínas intermembranares da mitocôndria. No entanto, uma vez ultrapassada a fase de morte celular que envolve este organito, as proteínas anti-apoptóticas deixam de ter qualquer efeito na inibição da apoptose (FULDA; DEBATIN, 2006). As proteínas pro-apoptóticas e as anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2, podem interactuar entre si através dos domínios de homologia BH, formando homo e heterodímeros e regular, assim, reciprocamente, as suas funções. Por outro lado, a função das “caspases executoras” também pode ser modulada por um outro tipo de proteínas, as IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), que se podem ligar à caspase-9 e inibir a sua actividade de protease, bloqueando a este nível o processo apoptótico (NAKAGAWA et al., 2000). Contudo, também a actividade destas proteínas pode ser regulada por uma outra proteína de nome duplo Smac/DIABLO, a qual, juntamente com o citocromo c, é libertada do espaço intermembranar da mitocôndria durante a apoptose. A Smac/DIABLO associa-se às IAPs e inibe a sua acção, permitindo a activação da caspase-9 a partir do complexo Apaf-1 e, conseqüentemente, favorecendo a apoptose (JURGENSMEIER et al., 1998; RIEDL; SHI, 2004; PORTT et al., 2011). (Figura 4).

Figura 3 – Esquema das vias de apoptose após trauma medular espinal.



Fonte: Adaptado de PROFYRIS e COLS, 2004.

A via receptor é desencadeada por membros da super-família de receptores de morte celular (tal como CD95/Fas/Apo-1). Ligantes específicos sinalizam agregação e formação de um

complexo indutor de morte, que recruta pró-caspases através de proteínas de domínio de morte associada ao receptor. A via mitocondrial é frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros pró e anti-apoptótico da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Este associa-se com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose.

3.1.6. O papel do cálcio no trauma medular.

O cálcio é um sinalizador celular importante que regula diversos processos neuronais, como a liberação de neurotransmissores, transcrição gênica, proliferação celular, entre outros. O seu nível intracelular é determinado pelo equilíbrio de sinais que determinam sua entrada (Berridge, 1998; Triggler, 2003; Terlau e Olivera, 2004). O influxo do cálcio, por sua vez, ocorre por CCVD ativados pela despolarização, canais para cálcio abertos por receptores glutamatérgicos, canais capacitativos operados por estoque e também pela mobilização das reservas intracelulares (Greenberg, 1997; Berridge, 2002; Ruiz et al., 2009).

Uma importante via de entrada do cálcio se dá principalmente pelos CCVD e representa um passo chave na regulação dos processos celulares (Uchitel, 1997), na excitabilidade celular, participando ativamente em processos neurodegenerativos agudos (Agrawal et al., 2000).

Os CCVD são proteínas heteroméricas que compõem o canal de transmembrana formado por subunidades α -1 e subunidades regulatórias (Lory et al., 1997). Foram identificados diferentes tipos, principalmente em tecidos excitáveis como músculos e neurônios, e classificados pelas propriedades eletrofisiológica e farmacológica (Terlau e Olivera, 2004). O tipo L (*long lasting*) é expresso em tecidos cardiovascular, endócrino e neural e está envolvido na contração muscular e liberação hormonal. O tipo N contém a subunidade α 1B, localizados em neurônios em terminação pré-sináptica (Dunlap et al., 1995; Greenberg, 1997). Os tipos P/Q contêm a subunidade α 1A, são intimamente relacionados e também se encontram na terminação pré-sináptica neuronal (Dunlap et al., 1995). Os tipos N e P/Q, encontrados em neurônios, estão envolvidos predominantemente com a liberação de neurotransmissores (Dunlap et al., 1995; Diaz e Dickenson, 1997). O tipo R é ativado por voltagens intermediárias (Uchitel, 1997) presente em corpos celulares e dendritos e o tipo T (transiente), expresso no músculo cardíaco e neurônio, diferem de outros subtipos de canais por ser ativado em baixa voltagem (Greenberg, 1997; Bingham et al., 2010).

Frente aos danos neurológicos, sejam eles degenerativos, isquêmicos ou traumáticos, uma das vias importantes que levam a morte celular é causada pelo aumento exacerbado do cálcio intracelular, que ocorre minutos após a injúria e perdura por até sete dias. A lesão neuronal libera grande quantidade de neurotransmissores excitatórios na fenda sináptica, em especial, o glutamato, elevando patologicamente o influxo de cálcio intracelular através dos CCVD do tipo N e P/Q, frente a despolarização da membrana, desencadeando uma cascata de eventos deletérios (Kobayashi e Mori, 1998; Scott et al., 1998). Esses receptores, particularmente importantes no TMA, são abundantemente expressos pelos neurônios da medula espinal, ressaltando-se que em maior quantidade os do tipo N (Uchitel, 1997) em astrócitos e oligodendrócitos na substância branca (Agrawal et al., 2000).

O acúmulo intracelular do cálcio desencadeia sérios danos incluindo disfunção mitocondrial que determina falha no metabolismo aeróbico, acúmulo de lactato e liberação de fatores apoptogênicos (Berridge, 2002; Ruiz et al., 2009; Decuypere et al., 2011); ativação da óxido nítrico sintetase (NOS) mitocondrial e citoplasmática com consequente produção de óxido nítrico; ativação da fosfolipase A2 que libera o ácido araquidônico e converte a ciclooxigenase (COX) em vasoconstritores e promotores de agregação plaquetária; ativação de calpaínas que levam a destruição do citoesqueleto, culminando em apoptose ou necrose neuronal (Hulsebosch, 2002; Hall e Springer, 2004).

3.2. Bloqueadores de canais de cálcio na neuroproteção.

Existem diferentes tipos tratamentos terapêuticos propostos para a lesão medular, ressaltam-se a utilização de anti-inflamatórios esteroidais (BARTHOLDI; SCHWAB, 1997; WEBB et al., 2010; ROSADO et al., 2014) e não esteroidais (GUTH et al., 1999), terapia celular (DASARI et al., 2007; CALDEIRA, 2011), bloqueadores de canais para sódio (SCHWARTZ; FEHLINGS, 2001; MARTINS, 2012) bloqueadores de canais para cálcio (REGAN; CHOI, 1994; LAVOR, 2013; OLIVEIRA et al., 2014) e anestésicos gerais (KAWAGUCHI et al., 2005; LAVOR et al., 2011; FUKUSHIMA, 2012; LAVOR, 2013). O conceito de neuroproteção é baseado na atenuação dos processos patofisiológicos, preservação da função axonal com consequente prevenção da morte celular, possibilitando, assim, maiores chances de recuperação clínica neurológica (KWON et al., 2005). Agentes farmacológicos vêm sendo testados no TMA, porém não demonstraram eficácia clínica significativa, como por exemplo ômega-conotoxinas MVIIA e MVIIC, ziconotide, dantrolene, riluzol e Ph α 1 β metilprednisolona, gangliosídeos, naloxona, hormônio liberador de tireotropina, nimodipina, entre outros (ROWLAND et al., 2008).

Uma estratégia neuroprotetora importante é o bloqueio de canais para cálcio voltagem dependentes (IMAIZUMI et al., 1999), por estar envolvidos em processos celulares, como liberação de neurotransmissores (SNUTCH et al., 2001). A classe da subunidade α -1 é o principal alvo dos bloqueadores de canais para cálcio, que podem ser subdivididos em inorgânicos, orgânicos pequenos e peptídeos de toxinas. Os bloqueadores inorgânicos incluem íons divalente e trivalente como níquel e cádmio, que são utilizados como ferramentas de pesquisas, mas pouco práticos para uso clínico. Os bloqueadores orgânicos pequenos como diidropiridina, fenilalquilaminas e benzodiazepinas que bloqueiam os canais do tipo L, são prescritos para doenças cardiovasculares e enxaquecas e participam pouco na liberação de neurotransmissores (DIAZ & DICKENSON, 1997). Além disso, os canais do tipo N e P/Q são insensíveis aos clássicos antagonistas, mas podem ser bloqueados seletivamente (SU et al., 2008) por peptídeos de toxinas isolados de aranhas e caramujos marinhos, que são prescritos para dores neuropáticas (SNUTCH et al., 2001; CAMERINO et al., 2007) pequenos como diidropiridina, fenilalquilaminas e benzodiazepinas que bloqueiam os canais do tipo L, são prescritos para doenças cardiovasculares e enxaquecas e participam pouco na liberação de neurotransmissores (DIAZ; DICKESON, 1997). Além disso, os canais do tipo N e P/Q são insensíveis aos clássicos antagonistas, mas podem ser bloqueados seletivamente (SU et al., 2008) por peptídeos de toxinas isolados de aranhas e caramujos marinhos, que são prescritos para dores neuropáticas (SNUTCH et al., 2001; CAMERINO et al., 2007).

Desde a descoberta de que há interação de toxinas com os CCVD, o seu uso nas afecções neurológicas vem sendo investigado (OLIVERA et al., 1994; GREEBBERG, 1997). Ressalta-se que na medula espinal, os canais do tipo N são os mais abundantes com grande participação na liberação dos neurotransmissores e um papel chave na excitotoxicidade (WRIGHT; ANGUS, 1996; KOCHEGAROV, 2003). Já os bloqueadores tipo P e Q estão presentes na medula

(WRIGHT; ANGUS, 1996) e, o primeiro induz uma resposta discreta quando utilizado na injúria medular (DIAZ; DICKENSON, 1997).

3.3. Toxina ômega-conotoxinas MVIIC

Nos últimos anos, pesquisas estão sendo realizadas para identificação de peptídeos neuroativos e neuroprotetores derivados de diferentes espécies venenosas que possam ser aplicados clinicamente. Em especial, as toxinas têm sido utilizadas como ferramentas de pesquisas, moduladores e reguladores da hiperexcitabilidade devido à alta seletividade dos venenos a diversos receptores e canais iônicos, (RAJENDRA et al., 2004). A toxina de caramujos marinhos, do gênero *Conus*, vem sendo extensamente estudada por ter ações específicas em canais iônicos e em receptores para neurotransmissores (UCHITEL, 1997; KAPOOR, 2010). Eles são predadores de águas tropicais e subtropicais e suas toxinas são investigadas para o tratamento de epilepsia, dor crônica (BOWERSOX et al., 1996), doenças cardiovasculares, psiquiátricas e desordens locomotoras (McINTOSH; JONES, 1996).

Há quase 30 anos, o primeiro componente ativo do veneno do gênero *Conus* foi caracterizado bioquimicamente, instigado pelo modo como esses animais paralisavam presas ao injetar o veneno. Estima-se que existam aproximadamente 500 espécies, que são classificadas em três grupos de acordo com o hábito alimentar: vermívoros, moluscívoros e piscívoros (SHEN et al., 2000). As espécies de caramujos marinhos com alvos já estabelecidos incluem *C. magus*, *C. aulicus*, *C. regius*, *C. purpurascens*, *C. imperialis* e *C. geographus* (OLIVERA & TEICHERT, 2007). A MVIIC é uma toxina da família das ω -conotoxinas de caramujos marinhos da espécie *Conus magus*, caçadores de peixes, constituída por 26 aminoácidos, primeiramente descrita por Hillyard e colaboradores, em 1992. Ela vem sendo estudada por ser um bloqueador reversível (McDONOUGH et al., 2002) dos canais para cálcio do tipo N e P/Q (LIU et al., 1996; SATO et al., 1997). McDonough e colaboradores (1996) relataram que o bloqueio do canal tipo N é potente, entretanto, rápido e logo reversível, enquanto do tipo P é potente e lentamente reversível. Isso justifica as contradições encontradas na literatura a respeito da toxina bloquear ou não os canais do tipo N, têm como alvo canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD), tornando-se objeto de pesquisa pela sua capacidade de reduzir o impacto da cascata de eventos na fase secundária do trauma medular (GARATEIX et al., 2003; ESSACK et al., 2012).

As ω -conotoxinas são específicas para CCVD, a alfa- e a psi-conotoxinas bloqueiam receptores nicotínicos causando o bloqueio neuromuscular, enquanto a mu- e delta-conotoxinas são seletivas para canais para potássio voltagem dependentes, todas aumentam a excitabilidade neuronal (OLIVEIRA, 2014). Além dessas, a gama-conotoxina inibe canais iônicos inespecificamente e a sigma-conotoxina antagoniza receptores de serotonina.

As ω -conotoxinas, provenientes de *C. magus* e *C. geographus*, mostraram-se valiosas na pesquisa para identificação dos subtipos de CCVD envolvidos em determinados processos celulares (HILLYARD et al., 1992). Com essas descobertas, as conotoxinas tornaram-se alvos de terapias direcionadas contra dores crônicas, lesões isquêmicas cerebrais e medulares, algumas formas de epilepsia e ataxia. Ao antagonizar CCVD, mostraram também efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral (HILLYARD et al., 1992). A MVIIC é uma toxina da família das ω -conotoxinas de caramujos marinhos da espécie *Conus magus*, caçadores de peixes, constituída por 26 aminoácidos, primeiramente descrita por Hillyard e colaboradores, em 1992 (OLIVEIRA, 2012). A ômega-conotoxina MVIIC é um bloqueador seletivo e reversível dos canais para cálcio

voltagem dependente do tipo N e P/Q (LIU et al., 1996; SATO et al., 1997; McDONOUGH et al., 2002) e, por isso, consegue inibir a liberação de neurotransmissores que determinarão a progressão da lesão medular secundária (MINAMI et al., 2001).

Ressalta-se que o uso do bloqueador de canal para cálcio de amplo espectro, como MVIIC, seja um melhor agente citoprotetor do que um tipo específico. Isso foi mostrado no estudo de isquemia cerebral, *in vitro*, onde a MVIIC mostra uma melhor resposta quando comparado a GVIA (MAROTO et al., 1996), apesar de possuir uma potência 100 vezes maior que a MVIIC (WRIGHT; ANGUS, 1996). Além disso, a MVIIC mostrou uma inibição significativa de neurotransmissor quando comparado com o uso da MVIIA (GAUR et al., 1994).

3.4. Estudo experimental das lesões medulares

Há décadas que estudos experimentais continuam buscando um melhor entendimento dos diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos imediatamente após o trauma medular, tendo como objetivo intervir com novas estratégias terapêuticas que consigam minimizar a lesão medular (WAXMAN; KOCSIS, 1997; DUMONT et al., 2002; HULSEBOSCH, 2002; CHUCKOWREE et al., 2004; KWON et al., 2005; THURET et al., 2006). Estudos pré-clínicos do TMA necessitam de modelo reprodutível, consistente, confiável e que mimetize as características do trauma em animais e humanos (TAOKA; OKAJIMA, 1998; HAUSMANN, 2003). O TMA experimental tem sido estudado em diferentes espécies como ratos, gatos, cachorros e macacos. O rato é a espécie mais amplamente utilizada com este fim, devido ao baixo custo, tamanho, acessibilidade (ROUSSOS et al., 2005) e capacidade de tolerar o rigor da experimentação (TAOKA& OKAJIMA, 1998).

Existem vários modelos experimentais utilizados para indução do TMA como a transecção medular (SIEGENTHALER et al., 2007) e os traumas contusivos (METZ et al., 2000) e compressivos (SILVA et al., 2008; LONJON et al., 2010; TORRES, 2010). Os modelos de compressão e contusão mimetizam de forma mais representativa as injúrias medulares que ocorrem em humanos (EPHRON et al., 2004), por isso são os mais utilizados. Possibilitam interferir nos processos iniciais seguidos ao insulto, os quais são muito diferentes daqueles realizados na injúria por laceração (BLIGHT, 2006). Acredita-se que esses modelos mimetizem de maneira representativa e induzam um tipo de lesão mais relevante e semelhante ao que ocorre na maioria das lesões (ROWLAND et al., 2008). Pesquisadores têm relatado o uso de um impactador controlado por computador. Apesar dos parâmetros serem controlados com maior precisão, o equipamento além de caro, é necessário treinamento para manuseá-lo (TALAC et al., 2004; BLIGHT, 2006).

