

KAREN MACIEL DE OLIVEIRA

**Efeitos de diferentes doses de ω -conotoxina MVIIC
no tratamento de ratos submetidos ao
trauma medular agudo compressivo**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de Clínica e Cirurgia Veterinárias, sob orientação da professora Eliane Gonçalves de Melo.

Belo Horizonte
2012

O48e

Oliveira, Karen Maciel de, 1983-

Efeitos de diferentes doses de ω -conotoxina MVIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo / Karen Maciel de Oliveira. – 2012. 61 p. : il.

Orientador: Eliane Gonçalves de Melo

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

1. Ratos como animais de laboratório – Teses. 2. Medula óssea – Doenças – Teses.
I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.088 5

Dissertação defendida e aprovada em 19 de janeiro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

Eliane Gonçalves de Melo

Prof^a. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente

Mônica Vicky Bahr Arias

Prof^a. Mônica Vicky Bahr Arias

Marília Martins Melo

Prof^a. Marília Martins Melo

Milene Alvarenga Rachid

Prof^a. Milene Alvarenga Rachid

Dedico a todos que,
presencialmente ou a distância,
compartilharam momentos
e contribuíram para minha formação
pessoal e profissional em mais essa etapa
que se completa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A professora Eliane Gonçalves de Melo, pela contribuição não só científica como também pessoal para que esse projeto se tornasse realidade. Foi um prazer ser sua orientada. Obrigada pelo carinho!

Ao professor Marcus Vinícius Gomez, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pelas discussões científicas e apoio fornecido ao nosso grupo, sempre com grande disposição. Obrigada!

Aos componentes da banca da dissertação, professora Mônica, Milene e Marília, por ter aceitado o convite e poder contribuir com a finalização desse trabalho. Obrigada!

Às professoras Marília Martins Melo e equipe (Maira, Fabiano e Márcia), Fabíola de Paes Leme e equipe (Fernanda, Renata, Leandro e Carol), Rogéria Serakides e equipe (Juneo, Jankerle, Rose, Eliane e Leimar) pelo auxílio em diferentes etapas do projeto, com conselhos e opiniões enriquecedoras para o trabalho.

A toda equipe de neurologia, com ajuda essencial de Carla, Mário, Fabíola e Isabel. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos alunos de iniciação científica que contribuíram com esse estudo, em especial a Laís e Gabriela que com interesse mostrado nos incentivam a ensinar.

Aos queridos trabalhadores do Hospital Veterinário que sempre trazem alegria com seu bom dia e carinho, em especial Fábio (portaria), Carlos (enfermeiro), Adão (necropsia) e Ronaldo (farmácia). Meus dias começavam iluminados!

A minha família, pai, mãe e irmãs, que tentaram compreender a distância e apoiar em todos os momentos difíceis e também em cada etapa vencida. Sem o apoio de vocês, talvez o mestrado fosse apenas um sonho e não uma realidade!

Aos tios, primos, padrinhos que sempre torceram por mim! Ao apoio, compreensão, carinho e ilustrações realizadas pelo Felipe que, mesmo na minha correria, esteve sempre ao meu lado.

Aos meus animais que sempre me inspiram, me dão conforto nos momentos mais difíceis e incentivam a continuar, me dão alegria imensurável e mostram cada vez mais o que é amar: Flor de Liz, Jasmim e Cati.

Aos amigos, especialmente, Vivian, Saira, Juliana, Karine, Endrigo e Sabrina. Agradeço todos os dias por terem sido colocados ao meu lado no caminho da vida!

As empresas ABL – Antibióticos do Brasil, Cristália e Nuvital. O apoio de vocês é essencial para dar continuidade aos estudos! E ao apoio fundamental dos órgãos FAPEMIG, CNPq e Capes que possibilitaram a realização deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE ANEXOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. HIPÓTESE	16
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVOS GERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1 TRAUMA MEDULAR.....	16
4.1.1 Fisiopatologia do trauma medular.....	17
4.1.2 O papel do cálcio no trauma medular.....	19
4.1.3 Uso de bloqueadores de canais de cálcio voltagem dependentes na neuroproteção.....	20
4.2 USO DE TOXINAS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS.....	21
4.2.1 As neurotoxinas de caramujos marinhos.....	22
4.2.1.1 A ω -conotoxina MVIIC.....	23
4.3 MODELO EXPERIMENTAL.....	24
4.3.1 Estudo <i>in vivo</i>	24
4.3.2 Modelo do trauma.....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 A ω -CONOTOXINA MVIIC.....	25
5.2 ANIMAIS.....	25
5.3 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICO E CIRÚRGICO.....	25
5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MOTORA.....	28
5.5 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA, ENZIMAS HEPÁTICA E RENAL E URINÁLISE.....	28
5.6 AVALIAÇÃO ANATOMOISTOPATOLÓGICA EXTRANEURAL.....	30
5.7 AVALIAÇÃO ANATOMOISTOPATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL.....	30
5.8 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA MEDULA ESPINHAL.....	30
5.9 TUNEL.....	31
5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MOTORA.....	33

6.2	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E URINÁLISE.....	34
6.2.1	Avaliação hematológica.....	34
6.2.2	Avaliação das enzimas hepáticas e renais.....	40
6.2.3	Urinálise.....	43
6.3	AVALIAÇÃO ANATOMOISTOPATOLÓGICA EXTRA-NEURAL.....	44
6.4	AVALIAÇÃO ANATOMOISTOPATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL.....	47
6.5	AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA MEDULA ESPINHAL.....	49
6.6	TUNEL.....	50
7.	CONCLUSÕES.....	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Fotografias dos procedimentos anestésico e cirúrgico do trauma medular experimental realizados em ratos Wistar tratados com a ω -conotoxina MVIIC aplicada intralesionalmente. A) Animal na câmara de indução anestésica com isofluorano. B) Animal posicionado em decúbito esternal no suporte do aparelho estereotáxico com realização da antisepsia. C) Exposição da medula espinhal após a laminectomia dorsal. D) Realização do trauma medular com o emprego do aparelho estereotáxico desenvolvido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. E) Foco hemorrágico (em destaque) após o trauma medular com o peso de 70,5 g. F) Aplicação intralesional do tratamento com seringa de Hamilton, cinco minutos após o trauma..... 27
- Figura 2 -** Gráfico da avaliação da capacidade motora mostrando as medianas dos escores diários de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Observa-se que a mediana do grupo CTN difere estatisticamente de todas dos grupos traumatizados, à exceção do G15 ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 33
- Figura 3 -** Gráfico da avaliação da capacidade motora mostrando as medianas dos escores diários de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 34
- Figura 4 -** Gráficos das médias e desvio padrão dos valores hematológicos de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), plaquetas e proteína total de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1- 8 dias após o trauma) (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)..... 36
- Figura 5 -** Gráficos das médias e desvio padrão dos valores de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1- 8 dias após o trauma) ($p < 0,05$)..... 38

Figura 6 -	Gráficos das médias dos valores séricos de ALT, AST, creatinina e uréia de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1-8 dias após o trauma) ($p < 0,05$).....	42
Figura 7 -	Gráficos das médias dos valores de hemoglobina e albumina urinárias de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1-6 horas após o trauma; T2 – 24 horas após o trauma; T3 – 7 dias após o trauma) ($p < 0,05$).....	44
Figura 8 -	Fotomicroscopia de secções longitudinais do rim de ratos Wistar corados com hematoxilina-eosina (x). A) Observa-se a integridade dos glomérulos e túbulos renais do grupo CTN (210x). B) Material proteináceo eosinofílico (seta) acentuado difuso no grupo G120 (207x).....	45
Figura 9 -	Gráfico da avaliação renal mostrando as medianas dos escores de amiloidose em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).....	46
Figura 10 -	A) Gráfico da avaliação da bexiga mostrando as medianas dos escores de hemorragia em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$). B) Fotomicroscopia de secções da bexiga de ratos Wistar submetido ao trauma medular agudo e tratados com placebo, corados com hematoxilina-eosina, com foco hemorrágico acentuado difuso (asterisco) (140x).....	47
Figura 11 -	Fotomicroscopia de secções da medula espinhal de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados placebo, corados com hematoxilina-eosina. A) Degeneração axonal (seta branca) e tumefação mielínica (seta cheia) em segmento adjacente ao epicentro do animal do G120 (290x). B) Células Gitter (seta) em área de malácia de animal do PLA (290x). C) Gliose em área de malácia do animal do PLA (290x). D) Cortes em regiões adjacentes e também no epicentro da lesão com diferentes áreas de injúria. Observa-se a substância branca (SB) circundando a substância cinzenta (SC). Regiões próximas ao epicentro mostram áreas de malácia (asterisco) (41x).....	48