As lesões devem ser produzidas obedecendo ao protocolo internacional MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study). Modelo que realiza contusões raquimedulares em diferentes níveis, o que determina o grau de gravidade (YOUNG, 2009). Este aparelho estereotáxico é conectado a um computador com software específico que registra a velocidade de queda da haste sobre a medula, o momento do impacto e o grau de compressão sofrida pela medula espinhal, diminuindo, portanto, a variabilidade do trauma entre os animais (GRUNER, 1992; BASSO et al., 1996), permitindo a execução de estudo confiável. Apresenta padrões pré-estabelecidos de anestesia, cirurgia, trauma, cuidados e avaliações pós-operatórias, relatados por Young (2009). Os níveis de

lesão variam de 6 mm de altura o que é considerada uma lesão leve, até 70 mm de altura, que simula lesão gravíssima. Foram realizadas lesões intermediárias de 12,5 mm representando lesão leve, 25 mm lesão moderada e 50 mm de altura representado lesão grave (RODRIGUES et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Minas Gerais (IEP-SCBH), seguindo os princípios éticos preconizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (projeto aprovado sob protocolo 075/10, em anexo).

4.1. Animais

Foram utilizados 36 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, de aproximadamente três meses de idade, com peso médio de 350 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Foram mantidos no Centro Experimental da EV/UFMG, acondicionados em caixas plásticas de dimensões 17cm x 41cm x 33cm, forradas com maravalha, com três ratos cada. Os animais foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (07:00 – 19:00), em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) receberam ração comercial para roedores¹.

Os animais permaneceram 14 dias para desverminação com tiabendazol (100 mg/kg por via oral) e aclimação ao local, manejo do experimentador e estímulo à movimentação em campo aberto. Durante todo o período experimental, receberam ração comercial para roedores e água *ad libitum*.

4.2. A toxina MVIIC

A ω -conotoxina MVIIC foi cedida pelo professor Marcus Vinícius Gomez da Faculdade de Medicina da UFMG com apresentação comercial liofilizada, (Latoxan, França), na dose de 100 μg . A toxina foi suspensa em solução de PBS estéril e o volume ajustado para 30 pMol/ μL e 15 pMol/ μL , em tubos de plástico siliconizados, e conservada em freezer (-20°C) até o momento da aplicação.

4.3. Grupos experimentais

Após período de adaptação, os 36 animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos experimentais: controle negativo (CN), controle positivo (CP), ω -conotoxina MVIIC na dose de 15 pmol após 5 minutos (MVIIC 15-5), ω -conotoxina MVIIC na dose de 15 pmol após 60 minutos (MVIIC 15-60), ω -conotoxina MVIIC na dose de 30 pmol após 5 minutos (MVIIC 30-5) e ω -conotoxina MVIIC na dose de 30 pmol após 60 minutos (MVIIC 30-60).

G1: grupo controle negativo (CN) (n=6) – os animais foram submetidos à laminectomia no segmento T12 e a medula espinhal foi mantida exposta durante 5 minutos. Uma hora após o

¹ Nuvilab® CR-1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo-PR, Brasil.

trauma, os animais receberam 10 µL de PBS estéril por via intratecal. A eutanásia foi realizada 48 horas após o fim da intervenção cirúrgica.

G2: grupo controle positivo (CP) (n=6) – os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo provocado pelo dispositivo de trauma MASCIS Impactor. Uma hora após o trauma, os animais receberam 10 µL de PBS estéril por via intratecal. A eutanásia foi realizada 48 horas após o trauma medular.

G3: grupo ω-conotoxina MVIIC 15 pmol (MVIIC15-5) (n=6) – os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo provocado pelo dispositivo de trauma MASCIS Impactor. Cinco minutos após o trauma, os animais receberam 15 pmol da ω-conotoxina MVIIC diluídos em PBS estéril, com volume final de 10 µL da solução por via intratecal. A eutanásia foi realizada 48 horas após o trauma medular.

G4: grupo ω-conotoxina MVIIC 15 pmol (MVIIC15-60) (n=6) – os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo provocado pelo dispositivo de trauma MASCIS Impactor. Uma hora após o trauma, os animais receberam 15 pmol da ω-conotoxina MVIIC diluídos em PBS estéril, com volume final de 10 µL da solução por via intratecal. A eutanásia foi realizada 48 horas após o trauma medular.

G5: grupo ω-conotoxina MVIIC 30 pmol (MVIIC30-5) (n=6) – os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo provocado pelo dispositivo de trauma MASCIS Impactor. Cinco minutos após o trauma, os animais receberam 30 pmol da ω-conotoxina MVIIC diluídos em PBS estéril, com volume final de 10 µL da solução por via intratecal. A eutanásia foi realizada 48 horas após o trauma medular.

G6: grupo ω-conotoxina MVIIC 30 pmol (MVIIC 30-60) (n=6) – os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo provocado pelo dispositivo de trauma MASCIS Impactor. Uma hora após o trauma, os animais receberam 30 pmol da ω-conotoxina MVIIC diluídos em PBS estéril, com volume final de 10 µL da solução por via intratecal. A eutanásia foi realizada 48 horas após o trauma medular.

4.4. Procedimentos anestésico e cirúrgico e cuidados pós-operatórios

Após pesagem dos animais, foi realizada antibioticoprofilaxia com cefalotina sódica² (60 mg/kg via IM), medicação pré-anestésica e analgesia com sulfato de morfina³ (5 mg/kg via IM), 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. Em seguida, a indução anestésica foi realizada em câmara com isoflurano⁴ e a manutenção do plano anestésico cirúrgico realizada por máscara facial com o mesmo agente anestésico. Durante o procedimento, os ratos foram mantidos aquecidos a 38°C por meio de uma plataforma aquecida, sendo monitorada a temperatura corporal através de termômetro retal.

Após a tricotomia e anti-sepsia da região dorsal do tronco com iodopovidona degermante e álcool iodado, os ratos foram posicionados no dispositivo indutor de trauma da medula espinhal MASCIS Impactor. Foi realizada a osteotomia do processo espinhoso e da lâmina dorsal de T12, seguida da remoção da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico⁵ sob irrigação intermitente com solução fisiológica⁶ e, com auxílio de pinça hemostática de Halsted para remoção da

² Keflin® - ABL, Antibióticos do Brasil Ltda. Cosmópolis, SP, Brasil.

³ Dimorf® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁴ Isoflurane – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁵ With ECCOS® Aesculap – Laboratórios B. Braun S.A. São Gonçalo, RJ, Brasil.

⁶ Cloreto de sódio 0,9%, Laboratório Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG, Brasil.

cortical interna realizou-se a exposição do segmento medular. O trauma mecânico foi causado por queda da haste de impacto a 12.5 mm de altura, caracterizando uma lesão moderada segundo Santos et al., (2011).

O dispositivo é conectado ao computador no *Software Impactor 7.0*, que exibe as curvas de trajetória de impacto por meio de sensores do aparelho, apontando possíveis erros de velocidade, tempo e altura de queda. Para o presente estudo foram aceitos animais com erro máximo de 5% durante a indução do trauma.

Realizou-se a aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto empregando-se suturas padrão Reverdin e simples contínua, respectivamente, ambas com fio inabsorvível sintético nylon 2-0⁷. A dermorrafia foi realizada com sutura padrão simples separados utilizando-se o mesmo fio. Durante todo o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos aquecidos por meio de bolsa térmica aquecida.

Após a cirurgia, todos os animais receberam solução fisiológica, na taxa de manutenção (15 mL/kg), via subcutânea (SC). Os animais foram mantidos em caixas aquecidas por meio de cobertores e colchão térmico, com oxigenoterapia até completa recuperação anestésica. No pós-cirúrgico, foi realizada analgesia com sulfato de morfina (5 mg/kg) via IM a cada 8 horas, antibioticoterapia com cefalexina (30mg/kg, VO) a cada 12h, além de massagem vesical duas vezes ao dia para esvaziamento da bexiga até a eutanásia dos animais.

4.5. Tratamentos

A aplicação intratecal foi realizada de acordo com o método previamente descrito para ratos por Mestre et al. (1994). Uma hora após o procedimento cirúrgico, os animais do grupo CN e CP (após laminectomia) receberam 10 µL de PBS por via intratecal com auxílio de seringa de Hamilton 701LT⁸ acoplada a agulha 26⁹.

Os animais dos grupos MVIIC 15-5, MVIIC 15-60, MVIIC 30-5 e MVIIC 30-60 receberam, respectivamente, 15 pmol, 5 minutos após o trauma, 15 pmol, 60 minutos após o trauma, 30 pmol, 5 minutos após o trauma e 30 pmol, 60 minutos após o trauma da ω -conotoxina MVIIC diluídos em PBS estéril no volume final de 10 µL por via intratecal com auxílio de seringa de Hamilton.

⁷ Fio de sutura agulhado Nylon 2-0 – Procure, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

⁸ 10 microl, Model 701 LT SYR – Hamilton Company, Reno, NV, USA.

⁹ Agulha descartável 26G – BD Biosciences Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

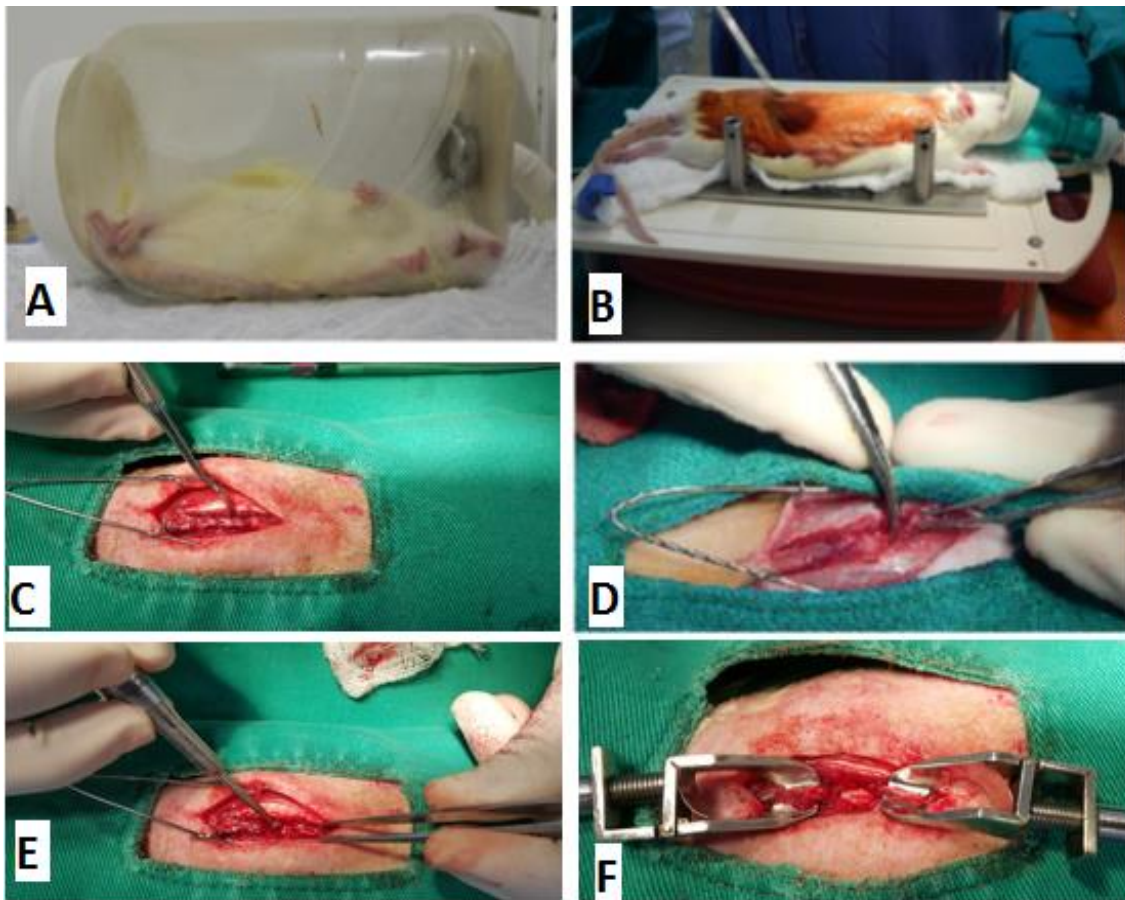


Figura 4 – Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. **A)** Indução anestésica com isoflurano. **B)** Animal posicionado em decúbito esternal. Realização de antissepsia com iodopovidona degermante em região dorsal do tronco tricotomizada. **C)** Afastamento da musculatura epaxial e identificação dos processos espinhosos. **D)** Ostectomia do processo espinhoso com pinça de Halsted. **E)** Desgaste da lâmina dorsal com drill pneumático. **F)** Visualização da medula espinhal após laminectomia dorsal. **G)** Utilização do sistema de estabilização vertebral “clamping system”.

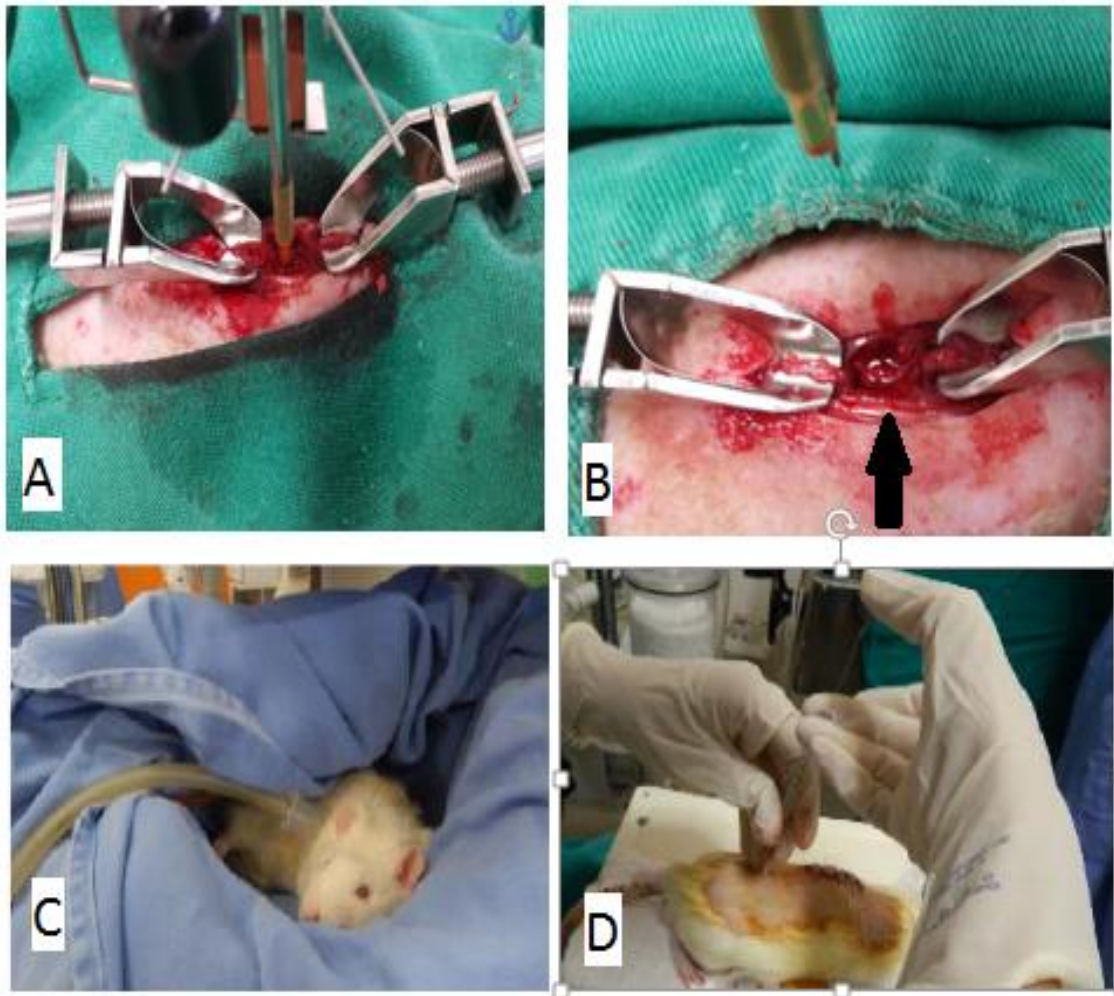


Figura 5 – Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental, recuperação anestésica e aplicação intratecal. **A)** Animal posicionado no aparelho indutor de trauma espinhal Mascis Impactor. Processos espinhosos de T10 e T12 individualizados, haste de impacto do aparelho tocando a medula na região de laminectomia dorsal (T11). **B)** Hemorragia sub-aracnóidea (seta) após trauma medular por queda de haste a 12.5 mm de altura. **C)** Recuperação anestésica em caixa individual com oxigenoterapia e aquecimento por colchão. **D)** Aplicação intratecal realizada por meio de punção do espaço subaracnóide entre a quinta e sexta vértebras lombares por seringa de Hamilton 10 microlitros.

4.6. Avaliação dos efeitos colaterais

A ω -conotoxina MVIIC foi avaliada a partir da análise de parâmetros sistêmicos como perfil hematológico, bioquímico e urinálise. Para a realização das avaliações sanguíneas foram coletados 3,0 mL de sangue no dia da eutanásia, por cardiopunção. Metade desse volume foi acondicionada em frasco com EDTA e o restante em tubo sem conservantes. A avaliação hematológica foi realizada em contador eletrônico. O volume globular foi determinado utilizando centrífuga pela técnica do microhematócrito e quantificação em tabela padrão. A dosagem de proteínas totais foi estimada por refratômetro analógico portátil. No perfil bioquímico, para avaliação da função hepática, foram dosadas no soro fosfatase alcalina (FA), aspartato

aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Todas as avaliações de toxicidade foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Escola de Veterinária da UFMG.

A avaliação dos efeitos colaterais da aplicação da ω -conotoxina MVIIC teve início um dia antes do procedimento cirúrgico para condicionamento dos animais, além de observação e acompanhamento nas primeiras cinco horas após a aplicação da toxina e diariamente (no momento da avaliação locomotora em campo aberto) até o dia da eutanásia.

4.7. Avaliação da capacidade motora em campo aberto

Vinte e quatro horas antes do procedimento cirúrgico, todos os animais foram adaptados em um campo aberto de um metro de diâmetro e 20 cm de altura, para reduzir o estresse da manipulação e facilitar as avaliações pós-operatórias. Neste momento, foi realizada a primeira avaliação neurológica, que foi repetida 24 e 48 horas após o trauma, esta última imediatamente antes de cada eutanásia. Todos os animais foram observados e filmados durante quatro minutos e, posteriormente os vídeos foram assistidos por dois avaliadores sem conhecimento do grupo a que os animais pertenciam. De acordo com a escala proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (BASSO et al., 1995), cada animal recebeu um escore, que variou de 0 a 21(Quadro 2). Esta avaliação foi realizada principalmente para certificar que o trauma foi bem sucedido nos grupos, uma vez que a eutanásia ocorreu em um tempo precoce e provavelmente os animais não tiveram tempo de obter recuperação neurológica clínica.

Quadro 2 – Características de deambulação de membros pélvicos (MPs) e seus respectivos escores segundo avaliação de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação de capacidade motora em ratos após trauma medular torácico agudo.

Escores	Descrição
0	Nenhum movimento de membros pélvicos (MP) observado.
1	Movimento suave de uma ou duas articulações, geralmente quadril e joelho, menor que 50% da movimentação normal.
2	Movimento amplo de uma articulação ou movimento amplo de uma articulação e discreto de outra, maior que 50% da movimentação normal.
3	Movimento amplo de duas articulações do MP, geralmente quadril e joelho.
4	Movimento suave de três articulações do MP, geralmente quadril, joelho e tornozelo.
5	Movimento suave de duas articulações e amplo de uma terceira, geralmente tornozelo.
6	Movimento amplo de duas articulações e suave de uma terceira.
7	Movimento amplo de três articulações.
8	Movimentos suaves ou posicionamento plantar da pata sem suporte do peso.
9	Posicionamento plantar da pata com suporte do peso em um único momento ou suporte de peso na passada dorsal ocasional (<50%), frequente (51-94%) ou constante (95-100%) sem passada plantar.
10	Suporte de peso corporal ocasional (<50%) na passada plantar, sem coordenação dos membros torácicos (MT) e pélvicos.

11	Suporte de peso frequente (51-94%) a constante (95-100%) na passada plantar e sem coordenação dos MT e MP.
12	Suporte de peso frequente (51-94%) a constante (95-100%) na passada plantar e ocasional (<50%) coordenação dos MT e MP.
13	Suporte do peso frequente (51-94%) a constante (95-100%) na passada plantar e frequente (95-100%) coordenação dos MT e MP.
14	Suporte de peso constante (95-100%) na passada plantar e constante coordenação dos MT e MP; e predominante posição em rotação das patas (interna ou externa) no contato inicial com a superfície ou exatamente antes de levantá-la; ou passada plantar frequente (51-94%), constante (95-100%) coordenação dos MT e MP e passada dorsal ocasional (<50%).

Escores	Descrição
15	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e frequente (51-94%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro.
16	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e frequente (51-94%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro; patas estão paralelas no contato inicial e rotacionadas ao se levantar.
17	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e frequente (51-94%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro; predominante posicionamento da posição das patas paralelas no contato inicial e ao levantar-se.
18	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e constante (95-100%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro; as patas estão paralelas no contato inicial e rotacionadas ao se levantar.
19	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e constante (95-100%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro; predominante posicionamento da posição das patas paralelas no contato inicial e ao levantar-se; e a cauda mantém-se caída parte ou todo o tempo.
20	Passada plantar e coordenação constantes (95-100%) durante o andar; constante arrastar dos dedos; constantes movimentos sem arrastar os dedos; posição das patas paralelas no contato inicial e ao levantar-se; cauda constantemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar e coordenação constantes (95-100%) durante o andar; constante arrastar dos dedos; constantes movimentos sem arrastar os dedos; posição das patas estão paralelas durante estação; cauda constantemente elevada e estabilidade constante do tronco.

Fonte: Adaptado de Basso, Beattie e Bresnahan (1996).

4.8. Eutanásia e coleta de materiais

Apos quarenta e oito horas do procedimento cirúrgica, os animais foram eutanasiados com 2 ml de lidocaína e sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg)¹⁰, por via intraperitoneal. Foram coletados aproximadamente 3,0 mL de sangue por cardiopunção, dos quais 1,0 mL foi acondicionado em frasco com EDTA¹¹ para realização de análises hematológicas e o restante em tubo siliconizado sem anticoagulante¹² para avaliação da bioquímica plasmática. Foi feita a dissecação da coluna espinhal, para coleta de dois segmentos medulares: o primeiro, de 1,5 cm, o qual foi dividido em dois fragmentos de 0,75 cm cada um caudal ao epicentro da lesão ou região de laminectomia (foi feito em todos os grupos), que foi acondicionado em tubos plásticos siliconizados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos no freezer a – 80 ° C até o processamento para análises de quantificação de EROs e avaliação de peroxidação lipídica, e o segundo, de 1,5 cm, o qual também foi dividido em dois fragmentos de 0,75cm cada um, foi acondicionado em tubos plásticos siliconizados livres de RNase/ DNase e imediatamente congelado a – 80 ° C até o processamento para avaliação de expressão gênica de fatores relacionados à apoptose por qRT-PCR em tempo real.

4.9. Avaliação hematológica e bioquímica plasmática

A avaliação hematológica foi realizada em contador eletrônico¹³. O volume globular foi determinado utilizando centrifuga¹⁴ para técnica do microhematócrito e quantificação em tabela padrão. Os esfregaços sanguíneos foram realizados em lâminas de vidro e corados com panótico rápido¹⁵ para contagem diferencial de leucócitos e plaquetas e a dosagem de proteínas totais foi estimada por refratômetro analógico portátil (MASTER- α).

No perfil bioquímico, para avaliação da função hepática, foram dosadas fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro, e para função renal, avaliou-se a concentração de uréia e creatinina, utilizando-se aparelho analisador bioquímico¹⁶, seguindo protocolo de *kits* comerciais¹⁷. Todas as avaliações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da EV/UFMG.

4.10. Avaliação das espécies reativas de oxigênio

A quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada através da técnica de diclorofluoresceína-diacetato (DCHF-DA). Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCHF-DA e sua oxidação subsequente por EROs, gerando um composto altamente fluorescente que é considerado indicador da produção de peróxido pelos componentes celulares (Jakubowski e Bartosz, 2000). Para a determinação das espécies reativas de oxigênio (ERO's) foi utilizado o indicador fluorescente 2' 7'- diclorofluoresceína diacetato (DCHF-DA, Sigma) pela técnica de espectrofluorimetria. O DCHF-DA é uma molécula que atravessa membranas celulares por difusão passiva. Uma vez no interior da célula, a DCHF-DA sofre

¹⁰ Thiopentax, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil.

¹¹ Tubo para coleta de sangue a vácuo K3 EDTA, Labor Import, Osasco, SP, Brasil.

¹² Tubo para coleta de sangue a vácuo siliconizado, Labor Import, Osasco, SP, Brasil

¹³ Diatron® - Abacus Junior Vet / CELM DA-500® - CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri, SP, Brasil.

¹⁴ Micro Spin, Biosan, Belo Horizonte-MG, Brasil.

¹⁵ Panótico rápido LB, Laborclin produtos para laboratório Ltda, Pinhais-PR, Brasil.

¹⁶ Bioclin®, Quibasa Química Básica, Belo Horizonte-MG, Brasil.

¹⁷ Perkin- Elmer.

desacetilação por enzimas esterases não específicas gerando o composto DCHF. A DCHF desacetilada perde então a propriedade de se difundir para fora da célula e ficando assim confinada no espaço intracelular. Após a desacetilação, a DCHF sofre oxidação por espécies reativas de oxigênio, ROS formando o composto DCF, cuja intensidade de fluorescência é maior que a do seu par (DCHF) não oxidado. O ensaio para avaliar a lipoperoxidação foi realizado de acordo com a metodologia descrita Ohkawa e cols, 1979. A lipoperoxidação foi determinada pela quantificação do conteúdo de malonaldeído presente no sobrenadante do homogenato, por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico em altas temperaturas. O conteúdo de MDA foi medido no comprimento de onda de 532 nm. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi incubado 500 µL de tampão de ácido acético pH 3.4, 200 µL de solução de SDS 8,1%, 100 µL de água e 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,8%; por 90 min a 95°C. A leitura espectrofotométrica foi realizada após o esfriamento das amostras. Os resultados não foram normalizados pelo teor de proteína.

Esquema 2- Mecanismo de ação do DCHF-DA.



Fonte: Adaptado de Loetchutinat et al. (2004).

4.11. Peroxidação lipídica por método TBARS

A lipoperoxidação foi determinada pela quantificação do conteúdo de malondialdeído (MDA) presente no sobrenadante do homogenato, por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico (TBARS) em altas temperaturas. Este método consiste na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea que é quantificado no espectrofotômetro a 535 nm. Para determinação da peroxidação lipídica por método TBARS, preparou-se solução “mix” contendo 200 µL de solução TBA 0,8%, 200 µL de tampão ácido acético e 40 µL de água por amostra. Foram pipetados 440 µL desse mix para cada Eppendorf, adicionou-se 80 µL de sobrenadante (S1) e, por último, foram adicionados 80 µL de solução SDS 8,1%. Realizou-se incubação das amostras a 95°C, por uma hora. O conteúdo de MDA foi mensurado a partir da leitura da absorbância das amostras a 532 nm em espectofotômetro e os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

4.12. Teor de proteína pelo método de Bradford

O teor de proteína foi determinado pelo método de Bradford, com as leituras realizadas a 595 nm (BRADFORD, 1976) e o limite de detecção é de $2 \times 10^{-5} \text{mg.L}^{-1}$ (WILSON & WALKER, 1995). Neste método, ocorre ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular, ou seja, de 8-9 ligações peptídicas no mínimo. A ligação ocorre em dois minutos e permanece por aproximadamente duas horas (BRADFORD, 1976). Segundo Zaia et al (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. Um volume de 5,0 µL do sobrenadante (S1) foi utilizado para o ensaio. As amostras foram colocadas em tubos para microcentrifuga, adicionando-se 500 µL de NaCl 0,9% e 500 µL do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi incubada por 5 minutos, sob agitação, e então, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro ²³ no comprimento de onda de

595 nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva-padrão de BSA a 1,0 mg/mL contendo teores conhecidos de 1, 3, 5, 7 e 10,0 µg de albumina.

4.13. Avaliação da expressão gênica relativa de Bax, Bcl-xl, caspase-8 e caspase-9 por qRT-PCR em tempo real

Para avaliação da apoptose realizou-se a técnica de reação em cadeia polimerase qRT-PCR em tempo real para os genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Coletou-se segmento medular de 0,75 centímetro cranial ao epicentro da lesão. As amostras foram coletadas em criotubos RNAase e DNAase *free* que foram imediatamente congelados a – 80 °C para posterior processamento. Foram utilizados os *primers* das proteínas relacionadas a apoptose Bax¹⁸, caspase-8¹⁹, caspase-9²⁰ (pró-apoptóticas), Bcl-xl²¹, (antiapoptótica), e da proteína constitutiva beta-actina²², utilizada como normalizadora (“housekeeping gene”) (Tabela 1).

Tabela 1- Genes e sequências de nucleotídeos dos primeiros iniciadores para qRT-PCR em tempo real Bax.

Bax	F: CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC R: AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA
Bcl-xl	F: CCCCAGAAGAACTGAACCA R: AGTTTACCCCATCCCGAAAG
Caspase-8	F: TAAGACCTTTAAGGAGCTTCATTTTGA R: AGGATACTAGAACCTCATGGATTTGAC
Caspase-9	F: TGGAGGAGGCTGACCCGGCAA R: CCACAGCTCCGCGACTTGCA
Beta-actina	F: GCGTCCACCCGCGAGTACAA R: ACATGCCGGAGCCGTTGTC

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para extração do RNA adicionou-se, a cada amostra, 1 mL do reagente Trizol²³ e foi homogeneizada no aparelho Tissue Lyser II²⁴ na frequência de 20s por 4 minutos. Para separação de fases, após esse processo as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C para formação de três fases distintas. Para isolamento do RNA, a fase superior (aquosa)

¹⁸ Primer Bax F e Primer Bax R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁹ Primer Cas-8 F e Primer Cas-8 R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

²⁰ Primer Cas-9 F e Primer Cas-9 R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

²¹ Primer Bcl-xl F e Primer Bcl-xl R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

²² Primer Beta-act. F e Primer Beta-act. R – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

²³ Trizol – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

²⁴ Tissue Lyser II- Qiagen.

contendo o RNA foi transferida cuidadosamente para um novo tubo ao qual adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. Procedeu-se a incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e realizou-se centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartando-se todo o sobrenadante. Para lavagem e ressuspensão do RNA, adicionou-se 1,0 mL de etanol 75% e procedeu-se a centrifugação a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Todo o sobrenadante foi descartado, procedeu-se a secagem à temperatura ambiente por 10 minutos, realizou-se a ressuspensão do *pellet* de RNA em 80 µL de água ultra-pura RNase-free²⁵ e incubação em banho-maria a 55°C por 5 minutos. Utilizou-se uma amostra de 1,0 µL para quantificação de RNA no aparelho Nanovue plus²⁶, e o restante foi congelado a – 80 ° C para síntese do DNA complementar (cDNA).

A síntese do DNA complementar, foi feita pela solução “mix” contendo, para cada amostra, 10µL de 2xRT Reaction e 2,0 µL da enzima RT (transcriptase reversa). Adicionou-se volume de cada amostra estimado para 500 ng de RNA, de acordo com quantificação prévia, e adicionou-se água até volume final de 8,0 µL com o RNA. Seguindo recomendação do fabricante, as amostras, que totalizaram uma solução final de 20 µL, foram submetidas a ciclos de 25° C por 10 minutos, 50°C por 30 minutos, 85° C por 5 minutos e resfriamento a 13° C em termociclador. Após adição de 1,0 µL de *Escherichia coli* RNase H, as amostras foram incubadas no mesmo aparelho por 20 minutos a 37°C e, posteriormente, congeladas a – 20°C para realização de qRT-PCR em tempo real. Realizou-se a diluição dos *primers*, gerando soluções de estoque de 100 µM, que foram congeladas a – 20°C *overnight*.