Figura 12 -	Gráficos das médias e desvio padrão do número de corpos neuronais NeuN positivos, por campo, na medula espinhal de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC) ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).....	49
Figura 13 -	Gráficos das médias e desvio padrão do número de células marcadas TUNEL positivas, por campo, na medula espinhal de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC) ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).....	50
Figura 14 -	Fotomicroscopia de secções da medula espinhal de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados, ou não, com diferentes doses de MVIIC. A) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada) em animal do CTN (29x). B) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada – seta) em animal do PLA (290x). C) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada) em animal do PLA (71x). D) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada) em animal do G15 (71x). E) Coloração de lâminas do grupo CTN com TUNEL e contracoloração com Methylgreen (71x). D) Marcação de morte celular (TUNEL positivo – seta) em animal do PLA (290x).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros hematológicos de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC.....	37
Tabela 2 -	Valores do leucograma de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC.....	39
Tabela 3 -	Valores totais de proteína de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC.....	40
Tabela 4 -	Valores médios das enzimas hepáticas e renais de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Eventos secundários à lesão inicial, após o trauma medular agudo.....	19
Quadro 2 -	Descrição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento específico.....	26
Quadro 3 -	Descrição dos escores para avaliação da capacidade motora.....	29

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.....	61
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
Ca^{2+}	Cálcio
CCVD	Canais para cálcio voltagem dependentes
CTN	Controle negativo
DAB	3,3'diaminobenzidina
dL	Decilitros
EV	Escola de Veterinária
g	Grama
G120	Grupo com a dose de 120 pmol
G15	Grupo com a dose de 15 pmol
G30	Grupo com a dose de 30 pmol
G60	Grupo com a dose de 60 pmol
HE	Hematoxilina-eosina
IV	Intravenoso
K^{+}	Potássio
kg	Quilograma
ME	Medula espinhal
mg	Miligrama
MVIIC	Ômega-conotoxina MVIIC
Na^{+}	Sódio
NeuN	Antígeno nuclear neurônio-específico
PLA	Placebo
SC	Subcutâneo
SNK	Student Newman Keuls
TMA	Trauma medular agudo
TUNEL	<i>TdT mediated dUTP nick endlabelling</i>
U	Unidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ω	Ômega
μ	Mi

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da administração de diferentes doses da ω -conotoxina MVIIC (MVIIC) no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo (TMA). Foram utilizados 36 ratos Wistar distribuídos em seis grupos: controle negativo (CTN), controle positivo (PLA), e grupos da MVIIC com doses de 15 (G15), 30 (G30), 60 (G60) e 120 pmol (G120). Todos os outros grupos, com exceção do CTN, foram submetidos ao TMA com peso 70,5 g por cinco minutos. Dez minutos após, o PLA recebeu injeção intralesional de 2 μ L de água estéril e G15, G30, G60 e G120 recebeu o volume equivalente com dose específica de MVIIC. Realizaram-se avaliações da capacidade motora, do perfil hematológico, enzimas hepáticas e renais e urinálise. Após oito dias, os animais foram submetidos à eutanásia, coletando-se amostras de diferentes tecidos. Para avaliação da integridade da medula espinhal foi utilizada a técnica de imunoistoquímica com anticorpo anti-NeuN e técnica de TUNEL. Grupos submetidos ao trauma apresentaram paraplegia grave e retenção urinária com cistite hemorrágica. Doses utilizadas mostraram-se seguras quanto a parâmetros hematológicos, bioquímicos das enzimas hepáticas e renais e valores urinários. Entretanto, à histologia renal, o G120 apresentou efeito deletério. O G15 reduziu o processo hemorrágico na bexiga, mostrou preservação de corpos neuronais e apresentou semelhança ao controle negativo quanto a marcação de células apoptóticas no segmento cranial ($p < 0,05$), sem efeitos colaterais. Sugere-se que a MVIIC na dose de 15 pmol apresente proteção na bexiga e na medula espinhal de ratos submetidos ao trauma medular agudo.

Palavras-chave: MVIIC, trauma medular, *in vivo*, ratos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of different doses of MVIIC on experimental acute spinal cord injury (ASCI). Therefore, 36 male Wistar rats were equally distributed into six groups: CTN (negative control group), PLA (positive control group) and those which received doses of MVIIC of 15 (G15), 30 (G30), 60 (G60) e 120 pmol (G120). All groups, except for CTN, were submitted to ASCI with a weight of 70,5 g, during five minutes. Ten minutes later, PLA received intralesional injection of sterile water and G15, G30, G60 e G120 equivalent volume of MVIIC with specific dose. The animals were evaluated by BBB test, blood profile, renal and liver enzymes and urinalysis. After euthanasia, different tissue samples were collected. To evaluate the spinal cord integrity were performed TUNEL and immunohistochemical staining with anti-NeuN antibody. The trauma groups showed severe paraplegia and urinary retention with hemorrhagic cystitis. Doses used were safe as hematological, biochemical liver enzymes and renal and urinary values. However, G120 had a renal deleterious effect. G15 reduced the bladder injury, showed neuronal bodies preservation and was similar to CTN as apoptotic cells in the cranial segment ($p < 0.05$), with no side effects. Therefore, suggests that MVIIC at a dose of 15 pmol provide a protective effect on bladder and on spinal cord of rats submitted to acute spinal cord trauma.

Keywords: MVIIC, spinal cord injury, *in vivo*, rats.

1. INTRODUÇÃO

O trauma medular agudo (TMA) em humanos é um evento grave, não apenas para o paciente acometido como também para família e sociedade, uma vez que determina a manifestação de sequelas por toda a vida. Os adultos jovens, em plena fase produtiva, são os mais acometidos, contudo essas lesões podem ocorrer em qualquer faixa etária, sendo estimada uma frequência anual de 20 a 40 pessoas/milhão de habitantes no mundo (Taoka e Okajima, 1998; Hall e Springer, 2004).

As principais causas de TMA são acidentes automobilísticos, quedas, atividades esportivas radicais e violência (Taoka e Okajima, 1998; Hall e Springer, 2004). Na medicina veterinária, as lesões medulares de origem exógena ocorrem comumente associadas a atropelamentos e quedas, além daquelas de origem endógena como alterações degenerativas do disco intervertebral com extrusão e protrusão, fraturas patológicas e anormalidades congênitas. Em animais, a real incidência do TMA não é bem documentada pela escassez de dados, provavelmente porque muitos dos pacientes acometidos são submetidos a eutanásia (Arias et al., 2007; Severo et al., 2007).

No momento do trauma, ocorre a lesão primária que acarreta a ruptura de axônios, corpos neuronais e células da neuroglia, resultando na interrupção da passagem dos impulsos nervosos. Na sequência, iniciam-se eventos neurodegenerativos secundários, os quais são responsáveis pela presença de sequelas e redução das chances de recuperação do indivíduo. Dentre esses eventos, a entrada de cálcio nas células destaca-se por ser uma importante via para morte neuronal devido aos seus efeitos deletérios que culminam em necrose e apoptose (Isaac e Pejic, 1995; Amar e Levy, 1999; Lu et al., 2000; Carlson e Gorden,

2002; Hall e Springer, 2004; Severo et al., 2007).

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).

Na natureza, há uma extensa variedade de bloqueadores de canais para cálcio a serem investigadas, como as toxinas de caramujos marinhos do gênero *Conus*, também denominadas conotoxinas. Pesquisas farmacológicas têm sido desenvolvidas com essas substâncias, considerando a estabilidade estrutural dessas toxinas, facilidade de síntese, especificidade de alvo e principalmente pelo pequeno tamanho de seus peptídeos, sendo composta por apenas 26 aminoácidos, com peso molecular de 2746 daltons. Além disso, a elevada seletividade das classes de conotoxinas, como exemplo μ e ω , respectivamente, pelos canais para sódio e cálcio presentes na membrana plasmática, proporciona um considerável potencial terapêutico e biomédico (Shen et al., 2000; Lewis e Garcia, 2003; Olivera e Teichert, 2007).

Foi demonstrado em modelos de isquemia cerebral, que as ω -conotoxinas exercem efeito neuroprotetor ao antagonizar os canais para cálcio voltagem dependentes (CCVD) e com isso inibem a liberação excessiva de neurotransmissores (Minami et al., 2001; Rajendra et al., 2004). Especificamente, a ω -conotoxina MVIIC (MVIIC) inibe de forma seletiva os CCVD dos tipos N, P e Q, essenciais na liberação de neurotransmissores relacionados ao desenvolvimento da lesão secundária (Olivera et al., 1994; Uchitel, 1997; Minami

et al., 2001). Por essas características, postula-se que a MVIIC administrada imediatamente após o TMA, possa exercer efeitos neuroprotetores, sendo este o primeiro estudo a avaliar tal ação na lesão medular *in vivo*.

2. HIPÓTESE

A ω -conotoxina MVIIC impede o desenvolvimento de lesões secundárias ao trauma medular e, assim, reduz os eventos apoptóticos e aumenta as chances de recuperação neurológica do paciente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da ω -conotoxina MVIIC do veneno de *Conus magus* na neuroproteção de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo.

3.2 Objetivos específicos

-Avaliar a capacidade motora através da observação diária em campo aberto;

-Avaliar efeitos sistêmicos da MVIIC através de exames hematológicos, bioquímicos e urinálise;

-Avaliar as alterações anatomopatológicas na medula espinal, fígado, rim, baço, intestino, coração, bexiga, adrenal, pulmão pela técnica de hematoxilina-eosina;

-Avaliar a ação neuroprotetora da MVIIC na medula espinal pela quantificação de neurônios pela técnica de imunistoquímica com anti-NeuN e da morte celular pela técnica de TUNEL.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O trauma medular

O TMA representa um problema de saúde grave associado à redução na expectativa de vida e uma gama de complicações secundárias. A incidência das lesões medulares é de aproximadamente 20 a 40 pessoas a cada milhão de habitantes por ano, gerando custos financeiros ao indivíduo e à sociedade (Sekhon e Fehlings, 2001; Rossignol et al., 2008). Apesar de poucos relatos na medicina veterinária, sabe-se que em torno de 2% dos cães são acometidos pela doença do disco intervertebral, sendo frequente em algumas raças mais predispostas como Dachshund (20-25%) (Bubenik e Hosgood, 2008).

O trauma medular pode ser causado por fatores extrínsecos como atropelamento, quedas e brigas, sendo essas as principais causas na medicina veterinária (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 e Arias, 2007).

Os déficits neurológicos decorrentes do TMA resultam da interrupção direta das vias neuronais imediatamente após o evento mecânico (Severo et al., 2007). A perda das funções motora e sensorial distal ao ponto do TMA leva a múltiplos problemas de saúde como assaduras, retenção urinária, infecção do trato urinário, feridas por pressão e disfunções cardíaca e respiratória, que culminam na redução da qualidade e expectativa de vida (Hulsebosch, 2002; Ackery et al., 2004; Kwon et al., 2004; Talac et al., 2004; Guertin, 2005; Rossignol et al., 2008). Alterações na região toracolombar são as mais comuns, devido ao estreitamento do canal vertebral, gerando sinais clínicos agudos como dor, ataxia, paresia, paralisia e disfunções urinária e fecal (Olby et al., 2003; Coates, 2004; Bubenik e Hosgood, 2008).

A recuperação neurológica depende da gravidade da lesão, do seu tempo de duração (Delamarter et al., 1995) e da localização (Carlson et al., 2000). Relata-se também que pode ocorrer recuperação neurológica espontânea em lesões mais discretas, resultante da plasticidade estrutural dos circuitos sobreviventes (Tator, 2002; Hagg e Oudega, 2006).

Apesar de recentes avanços no estudo da fisiopatologia do TMA terem possibilitado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Talach et al., 2004), ainda não foi descoberto um tratamento neuroprotetor efetivo que detenha a expansão da lesão secundária e diminua as sequelas permanentes (Hausmann, 2003; Kwon et al., 2004).

4.1.1 Fisiopatologia do trauma medular

A fisiopatologia do trauma medular é caracterizada como resultado de um processo contínuo de destruição tecidual, reparação e cicatrização da lesão ao redor do sítio da injúria. O impacto inicial no momento do trauma acarreta dano mecânico imediato da medula espinal e tecido adjacente, com ruptura de vasos sanguíneos, corpos neuronais, axônios e células da glia, resultando na interrupção fisiológica e/ou morfológica dos impulsos nervosos e na cascata de eventos destrutivos (Grill, 2005; Severo et al., 2007).

As lesões secundárias iniciam-se minutos após o trauma mecânico (Quadro 1). Há a quebra da barreira hematoespinal, o que gera aumento da permeabilidade celular com formação de edema, início da resposta inflamatória, perda de cargas aniônicas e extravasamento de proteínas plasmáticas (Hausmann, 2003; Rowland et al., 2008). Concomitantemente, a ruptura da microvasculatura gera hemorragia que, associada ao edema, leva a isquemia medular, estendendo-a rostral e

caudalmente (Zhang et al., 1997; Hulsebosch, 2002; Hagg e Oudega, 2006; Rowland et al., 2008). As células gliais e endoteliais liberam substâncias vasoativas que se concentram próximas à lesão e resultam em isquemia neuronal (Hausmann, 2003; Talach et al., 2004; Grill, 2005; Kwon et al., 2005). O aporte sanguíneo da substância branca diminui drasticamente em cinco minutos e pode retornar ao normal em 24 horas. Já na substância cinzenta, a presença de focos hemorrágicos pode ser observada nos primeiros minutos e a perfusão se mantém ausente por uma hora (Taoka e Okajima, 1998). Essa isquemia acarreta danos mitocondriais devido ao acúmulo excessivo de cálcio nessa organela e consequente depleção energética. Frente à baixa oxigenação, radicais livres de superóxido e hidroxilas são formados (Xu et al., 2005), intensificam a reação inflamatória e ativam os mecanismos de morte celular programada (Isaac e Pejic, 1995; Amar e Levy, 1999; Lu et al., 2000; Carlson e Gorden, 2002; Hall e Springer, 2004; Arias et al., 2007; Severo et al., 2007). Além disso, há danos a proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, com consequente aumento da permeabilidade celular, culminando em um desequilíbrio ainda maior de Ca^{2+} (Hausmann, 2003; Rowland et al., 2008).

Dentro de 24 horas, o parênquima medular é invadido por neutrófilos, monócitos e linfócitos, os quais são responsáveis pela resposta inflamatória local (Hulsebosch, 2002). Os neutrófilos são os primeiros a chegar com picos em 48 a 72 horas. Acumulam-se no endotélio vascular e são responsáveis pela retirada dos debris teciduais e restauração da homeostasia (Taoka e Okajima, 1998; Hausmann, 2003). A micróglia responde com a expressão de moléculas em sua superfície e, consequente, liberação de citocinas. Ela é responsável pela fagocitose de debris celulares, tornando-se a micróglia ativada, com aumento nos primeiros sete dias e picos

dentro de duas a quatro semanas após a injúria medular. Contudo, a sua presença por longos períodos pode levar a destruição neuronal. A infiltração linfocitária, por sua vez, aumenta paralelamente junto a micróglia e ao influxo de macrófagos, na primeira semana predominantemente no centro da lesão (Hulsebosch, 2002; Hausmann, 2003). Além disso, os astrócitos, periféricos a lesão, tornam-se reativos, proliferam e hipertrofiam, na tentativa de conter uma resposta inflamatória exarcebada (Herrmann et al., 2008). Esses associados com a invasão dos fibroblastos meningeais formam a cicatriz astrogliar que atua como barreira física e/ou química a regeneração axonal (Hausmann, 2003; Guertin, 2005; Hagg e Oudega, 2006; Rowland et al., 2008).

Paralelamente a esses eventos, ocorrem outros processos que também exarcebam a injúria neuronal, tendo destaque a excitotoxicidade, com significativas trocas de eletrólitos, e o aumento exarcebado do cálcio intracelular (Hausmann, 2003; Talac et al., 2004; Grill, 2005; Kwon et al., 2005; Severo et al., 2007; Rowland et al., 2008).

A excitotoxicidade ocorre quando as concentrações extracelulares de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, alcançam níveis neurotóxicos e levam a transmissão sináptica excitatória prolongada com ativação de mecanismos glutamatérgicos (Hulsebosch, 2002; Rowland et al., 2008). Isso acarreta no influxo exarcebado de Na^+ e Ca^{2+} pelos receptores ionotrópicos e metabotrópicos, além da entrada de Ca^{2+} pelos 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 da apoptose pela formação de poros transitórios na membrana interna mitocondrial, e também pela geração de espécies reativas de oxigênio,

edemaciamento da mitocôndria com final ruptura da membrana externa com liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c, fator indutor de apoptose, entre outros, que ativam caspases executoras, como caspase-3 e caspase-7 (Berridge, 2002; Hall e Springer, 2004; Sullivan et al., 2004; Ruiz et al., 2009; Decuyper et al., 2011).

A apoptose é um mecanismo essencial durante o desenvolvimento do sistema nervoso central para eliminação de células excessivas. Entretanto após o TMA, 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 e Springer, 2004). A partir de quatro horas depois do trauma, observam-se picos de apoptose das células neuronais e gliais apoptóticas, em oito e 24 horas respectivamente (Lu et al., 2000). No sétimo dia ocorre um aumento progressivo da área lesada e as cavitações aumentam com mais morte neuronal e glial. Nesse período, observa-se um terceiro pico de apoptose, dessa vez de oligodendrócitos, associado ao agravamento da degeneração axonal e demielinização crônica, conhecido como degeneração Walleriana (Liu et al., 1996; Hausmann, 2003).

As células apoptóticas não são encontradas apenas no local da lesão, como também onde aparentemente a ME estaria intacta (Hagg e Oudega, 2006), principalmente nos tratos ventrocraniais, responsáveis pela parte motora. Isso ocorre possivelmente pelo edema que também acarreta degeneração mielínica em diversas desordens do sistema nervoso central (Li et al., 1999).