Para realização da PCR, preparou-se solução “mix” contendo, para cada amostra, 9,0 µL de água de injeção, 12,5 µL de SYBR Green, 0,5 µL de ROX, 0,5 µL do *primer forward* e 0,5 µL do *primer reverse* do gene avaliado. Adicionou-se 2,0 µL de cDNA, perfazendo volume final de 25 µL em cada poço da placa para PCR. A placa foi selada com adesivo óptico e centrifugada a 1 g por 1 minuto. As reações foram realizadas em triplicatas utilizando o Sistema ABI 7500 Fast System. Seguindo recomendações do fabricante, as condições de amplificação foram 50°C por 2 minutos e 95°C por 2 minutos para ativação enzimática, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, e, para curva de melting, 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C.

O *7500 Software v2.0.6* apresentou as curvas de amplificação em relação ao número de ciclos, sendo o ciclo limiar, ou *threshold* (CT), o ciclo em que se inicia a amplificação da amostra. Assim, o CT permite determinar quantos ciclos são necessários para início da amplificação da sequência gênica alvo presente no DNA de cada amostra e, quanto maior a expressão de um determinado gene, mais cópias foram sintetizadas em ciclos iniciais e menor foi o CT. O delta CT (Δ CT) foi determinado pela subtração do CT do gene pesquisado pelo CT do gene normalizador beta actina. O delta delta CT ($\Delta\Delta$ CT) foi determinado pela diferença entre o Δ CT e a média do Δ CT do grupo controle negativo. A expressão gênica relativa ou *fold change* (FC) de cada gene foi calculada utilizando-se o método do $2^{-\Delta\Delta$ CT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.14. Análise estatística

Todas as análises foram feitas considerando intervalo de confiança 95%, utilizando ambiente R (1). Para a escolha do teste adequado para a comparação dos grupos, foi verificado o perfil de distribuição das variáveis contínuas utilizando o teste de Shapiro-Wilk.

²⁵ Água ultra-pura DEPC – Thermo Fiser, São Paulo, SP, Brasil.

²⁶ Nanovue plus- GE Lifescience.

Para expressão gênica foi assumida distribuição não-paramétrica o teste de comparações múltiplas, teste de Dunn, foi aplicado quando o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Modelo experimental de trauma medular agudo

O emprego do aparelho estereotáxico Mascis Impactor determinou alterações deambulatórias padronizadas nos animais, classificadas por escala de BBB como escore de 12 a 17, sendo considerado trauma medular agudo de intensidade leve a moderada. Não foram observados distúrbios comportamentais como alteração do apetite ou diminuição na ingestão de água, sinais que seriam condizentes com dor. Além disso, alterações decorrentes da cirurgia como infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica não foram constatadas.

A utilização do aparelho estereotáxico indutor de trauma medular contusivo com queda livre de haste à altura de 12,5 mm baseou-se nos trabalhos de (AGRAWAL et al. 2010 e RAJAO., 2016), que referem lesão medular leve a moderada com emprego da altura de queda da haste de 12,5 mm. A aplicação de trauma medular leve a moderado, determina uma menor entrada de cálcio nas células, levando a manutenção da função mitocondrial, possibilitando maior ocorrência de apoptose ao invés de necrose (LU et al., 2000) o que permite o estudo de diversas estratégias de neuroproteção.

5.2. Tratamentos

Embora efeitos deletérios provenientes de toxinas sejam frequentemente relatados, nenhuma dose utilizada causou tremor generalizado, andar em círculo ou fraqueza muscular como visto por Dalmolin e colaboradores (2011). Na literatura, relata-se em sua maioria, o uso da MVIIC em estudos *in vitro*. Doses variáveis de 75 nM a 10 µM mostraram eficácia em bloquear os CCVD do tipo P/Q e, em doses mais elevadas, também os do tipo N (WRIGHT; ANGUS, 1996; IMAIZUMI, et al., 1999). Todavia, Dalmolin e colaboradores (2011) demonstraram que a MVIIC na dose de 100 pmol aplicada intracerebroventricular *in vivo*, além de possuir efeitos antinociceptivos, apresenta, mesmo que eventualmente, efeitos deletérios. Nesse estudo, optou-se pelo emprego das doses de 15 e 30 pmol. A seleção do tempo de aplicação da toxina se baseou nos dados de influxo temporal de cálcio após lesão medular (LM), que tem início minutos após o insulto mecânico. Além disso, os tempos de 5 minutos e uma hora após o trauma foram considerados em decorrência dos estudos de Oliveira (2012) e Oliveira (2014) que demonstraram que estes tempos foram mais eficazes no emprego da MVIIC e MCIIA, respectivamente, resultando na presença de efeitos bloqueadores dos CCVD e sem manifestação de efeitos nocivos.

A aplicação intratecal não apresentou maiores dificuldades na execução além de ser segura para o animal, após treinamento. É uma via de administração que consiste na injeção de substâncias no canal raquidiano, diretamente no espaço subaracnoide, evitando assim a barreira hematoencefálica atuando assim no sistema nervoso. Quando o espaço subaracnoide foi puncionado, alguns animais responderam com uma movimentação da cauda, além de um leve aumento na resistência da agulha no momento de atravessar as meninges, confirmando que o procedimento foi realizado corretamente. A via de aplicação intratecal já foi amplamente estudada e é comumente utilizada nas avaliações de analgesia e neuroproteção após LM porque permite uma avaliação da sua ação direta no tecido nervoso, sendo menos invasiva que a via de aplicação

intralesional (VANICKY et al., 2002; SOUZA et al., 2008; Diniz, 2012). A utilização dessa via foi adotada baseada no estudo de Oliveira (2014), que observou melhor efeito neuroprotetor da ômegaconotoxina-MVIIA, quando administrado por meio de aplicação intratecal, em comparação com a via intramedular. Outros pesquisadores também observaram o mesmo resultado (Souza et al., 2008; Diniz, 2012; Diniz et al., 2014), sem efeitos colaterais.

Na medicina veterinária, tem sido testadas diferentes estratégias terapêuticas para a recuperação de indivíduos após um trauma medular agudo. Por enquanto, não há uma medicação que seja totalmente efetiva e que solucione essa afecção. Um dos mecanismos de evitar a progressão da lesão secundária ao trauma é o bloqueio de canais para cálcio. O veneno do caramujo marinho *Conus magus* é uma fonte de peptídeos biologicamente ativos, incluindo a ω -conotoxina MVIIC, que vem chamando a atenção como bloqueador de CCVD.

5.3. Avaliação da capacidade motora em campo aberto

A avaliação da capacidade motora, baseada na observação da deambulação espontânea em campo aberto, possibilitou a graduação dos déficits neurológicos, que variaram desde perda da propriocepção à parestesia ambulatorial, segundo Basso, Beattie e Bresnahan (1995). A escala BBB possibilitou a avaliação das características funcionais relacionadas à recuperação progressiva, categorizadas de acordo com movimentos de articulações e membros, coordenação de membros torácicos e pélvicos, estabilidade do tronco, posicionamento das patas e cauda. Esse teste, embora subjetivo, mostrou-se uma ferramenta de fácil aplicabilidade, acessível, não invasiva e imediata para avaliação tanto da gravidade da lesão como da recuperação motora.

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade, com escore máximo de 21 pontos pela escala BBB (BASSO et al., 1996), que foi importante para garantir ausência de déficits anteriores. A ambientação dos animais antes do procedimento cirúrgico foi fundamental para reduzir o estresse durante as avaliações.

Neste estudo, objetivou-se causar uma lesão de intensidade leve a moderada. Os animais submetidos ao trauma medular apresentaram, imediatamente após indução da lesão, redução de função motora nos membros pélvicos, classificados em escores que variaram de 12 a 17 pontos (Tabela 2). Ausência de déficits neurológicos nos animais pertencentes ao grupo CN, submetidos apenas ao procedimento cirúrgico, indicou que a laminectomia, conforme esperado, não gerou lesão importante ao tecido medular como relatado por Scheff et al. (2003), Ghazemlou et al. (2005), Torres et al. (2010) e Rajão 2014. Dessa forma, as condições para inclusão no estudo foram ausência de qualquer déficit neurológico na escala de BBB anterior à cirurgia, manutenção de escores máximos nos animais pertencentes ao grupo CN e redução da função motora nos animais submetidos ao trauma medular.

Tabela 2- Valores médios de escores de deambulação por escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) de ratos submetidos à trauma medular agudo contusivo, avaliados 15 horas e 30 horas após indução do trauma medular. Os animais apresentaram escore máximo de 21 pontos antes da cirurgia.

AVALIAÇÃO	GRUPOS					
	CN	CP	15/5	15/1	30/5	30/1
IMEDIATA	21	14	14	14	15	15
15 HORAS	21	14	14	15	15	15
30 HORAS	21	14	15	16	15	17

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas avaliações seguintes, os animais do grupo CN que foram submetidos apenas a laminectomia mantiveram seus escores máximos (21), os animais que sofreram trauma medular não apresentaram diferença estatística comparados com os grupos control, mas no momento da avaliação segundo a escala BBB todos os grupos tratados apresentaram uma melhora na sua resposta motora se comparar com o score inicial, sendo uma resposta bem discreta nas avaliações subsequentes à intervenção cirúrgica, onde o grupo tratado com 30pmol/1 hora após o truma foi o que apresento uma melhor resposta 30 horas após o trauma, mantendo valores médios semelhantes àqueles apresentados imediatamente após o trauma (Tabela 2). A avaliação foi realizada com o objetivo de garantir a não indução de lesão nos animais submetidos a laminectomia e a indução de um trauma leve a moderado nos demais animais do projeto.

Portanto, a avaliação da função motora em campo aberto foi de fácil execução, aplicabilidade e não representou condição de estresse aos animais devido ao condicionamento prévio (Caldeira, 2011). Os escores que os animais apresentaram após o TMA foram semelhantes aos apresentados em estudos prévios de caracterização da lesão medular pelo aparelho Mascis Impactor (AGRAWAL, 2010; SANTOS et al., 2011), indicando ausência de lesão nos animais do grupo CN e indução eficaz de lesão medular moderada a grave nos demais animais.

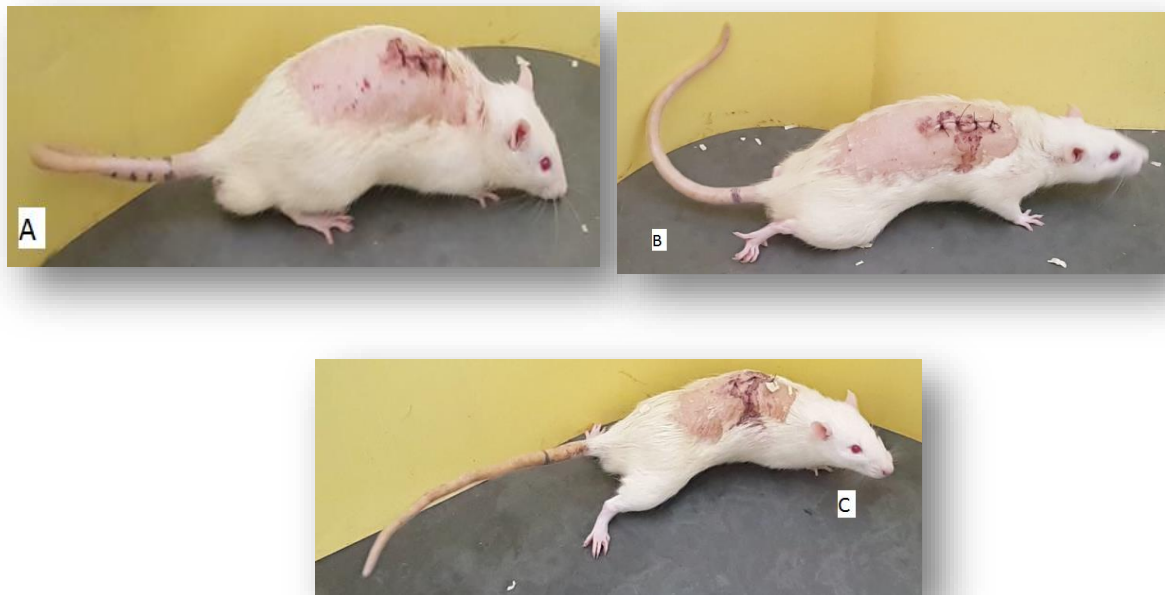


Figura 6- Fotografias da avaliação da função motora em campo aberto por escala de BBB em ratos Wistar, na avaliação imediata. A) Animal do grupo controle negativo, classificados no escore 21. Observa-se sustentação de peso nos quatros membros e cauda elevada. **B)** Animal do grupo 15 pmol 1 hora observa-se suporte de peso constante, passada plantar com coordenação nos MTs e MPs. **C)** Animal do grupo controle positivo após trauma medular agudo Movimento suave de três articulações, suporte de peso constante, sendo classificado no escore de 12 a 17.

5.4. Avaliação clínica e laboratorial dos efeitos colaterais da MVIIC

Não foi observada qualquer alteração clínica sugestiva de efeitos colaterais advindos do emprego da ômega-conotoxina MVIIC. Os efeitos colaterais foram avaliados através de observação de sinais clínicos de toxicidade e análises laboratoriais. A avaliação clínica dos efeitos colaterais foi de fácil realização e constou de observação de tremores involuntários, apresentação de crises epiléticas e fraqueza generalizada (Tabela 3).

Tabela 3- Relação da apresentação de efeitos colaterais com diferentes doses de aplicação da MVIIC 5 minutos e 1 hora após o trauma medular agudo em ratos.

GRUPO	NUMERO DE ANIMAIS	% AFETADO
CN	6	0
CP	6	0
15/5	6	0
15/1	6	0
30/5	6	0
30/1	6	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

A importância da realização de exame hematológico nos estudos que envolvem o emprego de toxinas animais remonta na possibilidade de verificar possíveis alterações causadas pela substância no organismo e a sua gravidade. Além disso, podem-se observar efeitos deletérios sobre a medula óssea que é responsável pela formação de todos os elementos sanguíneos (FARO et al., 2008; RAJÃO., 2016 E MILANI., 2016). Os valores encontrados nas avaliações hematológicas (quantidade de hemácias, concentração de hemoglobina, quantidade de leucócitos totais) não apresentaram diferença em relação aos padrões fisiológicos para a espécie (RAJÃO., 2016) ou entre os diferentes grupos experimentais. Mas, na comparação de medianas entre os grupos tratados, houve diferença estatística na concentração de hemoglobina. Na comparação das medianas, apesar da estatística sugerir diferença entre os grupos, $p=0,0464$ (Kruskal-Wallis), essa diferença não ocorreu em relação ao grupo CP. Já em relação aos valores de leucócitos totais houve diferença estatística do grupo 15/1 em relação ao CP ($p= 0,0294$), porém mesmo demonstrando essa diferença, os resultados permaneceram dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie. A permanência desses valores nos padrões fisiológicos sugere que os tratamentos não ocasionaram qualquer alteração na produção ou consumo das células sanguíneas, nas 48 horas seguintes à aplicação intratecal de 15 e 30 pmol da toxina.