A lesão inicial, portanto, se expande progressivamente dentro de poucas horas, causando perdas de segmentos funcionais ainda maiores (Hausmann, 2003). Nessa fase, processos que resultam do insulto

mecânico inicial afetam células distantes da lesão original tanto no sentido retrógrado quanto anterógrado com características de desmielinização parcial ou total responsável pelos déficits de condução. Além disso, podem-se desenvolver cistos locais (Zhang et al., 1997), cicatriz astrogliar extensa (Rossignol et al., 2008), dissolução da substância cinzenta, deposição de tecido conectivo e gliose, degeneração axonal pela diminuição da perfusão local, degeneração neuronal (Kikukawa et al., 1999), obstrução da drenagem venosa e os efeitos diretos da pressão sobre a função celular (Talach et al., 2004; Grill, 2005; Severo et al., 2007).

recuperação depois do TMA. A substância branca remanescente contém porções intactas dos tratos ascendentes sensoriais e descendentes motores, possibilitando a recuperação funcional. Entretanto, dos primeiros minutos a horas após o trauma inicia-se o processo degenerativo secundário ao trauma inicial, proporcional à magnitude do impacto (Hall e Springer, 2004). Portanto, o tratamento precoce que puder prevenir ou melhorar os danos teciduais secundários, mesmo em pequenas proporções, pode melhorar a recuperação funcional drasticamente (Taoka e Okajima, 1998).

A quantidade de tecido lesionado na ME tem sido fortemente relacionada com a

Quadro 1– Eventos secundários à lesão inicial, após o trauma medular agudo.

Eventos vasculares	Quebra da barreira hematoespinal
	Formação de edema
	Isquemia e hipóxia
	Liberação de substâncias vasoativas
	Alteração da perfusão da medula
Eventos bioquímicos	Excitotoxicidade
	Formação de radicais livres e óxido nítrico
	Liberação de proteases
	Danos mitocondriais
	Depleção de energia
Eventos celulares	Invasão de neutrófilos
	Ativação da micróglia residente
	Invasão de macrófagos periféricos
	Infiltração de linfócitos
	Ativação de astrócitos
	Apoptose de oligodendrócitos
	Degeneração walleriana

(Adaptado de Hausmann, 2003).

4.1.2 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; Triggle, 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 A_2 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).

4.1.3 Uso de bloqueadores de canais de cálcio voltagem dependentes na neuroproteção

O conceito de neuroproteção é baseado na atenuação dos processos patofisiológicos, preservação da função axonal com consequente prevenção da morte célula, 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 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 e 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).

Desde a descoberta de que há interação de toxinas com os CCVD, o seu uso nas afecções neurológicas vem sendo investigado (Olivera et al., 1987; Greenberg, 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 e Angus, 1996; Kochegarov, 2003). Já os bloqueadores tipo P e Q estão presentes na medula (Wright e Angus, 1996) e, o primeiro induz uma resposta discreta quando utilizado na injúria medular (Diaz e Dickenson, 1997).

Especula-se que o bloqueio dos CCVD protegeria a integridade estrutural dos oligodendrócitos e astrócitos devido à presença de canais do tipo N em suas membranas. A proteção dos oligodendrócitos e de sua mielina propiciaria uma melhor preservação na condução axonal após o trauma medular. Com o bloqueio desses canais nos astrócitos, também protegeria sua habilidade em tamponar o K^+ extracelular (Agrawal et al., 2000). Além disso, foi comprovado que o bloqueio dos canais do tipo N levam a efeitos anti-inflamatórios e analgésicos superiores aos dos opióides (Camerino et al., 2007), já que a mobilização do cálcio controla diversos neurotransmissores e polipeptídeos que mediam a resposta dolorosa (Triggle, 2003).

4.2 Uso de toxinas como agentes terapêuticos

Historicamente, as descobertas de produtos naturais se mostraram como excelentes fontes terapêuticas. Como resultado, pesquisadores continuam a investigar agentes naturais com moléculas biologicamente ativas (Shen et al., 2000). Nos últimos anos, pesquisas vem sendo realizadas para identificação de peptídeos neuroativos e neuroprotetores derivados de diferentes espécies venenosas que possam ser aplicados clinicamente. Em especial, devido à alta seletividade dos venenos a diversos receptores e canais iônicos, as toxinas têm sido utilizadas como ferramentas de pesquisas, moduladores e reguladores da hiperexcitabilidade (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 e Jones, 1996).

O veneno de escorpiões é constituído por substâncias bio-ativas com especificidade para canais iônicos, enzimas, nucleotídeos, lipídeos, mucoproteínas, glicosaminoglicanos e histamina (Kapoor, 2010). Pesquisas giram em torno de suas toxinas e o uso na epilepsia (Jiang e Zhang, 1999), paralisia facial, hemiplegia e analgesia (Guan et al., 2001).

O veneno das aranhas possui uma mistura de toxinas que agem diretamente em diversos alvos moleculares como receptores neuronais, canais iônicos e proteínas na membrana pré-sináptica envolvida com liberação de neurotransmissores (Rajendra et al., 2004). Possuem dois principais grupos, as ω -agatoxinas, que são seletivas antagonistas de CCVD, e as μ -agatoxinas que ativam canais para sódio neuronais (Uchitel, 1997). Já são relatados com características anti-convulsivantes (Takazawa et al., 1996) e neuroprotetoras na isquemia cerebral (Pinheiro et al., 2009).

O veneno das cobras possui componentes proteicos e não proteicos (Kapoor, 2010), com alta especificidade e afinidade a organizações funcionais essenciais de células e tecidos. O uso de determinadas frações tóxicas vem sendo utilizado há séculos, como agente fibrinolítico, analgésico, antiparalisante em junções neuromusculares e em doenças cardiovasculares (Pal et al., 2002).

4.2.1 As neurotoxinas de caramujos marinhos

Um dos produtos naturais mais intrigantes é aquele derivado de caramujos marinhos, tipicamente encontrados sobre ou nas proximidades dos corais em águas tropicais em todo o mundo (Shen et al., 2000).

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 e Teichert, 2007).

Atualmente, conhece-se cerca de 10 superfamílias de conotoxinas, sendo que cada uma possui alta seletividade para um alvo molecular específico como canais iônicos ou receptores (Olivera e Cruz, 2001). Elas são subdivididas em diversas famílias ou classes. As ômega-conotoxinas são específicas para canais de cálcio voltagem dependentes, inibindo a liberação de neurotransmissores. A alfa- e psi-conotoxina bloqueiam receptores nicotínicos, causando o bloqueio neuromuscular, enquanto a mu- e delta-conotoxina são seletivas a canais para potássio voltagem dependentes, os quais aumentam a excitabilidade neuronal. Além dessas, a gama-conotoxina inibe canais iônicos inespecificamente e a sigma-conotoxina antagoniza receptores de serotonina (Livett et al., 2004; Mehdiratta e Saberwal, 2007; Olivera e Teichert, 2007).

A toxina *Conus* é composta por pequenos peptídeos, denominados conopeptídeos, variando o tamanho de oito a 31 aminoácidos, enriquecida com pontos de dissulfeto (Shen et al., 2000). Esses peptídeos vem se mostrando promissores no desenvolvimento de novas terapias e já são utilizados no tratamento de desordens neurológicas como epilepsia (Malmberg et al., 2003), Parkinson (Zoli et al., 2002), Alzheimer (Marchi et al., 2002) e síndromes neuropáticas de dores crônicas

(Livett et al., 2004; Norton e Olivera, 2006; Mehdiratta e Saberwal, 2007; Callaghan et al., 2008).

A conotoxina GVIA, proveniente do *Conus geographus*, é a toxina mais utilizada como ferramenta na neurociência, já que inibe a transmissão sináptica ao bloquear os canais para cálcio do tipo N (Olivera et al., 1994). Além disso, tem sido estudada por seus efeitos analgésicos e neuroprotetores (Nebe et al., 1998).

As ω -conotoxinas provenientes do *Conus magus*, por sua especificidade em canais de cálcio, atualmente é alvo para terapias direcionadas contra dores crônicas, danos isquêmicos cerebrais, algumas formas de epilepsia e ataxia. Com o bloqueio desses canais, previne-se a liberação excessiva de neurotransmissores, atuando como protetores da hiperexcitabilidade e supressores da atividade epileptiforme (Rajendra et al., 2004). Dentro dessa classe, a MVIIA, bloqueadora dos canais para cálcio tipo N, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* como droga terapêutica, pelas propriedades analgésicas, sendo utilizada em condições neurológicas agudas ou crônicas (Olivera et al., 1994; Greenberg, 1997; Bowersox e Luther, 1998; Bingham et al., 2010). Além disso, mostrou significativa neuroproteção na isquemia cerebral (Valentino et al., 1993). Dentro desse mesmo grupo, a MVIIC tem chamado a atenção por inibir os canais para cálcio do tipo N e P/Q (Martin-Moutot et al., 1995; Maroto et al., 1996), mostrando efeito neuroprotetor em isquemia cerebral (Kochegarov, 2003).

Dentre os efeitos colaterais do uso de toxinas, relata-se que GIVA e MVIIA em altas concentrações geram tremor generalizado, déficit locomotor, 60 minutos após aplicação intratecal e retorno a normalidade em 24 horas (Malmberg e Yaksh, 1994; Hama e Sagen, 2009). Além disso, GIVA promove hipotensão e

alterações cardiovasculares (Whorlow et al., 1996).

4.2.1.1 A ω -conotoxina MVIIC

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) relatam 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.

Estudos em isquemias cerebrais (Liu et al., 1996; Uchitel, 1997; McDonough et al., 2002; Pinheiro et al., 2009) e medulares (Wright e Angus, 1996; Imaizumi et al., 1999) *in vitro* demonstraram que a MVIIC reduziu significativamente o influxo do cálcio através dos CCVD do tipo N e P/Q. Além disso, Turner e colaboradores (1995) relatam uma expressiva diminuição na liberação do glutamato. Entretanto, outro estudo revela que a alteração no nível do glutamato não mostrou proteção na isquemia cerebral *in vivo*, e apresentou-se tóxica (Valentino et al., 1993) possivelmente porque a alta redução desse neurotransmissor possa ter levado a neurotoxicidade (Kobayashi e Mori, 1998).

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 e Angus, 1996). Além disso, a MVIIC mostrou uma inibição significativa de neurotransmissor quando comparado com o uso da MVIIA (Gaur et al., 1994).

Embora algumas toxinas como MVIIA e GVIA causem tremor generalizado, a MVIIC apresenta essa alteração na dose de 300 pmol, associada à fraqueza muscular, problemas de coordenação, andar em círculos em poucos minutos após a injeção intracerebroventricular. Doses inferiores a 100 pmol produzem, eventualmente, paralisia flácida (Dalmolin et al., 2011) e arqueamento dorsal (Hillyard et al., 1992).

Observa-se a ausência de pesquisas *in vivo* com a MVIIC e a importância de se avaliar seus efeitos neuroprotetores, frisando a necessidade desse trabalho em investigar os seus efeitos no TMA.

4.3 Modelo experimental

4.3.1 Estudo *in vivo*

Autores consideram o estudo *in vitro* de excelência, por ter um controle preciso do ambiente extracelular, acesso fácil a células, baixo custo, além da eliminação da dor experimental no pós-trauma e da necessidade de cuidados pós-operatórios dos animais (Krassioukov et al., 2002). Todavia, o estudo *in vivo*, apesar da complexidade do organismo, possibilita testar a real eficácia de tratamentos em potencial e sua aplicabilidade, com a vantagem de observação clínica do paciente e de investigação de diversos efeitos do tratamento (Blight, 2000; Rossignol et al., 2008).

Os ratos são os modelos laboratoriais mais utilizados para o estudo do tratamento do TMA. Eles são relativamente baratos, de fácil manuseio, com tamanho adequado, que propicia a mensuração de parâmetros fisiológicos, com baixo índice de infecção e

possibilitando o uso de um número grande de animais (Taoka e Okajima, 1998; Vanický et al., 2001; Talac et al., 2004).

4.3.2 Modelo do trauma

Diversos modelos de trauma medular *in vivo* têm sido utilizados extensivamente para investigação de mecanismos fisiopatológicos associados a formas do neurotrauma e testes terapêuticos, a fim de minimizar os efeitos secundários (Blight, 2006). Estudos pré-clínicos do trauma medular agudo necessitam de um modelo reprodutível, consistente, confiável e que mimetize as características do trauma que ocorrem nos animais e humanos (Taoka e Okajima, 1998; Hausmann, 2003). Investigadores têm descrito diversos modelos de TMA em ratos, com fácil reprodutibilidade e que podem ser usados em estudos terapêuticos (Vanický et al., 2001). Entretanto, requerem além da experiência cirúrgica, equipamentos facilitadores para sua realização (Talach et al., 2004). Os mais frequentemente utilizados são técnica de queda de peso (Allen, 1911), dispositivos eletromagnéticos (Behrmann et al., 1992), técnica *blocking-weight* (Hotlz et al., 1990), clip de aneurisma (Rivlin and Tator, 1978), técnicas contusivas e compressivas como balão extradural (Tarlov et al., 1953), além de transecção da medula espinal (Krassioukov et al., 2002).

Os modelos contusivos e compressivos possibilitam interferir nos processos iniciais seguidos do 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 (Talach et al., 2004; Blight, 2006). Por esses motivos, alguns modelos de impactadores têm sido implementados com o conceito de compressão da ME, atentando para os danos teciduais controlados pela força aplicada sobre a superfície da medula espinal (Blight, 2006). Torres et al. (2010) relatam a utilização do aparelho estereotáxico modificado da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais com o peso de 70,5 g como de fácil execução, baixo custo, eficaz e capaz de reproduzir lesões simétricas e homogêneas.

Como grande parte da rotina médica veterinária e humana da injúria medular decorre da compressão (Taoka e Okajima, 1998), o modelo compressivo é o mais indicado para mimetizar tal evento.

5. MATERIAL E MÉTODOS

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

5.1 A ω -conotoxina MVIIC

A MVIIC¹ foi fornecida pelo professor Marcus Vinícius Gomez da Faculdade de Medicina da UFMG. Ela foi, de acordo com indicação comercial, dissolvida em água destilada, centrifugada para dissolução completa. Posteriormente, foi alíquotada em eppendorfs e armazenada a -20°C para que a toxina não tenha a potência da alterada.

¹Conotoxin MVIIC (ω -)® - Latoxan. Valence, France.

5.2 Animais

Foram utilizados 36 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, com cinco meses de idade, pesando em média 440 g, provenientes da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos no Biotério da EV/UFMG, em caixas plásticas, com quatro ratos em cada, e submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, com temperatura controlada. Eles receberam ração comercial para roedores² e água *ad libitum* por todo o período. Além disso, antes do início experimental, foram desverminados com tiabendazol³ (100 mg/kg, VO) e submetidos a 14 dias de aclimatação.

5.3 Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais receberam antibioticoprofilaxia com cefalotina sódica⁴ (60 mg/kg, IV) e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol⁵ (4 mg/kg, SC), 20 minutos antes da cirurgia. Em seguida, realizou-se indução anestésica em câmara com isoflurano⁶, e manutenção do plano anestésico cirúrgico com mesmo agente, fornecido por meio de máscara facial em sistema de não-reinalação (Figura 1A).

Após a tricotomia da região dorsal, os ratos foram fixados em decúbito esternal em superfície de vidro e posicionados no aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFMG. Esse aparelho consta de uma prancha perfurada elevada com um suporte removível no qual se encaixa uma haste

²Nuvilab CR-1® - Nuvital Nutrientes S/A. Colombo, PR, Brasil.

³Thiaben® - Uci-Farma. São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

⁴Keflin® - ABL, Antibióticos do Brasil Ltda. Cosmópolis, SP, Brasil.

⁵Tramadol – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁶Isoflurane - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

Quadro 2 – Descrição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento específico.

Grupo	Denominação	Número de animais	Descrição
CTN	Controle negativo	6	Os animais foram submetidos à laminectomia dorsal de T12.
PLA	Controle positivo	6	Os animais foram submetidos ao trauma medular e receberam injeção intralesional de 2µL de água estéril no epicentro da lesão.
G15	MVIIC 15pmol	6	Os animais foram submetidos ao trauma medular e receberam injeção intralesional de 0,25µL MVIIC (15pmol) + 1,75µL de água estéril no epicentro da lesão.
G30	MVIIC 30pmol	6	Os animais foram submetidos ao trauma medular e receberam injeção intralesional de 0,5µL MVIIC (30pmol) + 1,5µL de água estéril no epicentro da lesão.
G60	MVIIC 60pmol	6	Os animais foram submetidos ao trauma medular e receberam injeção intralesional de 1µL MVIIC (60pmol) + 1µL de água de estéril no epicentro da lesão.
G120	MVIIC 120pmol	6	Os animais foram submetidos ao trauma medular e receberam injeção intralesional de 2µL MVIIC (120pmol) no epicentro da lesão.

de aço inoxidável acoplada a um peso de 70 gramas (Figura 1B).

Posteriormente à anti-sepsia com iodopovidona degermante⁷ e solução de álcool iodado, foram realizadas incisões cutâneas, subcutâneas na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica à primeira lombar, e dos músculos epiaxiais, afastando-os lateralmente. Realizou-se a osteotomia do processo espinhoso de T12, com auxílio da pinça de *Kocher*, e a laminectomia dorsal com *drill* pneumático⁸ neurológico e pinça hemostática de *Halsted*, sob irrigação contínua com solução fisiológica⁹ para evitar o aquecimento dos tecidos (Figura 1C). O trauma mecânico foi obtido pela compressão da medula espinal (Figura 1E) com um peso de 70,5 g mantido sobre a dura-máter exposta, por cinco minutos (0,5 g da haste que suporta o peso de 70 g

(Figura 1D). Cinco minutos após o trauma, os animais receberam, ou não, a toxina ou água estéril conforme protocolo de cada grupo (Quadro 2).