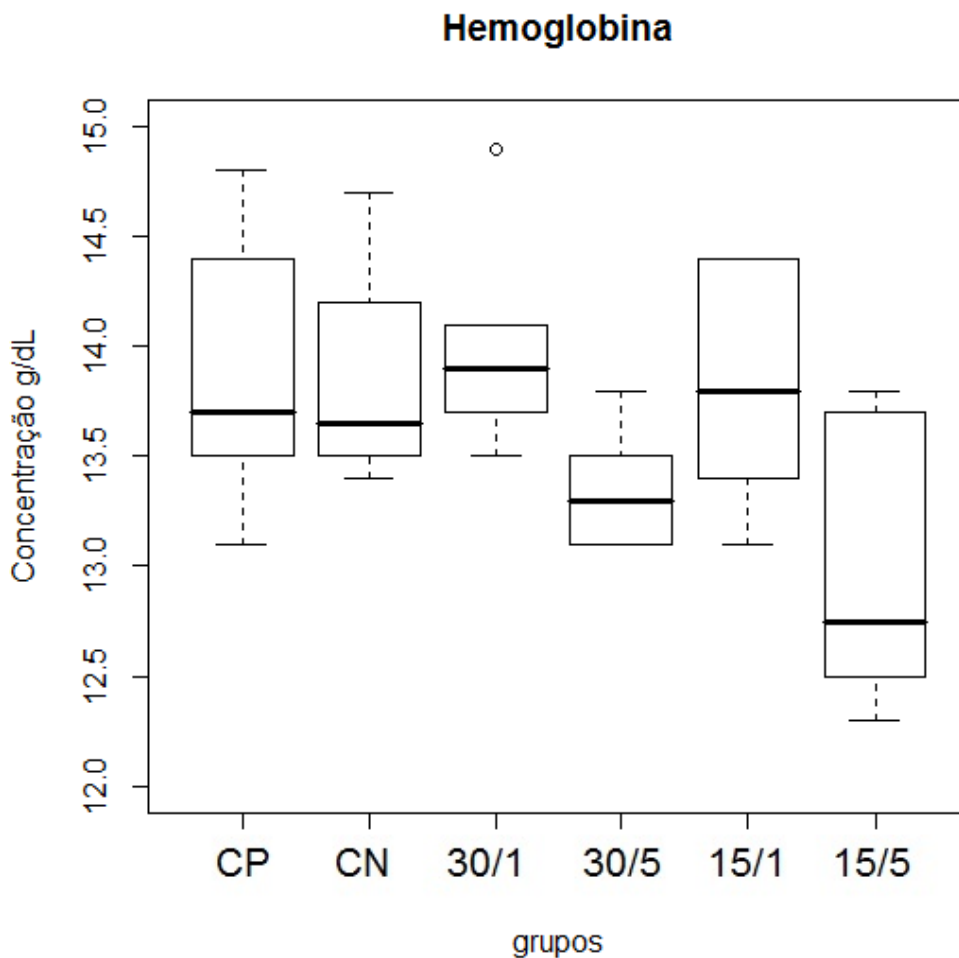


Figura 7- Representação gráfica de médias dos valores de hemoglobina de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Não houve diferença significativa na comparação das médias em relação ao grupo CP.

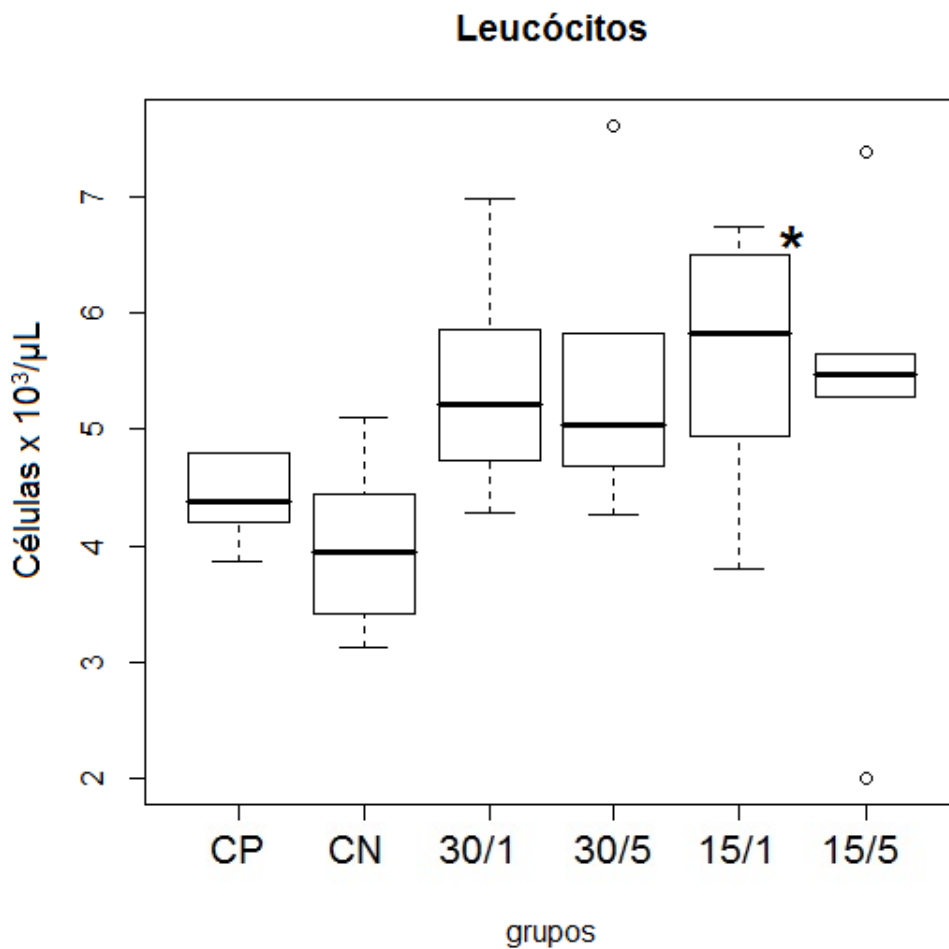


Figura 8- Representação gráfica de médias dos valores de leucócitos de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Na comparação das médias em relação ao grupo CP, o grupo 15/1 apresentou diferença significativa ($p=0,0294$), ficando os grupos 30/1 e 15/5 próximo ao limite do intervalo de confiança ($p= 0,0771$ e $0,0644$, respectivamente.)

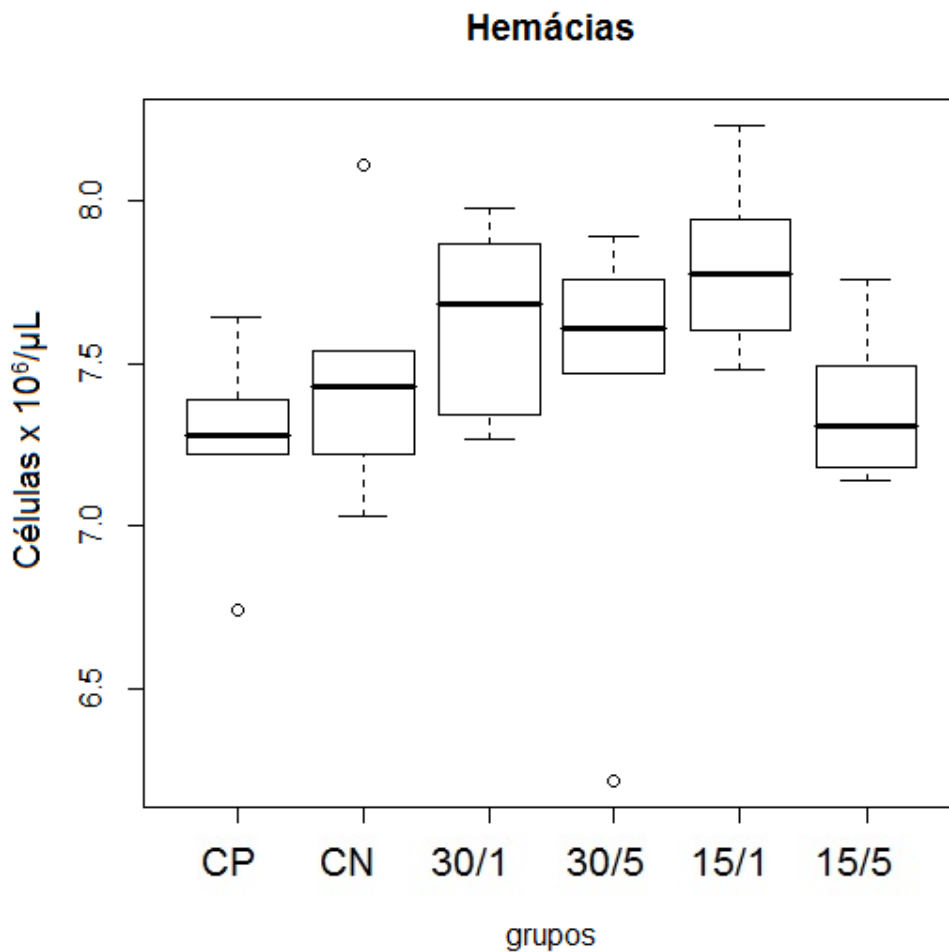


Figura 9- Representação gráfica de médias dos valores de hemácias de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. A estatística de teste não sugeriu diferença entre as medianas (Kruskal-Wallis).

A análise de bioquímica sérica é muito importante nos estudos que envolvem o uso de toxina animal pois ela reflete o funcionamento hepático e renal. Portanto, ela é uma ferramenta importante para avaliação da função fisiológica desses animais, devido ao fato de grande parte das toxinas serem metabolizadas pelo fígado e eliminadas por excreção renal. Os valores plasmáticos de ALT e AST e de ureia e creatinina não apresentaram diferença estatística,

permanecendo dentro dos padrões fisiológicos entre os grupos experimentais (GIKNIS E CLIFFORD, 2008; RAJÃO., 2016),

Na análise de FA plasmática, os grupo que foram submetidos a trauma apresentaram diferencia estatística, também se apresento diferencia estatística entre o grupo CP para o CN com um $P=0,01989$, já para os grupos tratados no houve diferença estatística com o grupo CP, embora exista essa diferencia entre as medianas para o grupo CN e CP não pode se concluir que seja uma colestase ou uma alteração por lesão muscular, já que mesmos apresentado essa diferença de medianas os valores encontrasse dentro dos parâmetros fisiológicos (THRALL.,2007).

Observa-se que não houve diferença estatística entre os valores de AST e ALT o que permite concluir que não teve alteração no metabolismo hepático da MVIIC nos grupos tratados, além disso, não apresentou alteração na função renal que pode se evidenciar nos níveis séricos normais de Ureia e Creatinina entre os tempos e as doses aplicadas nos diferentes grupos, estes resultados são indicativos que a toxina nessa concentração não causa alteração sistêmica, que possa refletir em anormalidades hepáticas e renais, também com os resultados obtidos pode-se afirmar que não ocorreu lesão muscular cardíaca significativa (OLIVEIRA.,2014).

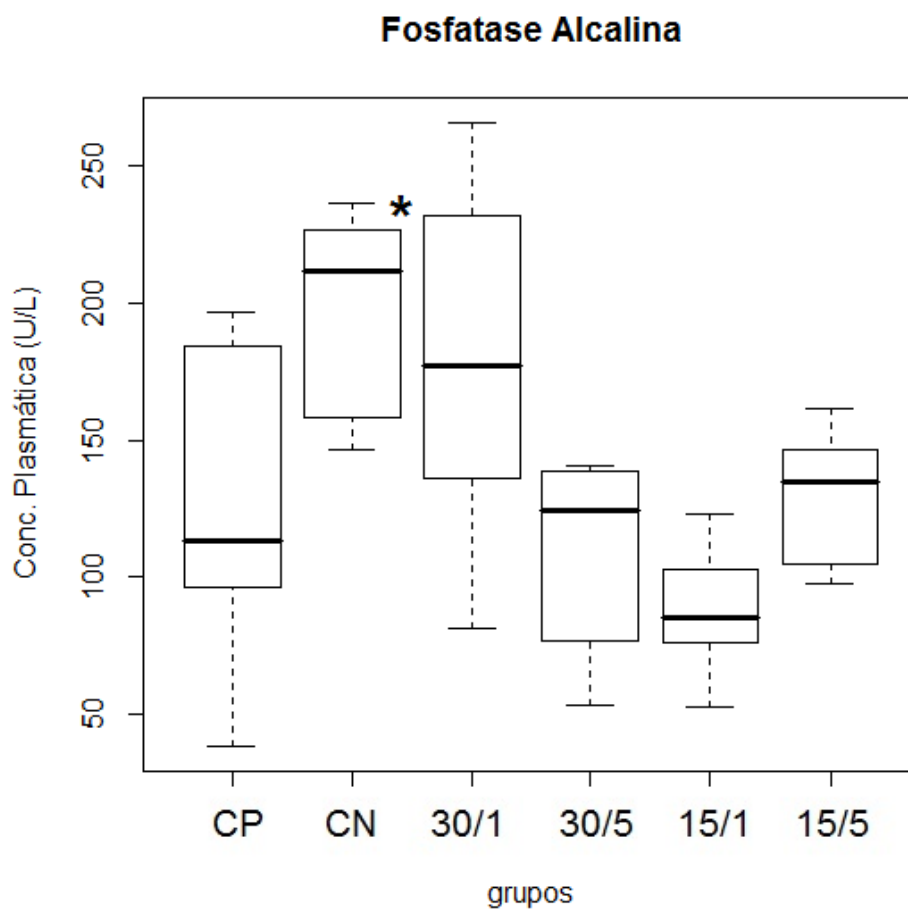


Figura 10- Representação gráfica de medianas dos valores plasmáticos de FA. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tórocolombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. O grupo CN apresentou mediana maior em comparação ao grupo CP, $p=0,01989$.

Aspartato Aminotransferase

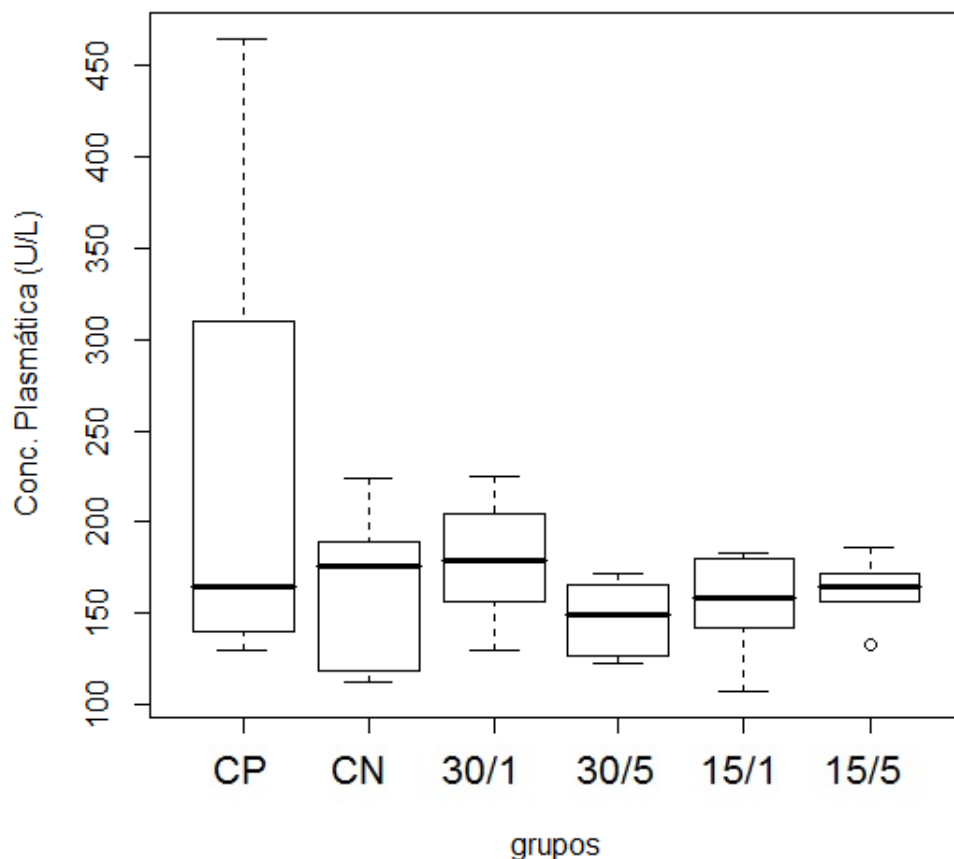


Figura 11- Representação gráfica de médias dos valores plasmáticos de AST. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tórocolombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. A estatística de teste não sugeriu diferença entre as medianas (Kruskal-Wallis).

Alanina Aminotransferase

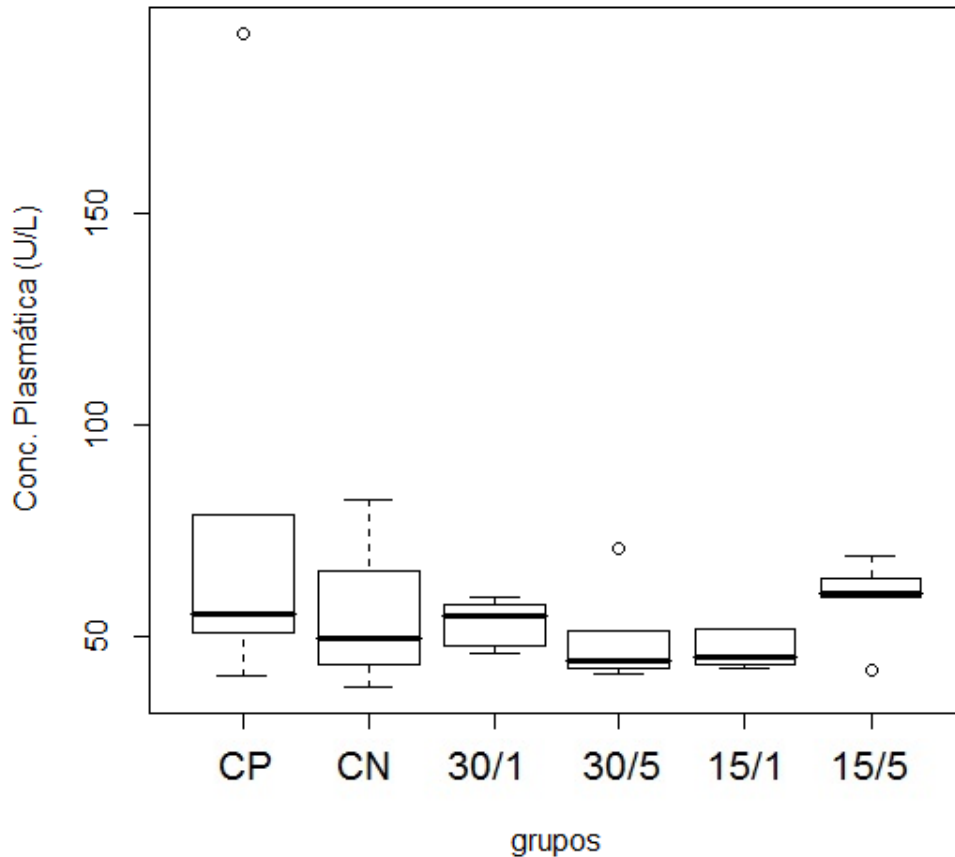


Figura 12- Representação gráfica de médias dos valores plasmáticos de ALT. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tórocolombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. A estatística de teste não sugeriu diferença entre as medianas (Kruskal-Wallis).

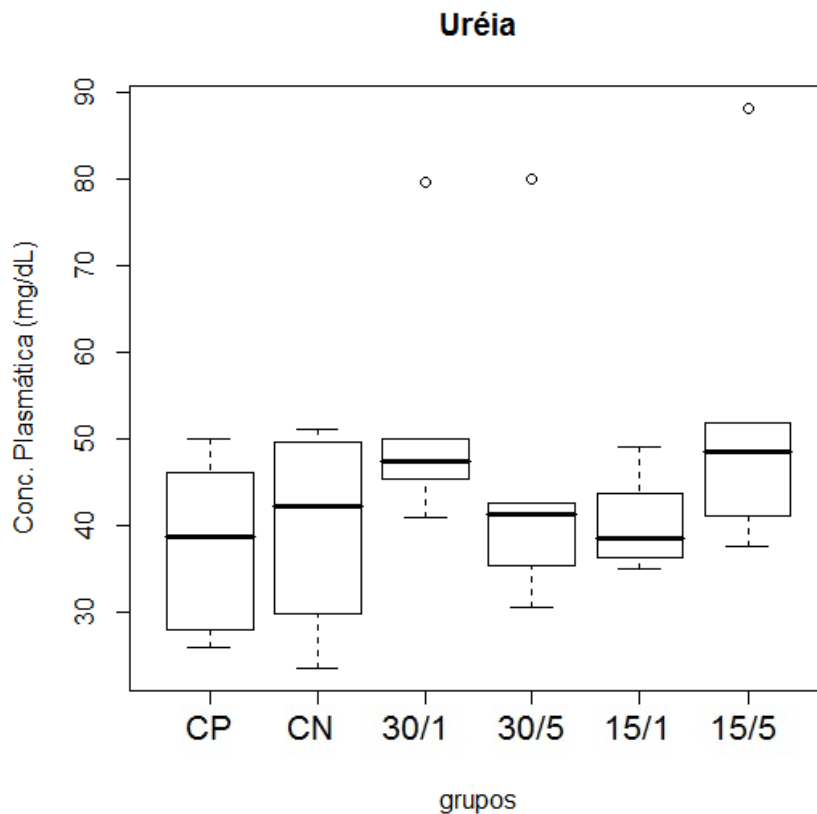


Figura 13- Representação gráfica de médias dos valores plasmáticos de ureia. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tórocolombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. A estatística de teste não sugeriu diferença entre as médias (Kruskal-Wallis).

Os achados do presente estudo sugerem que esta toxina não gera anemia, hemólise, interferências na eritropoiese e lesão hepática ou renal nas doses utilizadas, quando aplicada pela via intratecal.

5. Efeito da MVIIC sobre expressão gênica de fatores relacionados à apoptose após lesão medular

Avaliou-se os efeitos da toxina MVIIC na expressão gênica de fatores relacionados à apoptose (Bax, Bcl-x1, Caspase -8 e -9) por qRT-PCR, após indução de lesão medular contusiva experimental em ratos. Os resultados foram expressos por meio de expressão gênica relativa, através de transformação *fold change* dada por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Referente a expressão de Bax, na comparação das medianas não observou-se diferença estatística entre os grupos controles e os grupos tratados 15/5, 15/1, 30/5 e 30/1 na avaliação de 48 horas após lesão medular (figura 14).

Na avaliação da expressão de Bcl-X1, não observou-se diferença estatística na comparação das medianas entre os grupos controles e os grupos tratados 15/1 e 30/1 na avaliação de 48 horas após lesão medular. Porém, os outros grupos tratados 30/5 e 15/5 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo CN na comparação das medianas ($p < 0,05$) o que pode ser sugestivo de aumento na expressão de fatores antiapoptóticos nesses tratamentos o que vai favorecer a neuroproteção (figura 15).

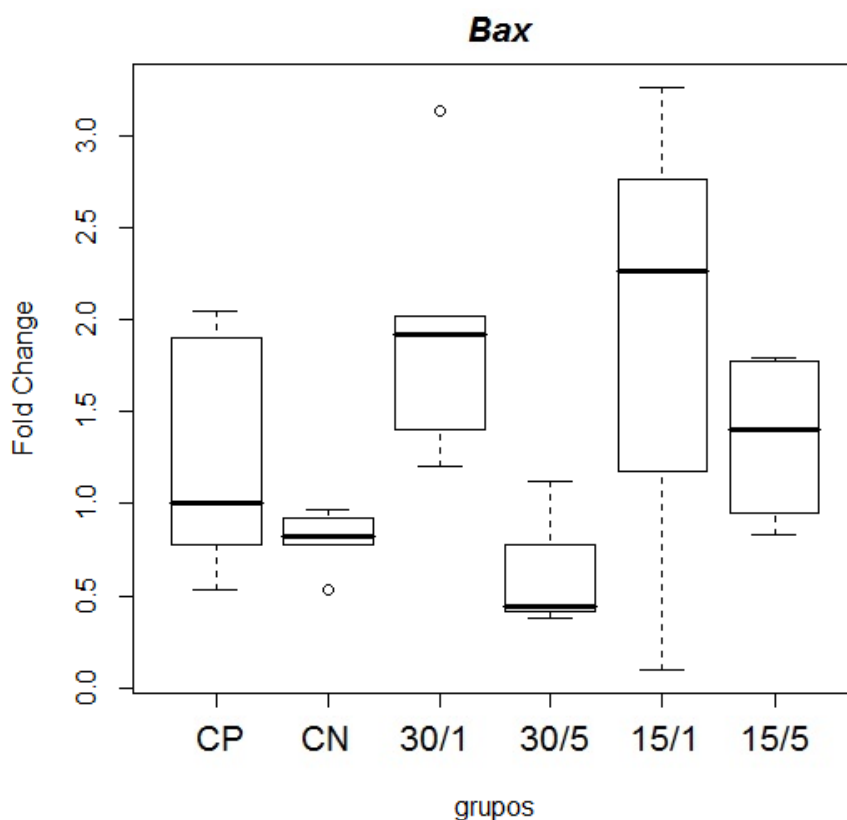


Figura 14- Representação gráfica de medianas do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados à apoptose Bax Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Na comparação das medianas não observou-se diferença estatística, $p= 0,1067$ (Kruskal-Wallis).

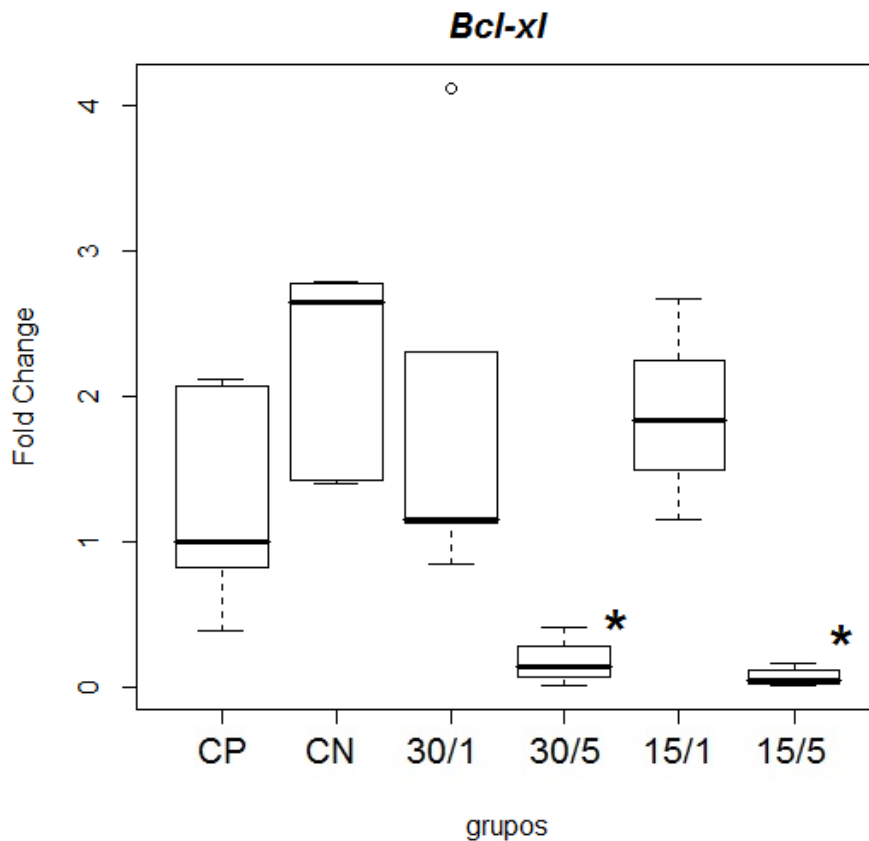


Figura 15- Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados à apoptose Bcl-xl Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. O teste de Kruskal-Wallis apresentou $p < 0,001$. Na comparação das médias, os grupos 30/5 e 15/5 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo CN, $p < 0,05$.

Em relação à expressão de caspase-8, não observou-se diferença estatística na comparação das médias. A ativação da caspase-8 é iniciada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta interação é capaz de ativar a cascata das caspases. Todos os membros da família TNF- α ou Fas L possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular". Quando os

receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose, através da via extrínica (Boldin et al., 1996; Portt et al., 2011). Diferentes eventos podem aumentar estes receptores de morte celular, Fas L, colocando em ação a caspase-8, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (Devadas et al., 2002; Wang et al., 2008) (figura 16).

Referente a expressão da caspase -9, não observou-se diferença estatística na comparação das medianas entre os grupos. Montazeri et al. (2013) relatam que, a expressão e ativação da cassasse-9 podem apresentar picos em 6, 24, 48 e 72 horas, podendo persistir por cinco dias, o que não foi observado no presente estudo (figura 17).

Já foi demonstrado que os membros da família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (Springer et al., 2000; Kuwana e Newmeyer, 2003; Springer et al., 2009; Kotipatruni et al., 2011).

A escolha do segmento da medula espinhal para avaliação da expressão gênica não deve ser responsabilizada pela ausência de diferença, uma vez que, a opção pelo segmento caudal ao epicentro ou à região de laminectomia baseou-se nos achados de Citron et al. (2000), Dasari et al. (2007) e Torres (2014), que demonstraram que os segmentos caudais ao epicentro da lesão exibem maior quantidade de células apoptóticas em relação aos segmentos craniais.

Os achados do presente estudo indicam que, seria interessante testar outros genes e reavaliar a utilização da beta-actina como gene controle, uma vez que ele apresenta altamente expresso nos processos inflamatórios, o que vai levar a um deslocamento da curva para esquerda, o que pode sugerir que não há diferença estatística entre os grupos.

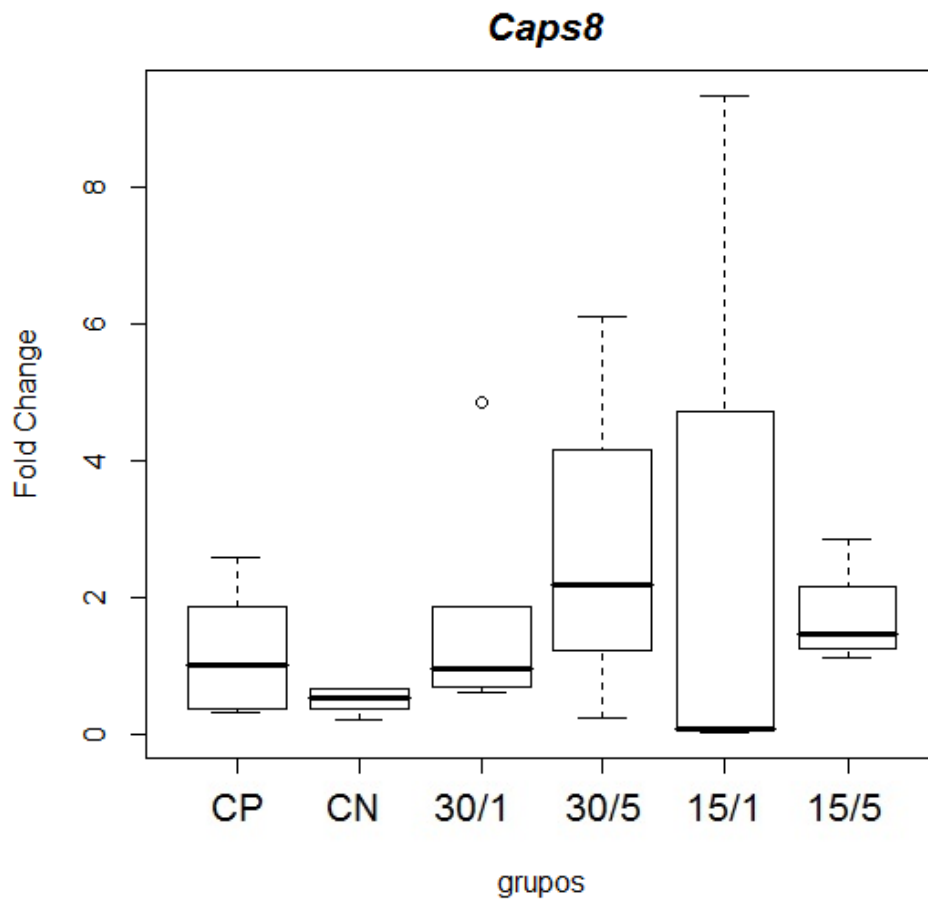


Figura 16- Representação gráfica de medianas e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados à apoptose Caspase-8. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Na comparação das medianas não observou-se diferença estatística, $p=0,3361$ (Kruskal-Wallis).

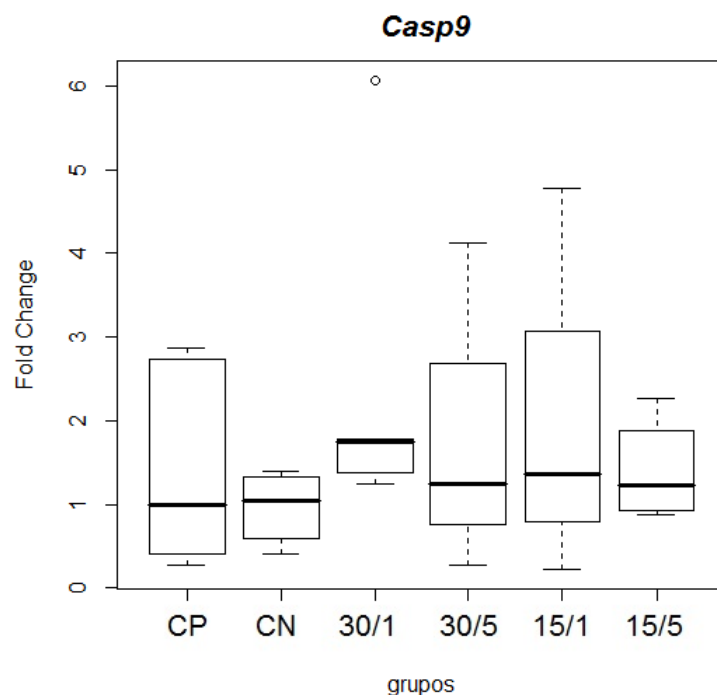


Figura 17- Representação gráfica de medianas e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados á apoptose Caspase-9. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Na comparação das medianas não observou-se diferença estatística, $p=0,6879$ (Kruskal-Wallis).