Os cinco grupos PLA, G15, G30, G60 e G120 receberam o tratamento específico no epicentro da lesão com uma injeção à velocidade de 0,4µL/min, com auxílio da seringa de Hamilton de 10µL conectada a uma sonda de polietileno (PE10) e agulha gengival 30G (Figura 1F). Após a aplicação, realizou-se a aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto empregando-se sutura padrão simples contínua com fio inabsorvível sintético, polipropileno 3-0¹⁰. A dermorrafia foi feita com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio.

⁷Biotrat® - LMFarma. São José dos Campos, SP, Brasil.

⁸With ECCOS® Aesculap – Laboratórios B. Braun S.A. São Gonçalo, RJ, Brasil.

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

¹⁰Prolene®, Ethicon Endo Surgery. São Paulo, SP, Brasil.

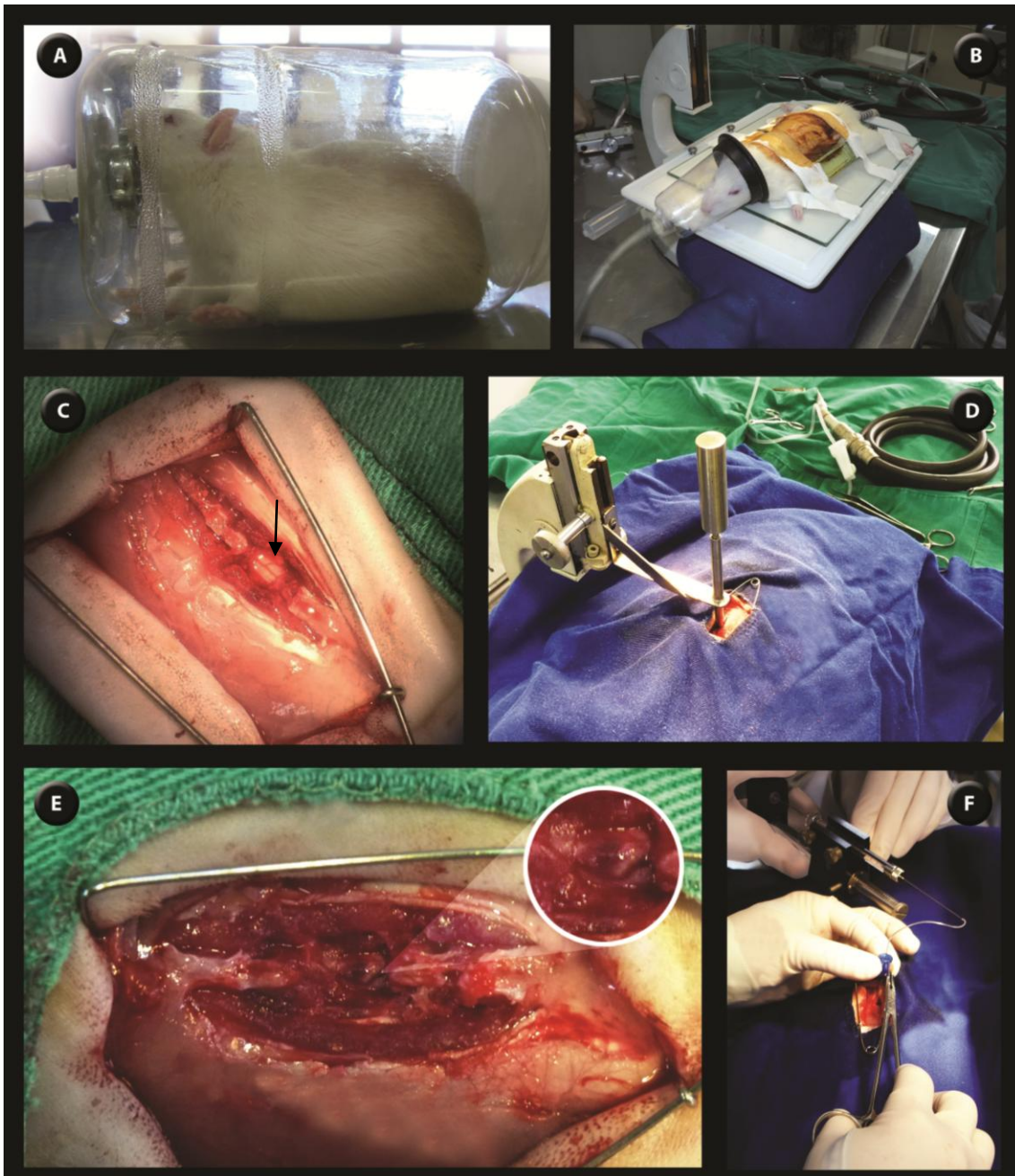


Figura 1 - Fotografias dos procedimentos anestésico e cirúrgico do trauma medular experimental realizado em ratos Wistar tratados com a ω -conotoxina MVIIC aplicada intralésionalmente. A) Animal na câmara de indução anestésica com isoflurano. B) Animal posicionado em decúbito esternal no suporte do aparelho estereotáxico com realização da antissepsia. C) Exposição da medula espinal (seta) após a laminectomia dorsal. D) Realização do trauma medular com o emprego do aparelho estereotáxico desenvolvido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. E) Foco hemorrágico (em destaque) após o trauma medular com o peso de 70,5 g. F) Aplicação intralésional do tratamento com seringa de Hamilton, cinco minutos após o trauma.

Os animais foram mantidos em caixas aquecidas, à temperatura de 37°C, com oxigenoterapia até completa recuperação anestésica. Eles receberam cloridrato de tramadol¹¹ (2mg/kg, VO) a cada oito horas por três dias, cefalexina¹² (60mg/kg, VO) a cada 12 horas por cinco dias e massagem abdominal para esvaziamento vesical três vezes ao dia. Os pontos de pele foram removidos sete dias após o procedimento cirúrgico. A eutanásia foi realizada oito dias após o procedimento cirúrgico.

5.4 Avaliação da capacidade motora

A avaliação da capacidade motora foi realizada 24 horas antes da intervenção cirúrgica e diariamente, por sete dias, após a cirurgia, adotando-se a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996). Para tanto, observou-se o padrão locomotor dos animais em um campo aberto circular de um metro de diâmetro, sem obstáculos. Durante esta avaliação, os animais foram filmados por quatro minutos e os vídeos foram, posteriormente, analisados por dois avaliadores que desconheciam os grupos a que os animais pertenciam, atribuindo um escore que variava de zero a 21 (Quadro 3).

5.5 Avaliação hematológica, bioquímica e urinálise

Para as avaliações do perfil hematológico e bioquímico, foram coletados 1,5ml de sangue, sendo metade colocado em frasco com EDTA e o restante sem conservantes, antes do procedimento cirúrgico pela veia da cauda e 3ml no dia da eutanásia por cardiopunção. A avaliação hematológica foi realizada em contador eletrônico¹³. O volume globular foi determinado utilizando

centrífuga para técnica do microhematócrito e quantificação em tabela padrão, 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 bioquímico¹⁴, seguindo protocolo de kits comerciais de diagnósticos¹⁵.

Para urinálise, aproximadamente 60 μ l de urina foram coletadas, por massagem vesical manual, imediatamente antes da intervenção cirúrgica (T0), 6 horas (T1) e 24 horas (T2) após o trauma e no dia da eutanásia para quantificação de hemoglobina e albumina (Thermo Plat TP Analyzer Basic).

Todas as avaliações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da EV/UFMG.

¹¹Tramadon® – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

¹²Cefalexina suspensão® - Medley S.A. Indústria farmacêutica. Sumaré, SP, Brasil.

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

¹⁴Cobas Mira® - Roche. Jacarepaguá, RJ, Brasil.

¹⁵Biosystems S.A. Barcelona, CT, Espanha.

Quadro 3 – Descrição dos escores para avaliação da capacidade motora.

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 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 ($\leq 50\%$), frequente (51-94%) ou constante (95-100%) sem passada plantar.
10	Suporte de peso corporal ocasional ($\leq 50\%$) 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 do peso frequente (51-94%) a constante (95-100%) na passada plantar e ocasional ($\leq 50\%$) 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 do 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 ($\leq 50\%$).
15	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) e ausência ou ocasional ($\leq 50\%$) 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.