5.6. Efeito da ômega-conotoxina MVIIC sobre níveis de ERO após lesão medular.

Na produção de ERO's e seu nível basal, a utilização da ômega-conotoxina MVIIC não apresentou diferença estatística entre as medianas dos grupos (figura 18 e figura 19). A utilização de 15 μ mol aos 5 minutos após o trauma da toxina apresentou tendência de redução dos níveis de ERO's em comparação aos grupos controles (CP e CN), o que, provavelmente, estaria relacionado à redução dos eventos patogênicos devido ao acúmulo intracelular de cálcio pelo bloqueio de CCVD.

Observou-se também uma tendência a aumentar os níveis de ERO's nos grupos tratados com 15 μ mol/1 hora, 30 μ mol/5 minutos e 30 μ mol/1 hora, o que pode sugerir que a toxina nessa dosagem e nesses tempos tenha uma tendência de bloqueio excessivo dos canais de cálcio,

podendo levar a alterações metabólicas nas células do tecido neuronal que não foram lesadas no trauma inicial.

A expressão "espécies reativas de oxigênio" é um termo coletivo que envolve não apenas os RL derivado do oxigênio, mas também os não-radicaís derivados da redução molecular do oxigênio. Após o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+} , a disfunção mitocondrial, a degradação do ácido araquidônico e a ativação da óxido nítrico sintetase induzível, a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ocorre causando peroxidação lipídica, dano de proteínas e ácidos nucleicos, induzindo alterações no citoesqueleto e organelas que levam a lise e perda neuronal.

O bloqueio de CCVD é capaz de reduzir o influxo exacerbado de cálcio nas células após lesão medular, tem potencial para reduzir a produção de radicais livres atenuando também as reações de peroxidação lipídica e a progressão da lesão medular secundária. Porém, apesar de ter demonstrado tendência à redução dos níveis medulares com a aplicação 15 pmol da toxina aos 5 minutos após o trauma e um aumento nos demais grupos tratados, não foi observada diferença estatística.

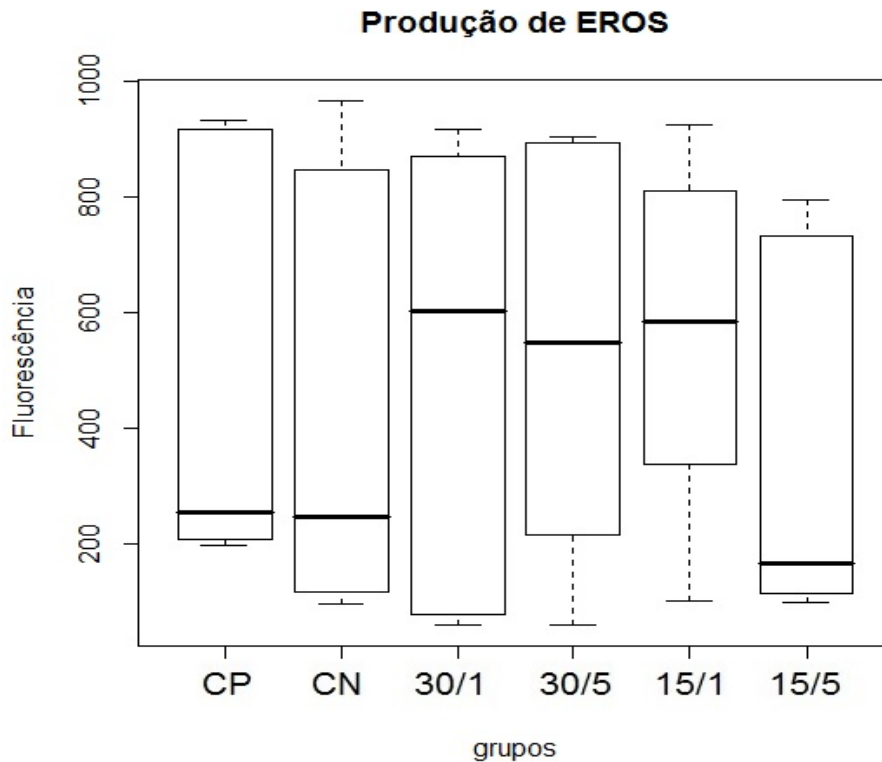


Figura 18- Efeito da toxina MVIIC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) 48 horas após trauma medular. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. A estatística de teste não sugeriu diferença entre as medianas (Kruskal-Wallis).

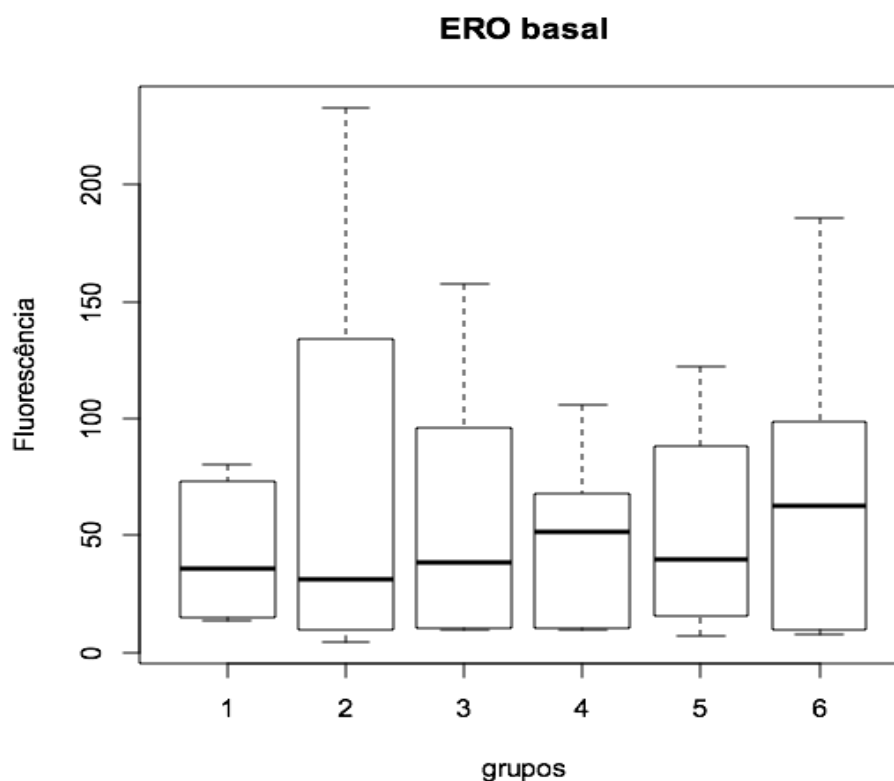


Figura 19- Concentração basal da toxina MVIIC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) 48 horas após trauma medular. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. A estatística de teste não sugeriu diferença entre as medianas (Kruskal-Wallis).

5.7. Efeito da ômega-conotoxina MVIIC sobre peroxidação lipídica 48 horas após lesão medular.

A etapa crítica da produção excessiva de radicais livres é a interação desses compostos com as macromoléculas biológicas como: lipídeos (principalmente dos de membrana), proteínas e DNA. A lipoperoxidação é a degradação oxidativa de um lipídeo, que se inicia quando um radical livre doa um elétron para um ácido graxo de membrana, principalmente insaturado, iniciando uma reação em cadeia que culmina em dano celular (Mylonas e col, 1999). Um dos produtos mais conhecidos gerados da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA) (Alexandrova e col,

2005). Portanto, a quantificação de MDA é amplamente utilizada como indicadora da lipoperoxidação.

Levando em conta o anterior, pode-se concluir que a lesão medular primária contusiva foi capaz de induzir estresse oxidativo secundário de maneira eficiente. Além disso, o emprego da toxina MVIIC nos diferentes grupos tratados não apresentou diferença estatística em relação aos grupos controles (CP e CN), não foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica 48 horas após indução da lesão e, portanto, não teve participação do sistema anti-oxidante.

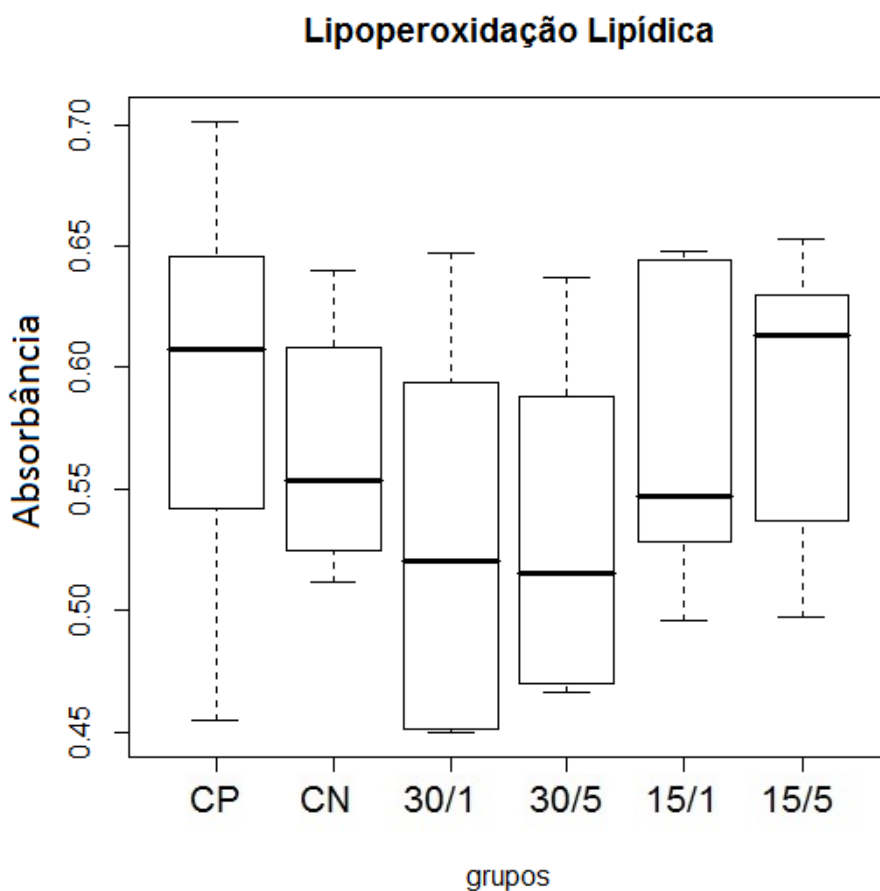


Figura 20- Efeito da toxina MVIIC sobre a produção de Peroxidação lipídica 48 horas após trauma medular. Animais foram submetidos a trauma medular com Mascis Impactor (10g/12,5mm) na região tóroco-lombar, T11 (Exceto grupo CN). Animais do grupo Controle Positivo (CP), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h do trauma; Animais do grupo Controle Negativo (CN), N= 5, receberam PBS intratecal após 1h; Animais do grupo tratado (30/1), N= 4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (30/5), N=4, receberam 30 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. Animais do grupo tratado (15/1), N= 3, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 1h; Animais do grupo tratado (15/5), N= 4, receberam 15 μ mol de ω -conotoxin MVIIC após 5min. A estatística de teste não sugeriu diferença entre as medianas (Kruskal-Wallis).

6. CONCLUSÕES

O aparelho estereotáxico indutor de trauma à medula Mascis Impactor é capaz de reproduzir trauma leve a moderado de forma padronizada, o que é de extrema importância no estudo de neuroproteção tendo como modelo o TMA..

A utilização da ômega-conotoxina MVIIC nas doses de 15 e 30 pmol nos tempos de 5 minutos e 1 hora após do trauma não apresenta efeitos secundários clínicos e sistêmicos.

A ômega-conotoxina MVIIC não foi capaz de melhorar a função motora dos ratos.

O emprego de 15 pmol/1 hora após do trauma embora não tenha apresentado diferença estatística, ele mostrou uma mediana maior aos demais grupos tratados, o que pode sugerir que nessa concentração de toxina tem uma maior expressão de genes pro-apoptotico Bax.

A utilização da dose de 15 pmol/5 minutos, após o trauma, não demonstrou diferença estatística na produção de radicais livres e nas reações de peroxidação lipídica. Contudo, ela apresentou uma tendência à redução desses níveis.

7. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 303/2016

Título do projeto: Efeito neuroprotetor da ômega-conotoxina MVIIIC no trauma experimental da medula espinhal em ratos.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Eliane Goncalves de Melo

Unidade: Escola de Veterinaria

Departamento: Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinaria

Situação atual: [Decisão Final](#)

Aprovado na reunião do dia 21/11/2016.

Belo Horizonte, 23/11/2016.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

8. REFERÊNCIAS

- ACKERY, A.; TATOR, C.; KRASSIOUKOV, A. A Global perspective on Spinal Cord injury Epidemiology. *J. Neurotrauma*, v. 21, n. 10, p. 1355-1370, 2004.
- AGRAWAL, S. K.; NASHIMI, R.; FEHLINGS, M. G. Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury. *J. Neuroscience*, v. 99, n. 1, p. 179-188, 2000.
- ALLEN, A. R. Surgery of experimental lesions of spinal analysis. *J. Neurotrauma*, v. 9, p. 97-217, 1991.
- AMAR, A.P.; LEVY, M. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord. *Neurosurg.*, v. 44, p. 1027-1039, 1999.
- APODACA, G.; KISS, S.; RUIZ, W.; MEYERS, S. et al. Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 284, p. F966-F976, 2003.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 420-430, 2002.
- ASLAN, A.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M.E. et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. *Eur. Spine J.*, v. 18, p. 1442-1451, 2009.
- BARTHOLDI, D.; SCHWAB, M. E. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord in mouse: an in situ hybridization study. *Eur. J. Neurosc.*, v. 7, p. 1422-1438, 1997.
- BASSO, M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.*, v. 139, n. 2, p. 244-256, 1996.
- BEHRMANN, D. L.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S. et al. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J. Neurotrauma*, v. 9, n. 3, p. 197-217, 1992.
- BERRIDGE, M. J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, v. 32, n. 5-6, p. 235-249, 2002.
- BINGHAM, J.; MITSUNAGA, E.; BERGERON, Z. L. Drugs from slugs – Past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chemico-Biological*, v. 183, p. 1-18, 2010.
- BISTNER, S. I.; FORD, R. B.; RAFFE, M. R. *Handbook of Veterinary Procedures and Emergency treatment*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000, 1022p.
- BLIGHT, A. R. Animal models of spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj. Rehabil.*, v. 6, n. 2, p. 1-13, 2000.

- BLIGHT, A. R. Animal models of spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj. Rehabil.*, v. 6, n. 2, p. 1-3, 2006.
- BO, W.; XIAN-JUN, R. Control of demyelination for recovery of spinal cord injury. *Chin. J. Traumatol.*, v. 11, n. 5, p. 306-310, 2008.
- BRITO, L. M. O.; CHEIN, M. B. C.; MARINHO, S. C.; DUARTE, T. B. Avaliação epidemiológicas dos pacientes vítimas de traumatismo raquimedular. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 38, p. 304-309, 2011.
- BROUNS, R.; DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin. Neurol. Neurosur.*, v. 11, p. 483-495, 2009.
- BUBENIK, L.; HOSGOOD, G. Disc herniation and urinary bladder dysfunction managed by manual expression, indwelling catheterization or intermittent catheterization. *Vet. Surg.*, v. 37, n. 8, p. 791-800, 2008.
- BUNTING, R. W.; DOPPELT, S. H.; LAVINE, L. S. Extreme thrombocytosis after orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg.*, v. 73-B, p. 687-688, 1991.
- CALLAGHAN, B.; HAYTHORNTHWAITE, A.; BERECKI, G. et al. Analgesic α -conotoxins Vc1.1 and Rg1A inhibit N-type calcium channels in rat sensory neurons via GABAB receptor activation. *J. Neuroscience*, v. 28, n. 43, p. 10943-10951, 2008.
- CAMERINO, D. C.; TRICARICO, D.; DESAPHY, J. Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics: J. Am. Soc.* v. 4, n. 2, p. 184-198, 2007.
- CAMPOS, M. F.; RIBEIRO, A. T.; LISTIK, S.; PEREIRA, C. A. B.; SOBRINHO, J. A.; RAPOPORT, A. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 35, p. 88-93, 2008.
- CHACÓN, S.C.; NIETO-SAMPEDRO, M. Pathophysiology of spinal Cord injury. A review. *Vet. Mex*, v. 36, n.1, p. 75-86, 2005.
- CHOI, D. W. Excitotoxicity cell death. *J. Neurobiol.*, n. 23, p. 1261-1276, 1992.
- COELHO, R. M. P. *Efeito neuroprotetor da toxina $pha1\beta$ recombinante no trauma medular agudo em ratos*. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado) Universidade federal de minas gerais, programa de pós-graduação em ciência animal, Belo Horizonte. 2016.
- COLTER, S.; RUCKER, N. C. Acute injury to the central nervous system. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.18, n.3, p.545-563, 1988.
- DECUYPERE, J.; MONACO, G.; MISSIAEN, L. et al. IP3 receptors, mitochondria, and Ca²⁺ signaling: implications for aging. *J. Aging Res.*, p. 1-20, 2011.
- FARO, A. M.; DALECK, C. R.; SANTANA, Á. E. et al. Tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. *ARS Vet.*, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2008.

FINCO, D. R. Kidney function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 441-484.

FUJIKI, M.; ZHANG, Z.; GUTH, L.; STEWARD, O. Genetic influences on cellular reactions to spinal cord injury: activation of macrophages/microglia and astrocytes is delayed in mice carrying a mutation (WldS) that causes delayed Wallerian degeneration. *J. Comp. Neurol.*, v. 371, p. 469-484, 1996.

FIGHERA, R.A.; SILVA, M.C.; SOUZA, T.M. et al. Aspectos patológicos de 155 casos fatais de cães atropelados por veículos automotivos. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1375-1380, 2008.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, v. 25, p. 4798-4811, 2006.

GONÇAVES J. M.; FERREIRA, J.; PRADO, M. A.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; PINHEIRO, C. A. N.; SILVA, M. A. R.; CASTRO JUNIOR, C. J.; SOUZA, A. H.; GOMEZ, M. V. The effect of spider toxin PhTx3-4, ω -conotoxins MVIIA and MVIIC on glutamate uptake and on capsaicin-induced glutamate release and $[Ca^{2+}]$ in spinal cord synaptosomes. *Cell Mol Neurobiol*, v. 31, p. 277-283, 2011.

GROSS, A.; MCDONELL, J.M.; KORSMEYER, J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, v.13, p.1899-1911, 1999.

HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J.Neurotrauma*, v.23, p.263-280, 2006.

HALL, E. D.; SPRINGER, J. E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx: J. Am. Soc. Exp. NeuroTher*, v. 1, p. 80-100, 2004.

HALL, E. D. Efficacy and mechanisms of action of the cytoprotective lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate in subarachnoid haemorrhage. *Eur J Anaesthesiol*, v. 13, p. 279-289, 1996.

HAUSMANN, O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 41, p. 369-378, 2003.

HERRERO, I.; MIRAS-PORTUGAL, M.T.; SÁNCHEZ-PRIETO, J. Rapid Desensitization of the metabotropic glutamate receptor that facilitates glutamate release in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.*, v. 6, p. 115120, 1994.

HILLYARD, D.R.; MONJE, V.D.; MINTZ, I.M. et al. A new *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic Ca^{2+} channels. *Neuron*, v. 9, p. 69-77, 1992

HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol. Educ.*, v. 26, n. 4, p. 238-255, 2002.

HWAN, A.Y.; YEOP, B.Y.; GWANG, L. et al. Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 348, p. 560-570, 2006.

- JIA, X.; KOWALSKI, R.G.; SCIUBBA, D.M. et al. Critical Care of Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Intensiv. Care Med.*, v. 28, p. 12-23, 2013.
- JOHNSON, S.; RABINOVITCH, P. Ex-vivo imaging of excised tissue using vital dyes and confocal microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.*, cap. 9, unit 9.39, p. 1-20, 2012.
- KAPOOR, V.K. Natural toxins and their therapeutic potential. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 48, p. 228-237, 2010.
- KARALIJA, A.; NOVIKOVA, L.N.; KINGHAM, P.J. et al. The effects of n-acetyl-cysteine and acetyl-l-carnitine on neural survival, neuroinflammation and regeneration following spinal cord injury. *Neuroscience*, v. 260, p. 143-151, 2014.
- KRASSIOUKOV, A.V.; ACKERY, A.; SCHWARTZ, G. et al. An in vitro modelo f neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Res. Prot.*, v. 10, p. 60-82, 2002.
- KWON, B. K.; FISHER, C. G.; DVORAK, M. F. et al. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*, v. 30, n. 17S, p. S3-S13, 2005.
- KWON, B. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N. et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.*, v. 4, p. 451-464, 2004.
- LANZ, O.; BERGMAN, R.; SHELL, L. Initial assesment of patients with spinal cord trauma. *Vet. Med.*, p. 851-854, 2000.
- LEE, Y.L.; PARK, K.H.; PARK, H.H. et al. Clinidipine mediates a neuroprotective effect by scavenging free radicals and activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Neurochem.*, v. 111, p. 90-100, 2009.
- LEWIS, R. J.; NIELSEN, K. J.; CRAICK, D. J.; LOUGHNAN, M. L.; ADAMS, D. A.; SHARPE, I. A.; LUCHIAN, T.; ADAMS, D. J.; BOND, T.; THOMAS, L.; JONES, A.; MATHESON, J. L.; DRINKWATER, R.; ANDREWS, P. R.; ALEWOOD, P. F. Novel ômega-conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.*, n. 275, p. 35335-35344, 2000.
- LIU, H.; WAARDS, M.; SCOTT, V. E. S. et al. Identification of three subunits of the high affinity ω-conotoxin MVIIC-sensitive Ca²⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 23, p. 13804-13810, 1996.
- MARTINEZ-SANCHEZ, M.; STRIGGOW, F.; SCHRODER, U.H. et al. Na⁽⁺⁾ and Ca⁽²⁺⁾ homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurosci.*, v. 128, p. 729-740, 2004.
- MARTINS, B.C. Efeitos da associação do riluzol ao dantrolene em ratos submetidos ao trauma medular agudo. 2012. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
- MATTSON, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature*, v.1, p.120-129, 2000.

- McDONOUGH, S. I.; SWARTZ, K. J.; MINTZ, I. M.; BOLAND, L. M.; BEAN, B. P. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by omega-conotoxin MVIIC. *J Neurosci*, v. 15, p. 2612-2623, 1996.
- MCDONOUGH, S. I.; BOLAND, L. M.; MINTZ, I. M et al. Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J. Gen. Physiol.*, v. 119, p. 313-328, 2002.
- MELO, E.G.; CARVALHO, P.H.; ROSADO, I.R.; MARTINS, B.D.C. Fisiopatologia e considerações terapêuticas no trauma medular agudo. *Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia*, n.69, p.84-95,2013.
- 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, p. 1304-13012, 2012.
- MINAMI, K.; RAYMOND, C.; MARTIN-MOUTOT, N. Role of Thr in the binding of omega-conotoxin MVIIC to N-type Ca channels. *FEBS Let.*, v. 491, p. 127-130, 2001.
- OLBY, N.; LEVINE, J.; HARRIS, T. et al. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). *JAVMA*, v. 222, p. 762-769, 2003.
- OLBY, N.J.; MACKILLOP, E.; CERDA-GONZALEZ, S. et al. Prevalence of urinary tract infection in dogs after surgery for thoracolumbar intervertebral disc extrusion. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 24, p. 1106-1111, 2010.
- OLIVEIRA, B.; BULAJ, G.; GARRETT, J.; TERLAU, H.; IMPERIAL, J. Peptide toxins from the venoms of cone snails and other toxoglossan gastropods. In: LIMA, M. E.; PIMENTAL, A. M. C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R. B.; ROCHAT, H. *Animal toxins: state of art: Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2009. v. 1, cap. 1, p. 25- 48 13.
- OLIVERA, B. M.; MILJANICH, G.; RAMACHANDRAN, J. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Ann. Rev. Bioch.*, v. 63, p. 823-867, 1994.
- OLIVEIRA, K. M. O.; BINDA, N. S.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, C. M. O.; ROSADO, I. R.; TAGUCHI, T. M.; ALVES, E. G. L.; MELO, M. M.; GOMEZ, M. V.; MELO, E. G. ω -conotoxin MVIIA intralesional injection in spinal cord injury in rats, *Ciência rural*, v. 46, p. 150-156, 2016.
- OLIVEIRA, K. M. *ω -conotoxina MVIIA isolada ou associada ao dantrolene sódico no trauma medular agudo em ratos*. 2014. Tese (doutorado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- _____. *Efeito de diferentes doses de ω -conotoxina MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo*. 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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, p. 3524-3536, 2014.

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

PICKETT, G. E.; CAMPOS-BENITEZ, M.; KELLER, J. L.; DUGGAL, N. Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Canada. *Spine Journal*, v. 31, p.799-805, 2006.

POPOVICH, P.G.; WEI, P.; STOKES, B.T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp Neurol*, v.337, n.3, p.443-464, 1997.

PORTT, L.; NORMAN, G.; CLAPP, C. et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1813, p. 238-259, 2011.

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Res.*, v. 45, p. 125-141, 2004.

REGAN, R.F.; CHOI, D.W. The effect of NMDA, AMPA/kainate, and calcium channel antagonists on traumatic cortical neuronal injury in culture. *Brain Res.*, v. 633, p. 236-242, 1994.

RODRIGUES, N. R.; LETAIF, O. B.; CRISTANTE, A. F.; MARCON, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; FILHO, T. E. P. B. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 18, n. 4, p. 182-186, 2010.

ROMANO-SILVA, M.A.; RIBEIRO-SANTOS, R.; RIBEIRO, A.M. et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem. J.*, v. 296, p. 313-319, 1993.

ROSADO, I.R.; LAVOR, M.S.L.; ALVES, E.G.L. et al. Effects of methylprednisolone, dantrolene, and their combination on experimental spinal cord injury. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v. 7, p. 4617-4626, 2014.

ROSSIGNOL, S.; SCHWAB, M.; SCHWARTZ, M. et al. Spinal cord injury: time to move? *J. Neuroscience*, v. 27, n. 44, p. 11782-11792, 2007.

ROWLAND, J.W.; HAWRYLUK, G.W.; KWON, B.; FEHLINGS, M.G. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus*, v. 25, suppl. E2, p.1-17, 2008.

RUIZ, A.; MATUTE, C.; ALBERDI, E. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP₃ receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium*, v. 46, p. 273-281, 2009.

- SATO, K.; RAYMOND, C.; MARTIN-MOUTOT, N. et al. Binding of chimeric analogs of ω -conotoxin MVIIA and MVIIC to the N- and P/Q-type calcium channels. *FEBS Letters*, v. 414, p. 480-484, 1997.
- SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M.G. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J. Neurosurg.*, v. 94, p. 245-256, 2001.
- SEKHON, L. H. S.; FEHLINGS, M. G. Epidemiology, demographics, and Pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v. 26, n. 24S, p. S2-S12, 2001.
- SEVERO, M.S.; TUDURY, E.A.; ARIAS, M.V.B. Fisiopatologia do trauma e da compressão à medula espinhal de cães e gatos. *Med. Vet.*, v. 1, p. 78-85, 2007.
- SHEN, G.S.; LAYER, R.T.; McCABE, R.T. Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. *DDT*, v. 5, p. 98-105, 2000.
- SIEGENTHALER, M. M.; TU, M. K.; KEIRSTEAD, H. S. The extent of myelin pathology differs following contusion and transection spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 24, p. 1631-1646, 2007.
- SILVA, C.M.O. Condroitinase ABC e células tronco mesenquimais no tratamento de *Rattus norvegicus* submetidos a trauma da medula espinhal. 2013. 73p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, C. M. O.; MELO, E. G.; ALMEIDA, A. E. R. F. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, n. 3, p. 641-650, 2008.
- SOUZA, A.H.; CASTRO JR, C.J.; RIGO, F.K. et al. An Evaluation of the antinociceptive effects of Pha1b, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*, and ω -conotoxin MVIIA, a cone snail *Conus magus* toxin, in rat model of inflammatory and neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 33, p. 59-67, 2013.
- SU, X.; LEON, L.A.; LAPING, N.J. Role of spinal Cav2.2 and Cav2.1 ion channels in bladder nociception. *J. Urol.*, v. 179, p. 2464-2469, 2008.
- TOM, V.J.; HOULÉ, J.D. Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Exp. Neurol.*, v. 211, p. 315-319, 2008.
- THOMAS, W.B. Initial assessment of patients with neurologic dysfunction. *Vet Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.30, n.1, p.1-23, 2000.
- THRALL, M.A. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 518p.
- THURET, S.; L MOON, L.D.F.; GAGE, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature*, v.7, p.628-643, 2006.

- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Neurobiol.*, v. 56, p. 341-358, 1998.
- TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J.Neurosurg.*, v.75, p.15-26, 1991.
- TORRES, B.B.J.; CALDEIRA, F.M.C.; GOMES, M.G. et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. *Int. J. Exp. Path.*, v. 91, p. 530-536, 2010.
- TORRES, B.; SERAKIDE, R.; CALDEIRA, F. et al. The ameliorating effect of dantrolene on the morphology of urinary bladder in spinal cord injured rats. *Pathol. Res. Pract.*, v. 207, p. 775-779, 2011.
- TRIGGLE, D.J. Drug targets in the voltage-gated calcium channel family: why some are and some are not. *ASSAY Drug Dev. Technol.*, v. 1, p. 719-733, 2003.
- TWEDE, V.D.; MILJANJICH, G.; OLIVERA, B.M. et al. Neuroprotective and cardioprotective conopeptides: An emerging class of drug leads. *Curr. Opin.*
- WEBB, A. A.; NGAN, S.; FOWLER, D. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic Science. *Can Vet J*, v. 51, p. 485-492, 2010a.
- WU, Y.; ZHENG, M.; WANG, S. et al. Spatiotemporal pattern of TRAF3 expression after rat spinal cord injury. *J. Mol. Hist.*, DOI 10.1007/s10735-014-95752, 2014.
- XU, G.-Y.; HUGHES, M.G.; YE, Z. et al. Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord. *Exp. Neurol.*, v. 187, p. 329-336, 2004.
- XU, W.; CHI, L.; XU, R. et al. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 43, p. 204-213, 2005.
- YIP, P.K.; MALASPINA, A. Spinal cord trauma and the molecular point of no return. *Molec. Neurodegener.*, v. 7, p. 1-10, 2012.
- YOSHIDA, M.; SAKAI, T. Dantrolene, a calcium-induced calcium release inhibitor, prevents the acquisition of amygdaloid kindling in rats, a model of experimental epilepsy. *Tohoku J. exp. Med.*, v.209, n.4, p.303-310, 2006.
- YOUNG, W. MASCIS spinal cord contusion model. In: CHEN, J.; XU, X.M.; XU, Z.C. *Animal models of acute neurological injuries*. Ed. Humana Press, p. 411-421, 2009.
- ZHANG, A.; KREBS, C. J.; GUTH, L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp. Neurol.*, v. 143, p. 141-152, 1997.
- ZHANG, Z.; GUTH, L. Experimental spinal cord injury: wallerian degeneration in the dorsal column is followed by revascularization, glial proliferation, and nerve regeneration. *Exp. Neurol.* v.147, p.159-171, 1997.

ZANCHET, E. M.; LONGO, I.; CURY, Y. Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, pro inflammatory cytokines, nitric oxide and prostanoids in pain facilitation induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Research*, v.1., p. 101-111, 2004.

ZHENG, Z.; ZHAO, H.; STEINBERG, G.K et al. Cellular and molecular events underlying ischemia-induced neuronal apoptosis. *Drug News Perspect*, v.16, p.497-503, 2003.