(Basso et al., 1996)

5.6 Avaliação anatomopatológica extraneural

Oito dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com sobredose de tiopental sódico¹⁶ (100 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos a perfusão transcardíaca com 300 ml de solução fisiológica, seguida por fixação com 300 ml de solução de formaldeído¹⁷ a 10%, com auxílio de uma bomba de infusão peristáltica em fluxo de 350ml/hora (Bomba de infusão LF 2001). Amostras do músculo longíssimo lombar, coração, pulmões, fígado, baço, rins, bexiga, intestino, pâncreas, adrenal e cérebro foram coletadas e fixadas em formol 10% durante 24 horas e processados pela técnica de rotina para inclusão em parafina (Luna, 1968). Posteriormente, foram feitos cortes histológicos de 4µm e coloração pela técnica de hematoxilina-eosina¹⁸ (HE), para avaliação morfológica em microscópio óptico.

Além da avaliação morfológica, a bexiga foi avaliada quanto a presença de reação inflamatória e hemorragia e o rim quanto a existência de material proteináceo. Foram graduados em nove graus, de acordo com padrão histológico de intensidade da lesão e sua extensão (discreto focal, discreto multifocal, discreto difuso, moderado focal, moderado multifocal, moderado difuso, acentuado focal, acentuado multifocal, acentuado difuso).

5.7 Avaliação anatomopatológica da medula espinal

Após a eutanásia dos animais, a medula espinal (ME) foi dissecada e um segmento medular de aproximadamente 2,7cm, incluindo o epicentro da lesão e regiões adjacentes, foi fixado em solução de formaldeído 10%, por 24 horas.

¹⁶Cobas Mira® - Roche. Jacarepaguá, RJ, Brasil.

¹⁷Formaldeído® - Synth. Diadema, SP, Brasil.

¹⁸Hematoxilina-eosina, Sigma-Aldrich, MO, USA.

Posteriormente, processaram-se histologicamente todos os fragmentos pela técnica de rotina para inclusão em parafina. Ela foi então dividida em três segmentos: cranial, epicentro e caudal. Secções transversais de 4µm de cada segmento foram coradas pela técnica de HE para avaliação morfológica em microscópio óptico, sendo realizada a descrição histológica de características de degenerações axonal, mielínica e neuronal, presença de infiltrado inflamatório e focos hemorrágicos.

5.8 Avaliação imunoistoquímica da medula espinal

Para avaliação imunoistoquímica da medula espinal, secções de 4µm craniais e caudais ao epicentro foram montadas em lâminas gelatinizadas e, posteriormente, desparafinizadas em xilol e hidratadas em sequência gradual de alcoóis. Foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato a 0,2%, bloqueio das peroxidases endógenas com solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%, bloqueio de proteínas com soro bloqueio¹⁹, incubação com anticorpo primário monoclonal NeuN²⁰ *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as secções foram incubadas com anticorpo secundário universal²¹ por 45 minutos, seguida pelo complexo estreptoavidina-biotina peroxidase²² por 30 minutos. A atividade da peroxidase foi revelada com 3,3'diaminobenzidina (DAB)²³ colocada por 27 segundos. Obteve-se a contra coloração dos núcleos celulares com hematoxilina de Harris. Em todas as reações, utilizaram-se controles positivos e negativos, verificando a especificidade da marcação.

¹⁹Protein Block (Serum Free), DAKO, EUA.

²⁰Anti-NeuN, Chemicon. Temecula, CA, USA.

²¹LSABTM, Link for AP/HRP, DAKO, EUA.

²²LSABTM, Streptavidin/HRP, DAKO, EUA.

²³DAB, DAKO, EUA.

A contagem de células marcadas com NeuN foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de 40X, com auxílio de uma gráticula reticulada de 121 pontos²⁴. A contagem de corpos neuronais marcados foi feita em 10 campos nas regiões craniais e caudais ao epicentro, abrangendo toda a substância cinzenta, sendo determinada a média de células marcadas/campo.

5.9 TUNEL

A fragmentação de DNA das células nas substâncias cinzenta e branca foi detectada utilizando-se a técnica de TUNEL²⁵ (*TdT mediated dUTP nick endlabelling*) de acordo com *kit* comercial. Secções de 4µm craniais e caudais ao epicentro foram montadas em lâminas gelatinizadas e posteriormente, desparafinizadas em xilol e hidratadas em sequência gradual de alcoóis. Foi realizada permeabilização da amostra com 0,5% de triton X-100 em água destilada, tratamento com proteinase K, bloqueio das peroxidases endógenas com solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%. Após a lavagem com solução TBS, foram incubadas com *TdT Equilibration Buffer* seguido do *TdT Labeling Reaction Mixture* a 37°C. Após 90 minutos, a reação foi bloqueada com *Stop Solution*, adicionado *Blocking Buffer* e incubado com anticorpo 1x conjugado. Finalmente, as lâminas foram marcadas com DAB e contracoradas com *Methyl Green*. Em todas as reações foram utilizados controle positivo e negativo.

A quantificação dos tipos celulares marcados pelo TUNEL foi realizada pela microscopia óptica, com auxílio da gráticula de 121 pontos, em objetiva de 40X. A contagem de células marcadas foi feita em 15 campos nas regiões craniais e caudais ao epicentro, abrangendo toda a substância branca e cinzenta, sendo

determinada a média de células marcadas/campo.

5.10 Análises estatísticas

O delineamento foi inteiramente casualizado.

Os escores da avaliação da capacidade motora foram comparados entre os grupos, dois a dois em cada dia, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, e entre os dias, pelo teste de Friedman. A classificação dos órgãos foi comparada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn.

Os dados das variáveis hematológicas e bioquímicas foram comparados pelo teste t pareado. A comparação das médias dos dados da urinálise foi realizada pelo teste de Bonferroni. Já as médias de neurônios marcados com anti-NeuN foram transformadas pela função $\text{Log}(x)$, entretanto não seguiam a normalidade, sendo comparados os valores brutos pelo teste de Kruskal-Wallis. As médias de células marcadas pela técnica de TUNEL foram submetidos à análise de variância, com comparação de médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK). A análise estatística foi realizada com auxílio do pacote estatístico *GraphPad Prism 5 for Windows*, sendo adotado nível de confiança de 95%.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo de lesão medular aguda experimental aplicado foi um método já estabelecido por Torres e colaboradores (2010), que possibilita a reprodução de um trauma moderado a grave, de fácil execução, baixo custo e padronizado. O peso de 70,5 g diretamente sobre a duramáter na região espinal de T12, por cinco minutos, causou paraplegia grave dos membros pélvicos em todos os animais, sendo que 79,16% apresentaram retenção

²⁴Olympus.

²⁵FragEL® DNA Fragmentation Detection Kit TdT Enzyme, Merck, Darmstadt, Germany.

urinária (G15: 83,3%; G30: 50%; G60: 100% e G120: 75%) e 54% hematuria (G15: 66,6%; G30: 50%; G60: 83% e G120: 33%). Escolheu-se este peso visto que lesões muito moderadas levam à rápida recuperação espontânea, dificultando avaliar o potencial terapêutico dos medicamentos. Em contrapartida, lesão extremamente grave limita a avaliação funcional e pode mascarar o efeito da droga (Onifer et al., 2007). Além disso, a lesão compressiva por cinco minutos, efetuada nesse estudo, mimetiza quadros similares daqueles vistos em humanos (Lu et al., 2000), gerando retenção urinária, na qual, a massagem da bexiga diariamente foi essencial para prevenção de complicações secundárias (Hung, 2007).

Nas medicinas veterinária e humana, estratégias terapêuticas para recuperação completa após o trauma medular continuam sendo pesquisadas. Até o momento, não há medicação efetiva que solucione essa afecção. Um dos mecanismos de evitar a progressão da lesão secundária no 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.

Com o intuito de testar a real eficácia da MVIIC, sua aplicabilidade, observação clínica e possíveis efeitos colaterais, esse estudo foi realizado *in vivo* assim como Blight (2000) e Rossignol e colaboradores (2008) também o fizeram. Essa espécie foi escolhida por ser a mais frequentemente utilizada em experimentos de TMA, possuir baixo custo, acessibilidade e ser resistente a experimentação (Taoka e Okajima, 1998; Vanický et al., 2001; Talac et al., 2004), confirmado pelo fato de que nenhum animal foi a óbito, antes da eutanásia. Esse é o primeiro estudo a avaliar a MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo.

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). Além disso, não foi possível avaliar os efeitos da MVIIC sobre déficit locomotor, paralisia flácida dos membros pélvicos ou diminuição da resposta de retirada da cauda, como também é descrito por esses autores, pois são sinais clínicos semelhantes ao do trauma medular.

Na literatura, relata-se em sua maioria, o uso da MVIIC em estudos *in vitro*. Doses variáveis de 75 nM a 10 μ M mostraram eficácia em bloquear os CCVD do tipo P/Q e, em doses mais elevadas, também o tipo N (Wright e Angus, 1996; Imaizumi et al., 1999). Todavia, Dalmolin e colaboradores (2011) mostraram que a MVIIC na dose de 100 pmol aplicada intracerebroventricular *in vivo*, além de possuir efeitos antinociceptivos, apresentaria, mesmo que eventualmente, efeitos deletérios. Nesse estudo, optou-se pelo emprego das doses de 15, 30, 60 e 120 pmol em decorrência da variabilidade de doses citadas na literatura que, quase sempre, trata-se de estudos *in vitro*, e pelo fato de que a dose de 100 pmol *in vivo* já apresenta efeitos bloqueadores dos CCVD e alguns efeitos nocivos.

A escolha do tempo da eutanásia foi baseada no critério dos picos de morte celular por apoptose secundária ao trauma, que ocorrem nos tempos de oito, 24 horas e do sétimo dia após a injúria inicial (Li et al., 1996; Lu et al., 2000).

6.1 Avaliação da capacidade motora

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade. Após a lesão medular, todos os grupos submetidos ao trauma apresentaram paraplegia grave, sendo que nenhum se recuperou totalmente,

apesar da melhora gradativa com o passar dos dias. De acordo com a avaliação do BBB, houve diferença estatística entre o grupo CTN e demais grupos, à exceção do G15 o qual também difere dos grupos submetidos ao trauma ($p < 0,05$) (Figura 2). Além disso, notam-se diferenças entre os dias nos grupos PLA, G15, G30 e G60 ($p < 0,05$), ressaltando que o G15 se diferencia do primeiro dia pós-trauma aos seis dias, enquanto os outros grupos submetidos ao trauma diferem apenas ao sétimo dia (Figura 2 e 3).

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 paralisia, 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.

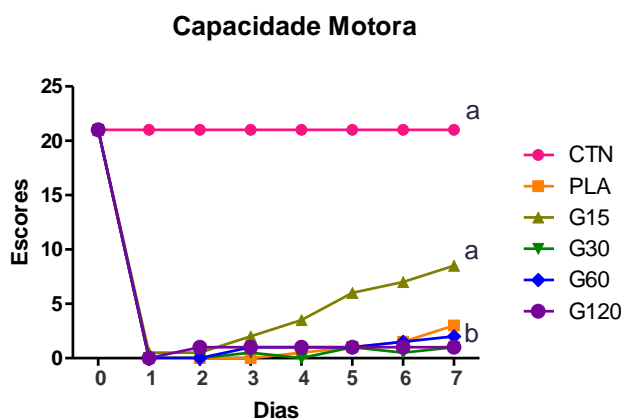


Figura 2 - Gráfico da avaliação da capacidade motora mostrando as medianas dos escores diários de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Observa-se que a mediana do grupo CTN difere estatisticamente de todas dos grupos traumatizados, à exceção do G15 ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).

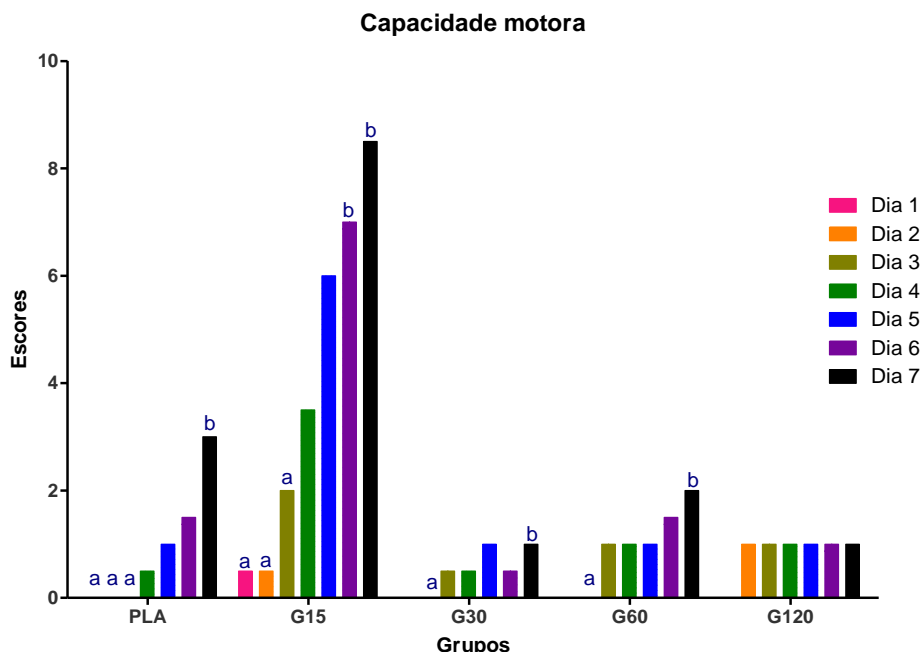


Figura 3 - Gráfico da avaliação da capacidade motora mostrando as medianas dos escores diários de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).

Por ser um fármaco inédito experimental *in vivo* em trauma medular, não há relatos sobre a recuperação da capacidade motora na literatura. Como foi observada diferença estatística entre o G15 e os grupos submetidos ao trauma e sua mediana não diferiu do CTN, conclui-se assim que o G15 teve uma melhor recuperação motora comparada aos grupos submetidos ao trauma no período de oito dias de avaliação, aproximando-se dos escores dos animais submetidos apenas a laminectomia.

6.2 Avaliação hematológica, enzimas hepática e renal e urinálise

6.2.1 Avaliação hematológica

Os valores hematológicos em ratos podem ser influenciados por diversos fatores, como linhagem, idade, sexo, espécie e método de coleta (Thrall, 2004). Assim, a fim de minimizar essas influências foram

utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, com cinco meses de idade e as coletas realizadas com o mesmo tipo de contenção no tempo antes e oito dias após o trauma.

Os valores médios de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), plaquetas e proteína total estão apresentados na figura 4 e tabela 1.

Em relação ao número de hemácias (figura 4), foi observada diferença significativa entre os tempos nos grupos CTN e PLA ($p < 0,05$). Observa-se que nos outros grupos o alto desvio padrão não permitiu que encontrasse diferença significativa. Encontrou-se, também, diferenças entre os tempos de todos os grupos quanto aos valores de hematócrito, hemoglobina e

plaquetas. Além disso, os valores médios de CHGM diferiram entre os tempos dos grupos CTN e G30.

O exame hematológico auxilia a verificar possíveis alterações causadas por toxinas no organismo e sua gravidade. Além disso, efeitos tóxicos sobre a medula óssea são refletidos nesse teste, por ser responsável pela formação de todos os elementos sanguíneos (Faro et al., 2008).

Não há relatos na literatura a respeito dos efeitos da MVIIC no organismo. Nesse experimento, observou-se aumento no número de hemácias, hematócrito (Ht) e da concentração de hemoglobina, o que pode ser decorrente do estresse do pós-operatório e também da eutanásia no momento da contenção e anestesia dos animais (Weiss et al., 2010), levando a uma contração esplênica com consequente liberação de hemácias oxigenadas. Todavia, mantiveram dentro os valores fisiológicos para espécie como mostrado na tabela 1 (Giknis e Clifford, 2008).

Além disso, a elevação do Ht pode estar relacionada ao estado um pouco debilitado dos animais, que reduzem o consumo de água e se desidratavam. A desidratação não foi observada clinicamente, mas notava-se uma menor ingestão de água refletida nos níveis das garrafas. Contudo, frente ao processo de desidratação, há o aumento da concentração da proteína plasmática (Soto et al., 2008), o que não foi observado nesse estudo, sugerindo que provavelmente essa alteração esteja relacionada ao estresse do pós-operatório e da eutanásia. Mesmo assim, os Ht mantiveram-se próximos aos valores de referência da espécie (40-50%) (Bistner et al., 2000).

Os valores do volume globular médio (VGM) e hemoglobina globular média (HGM) não mostraram diferença entre os

tempos ou os grupos. Além disso, apesar dos valores médios de CHGM terem mostrado diferença entre os tempos, eles se mantiveram dentro os valores normais para espécie (31,9-38,5 g/dL) (Giknis e Clifford, 2008).

O aumento tardio das plaquetas é um achado comum em pacientes que sofreram intervenção cirúrgica provavelmente pelos danos teciduais e inflamação. A relevância desse acontecimento ainda não é bem elucidada (Bunting et al., 1991; Valade et al., 2005; Salim et al., 2009). Apesar desse fato, os parâmetros mantiveram-se dentro dos padrões fisiológicos para a espécie ($574-1253 \times 10^3$ células/ μL) (Giknis e Clifford, 2008).

As proteínas possuem inúmeras funções no organismo e sua dosagem auxilia no diagnóstico e prognóstico do estado de hidratação, inflamação, infecção, estado nutricional e alterações na síntese proteica (Santana et al., 2008). No presente trabalho, os valores absolutos de proteína total, na figura 4 e tabela 3, não mostraram diferenças entre os tempos e grupos.

Não há relatos da avaliação hematológica da MVIIC, o presente estudo mostra que esta não causa anemia, hemólise, lesões vasculares ou interferências na medula óssea nas doses utilizadas quando aplicado pela via intralesional.

A contagem de leucócitos totais está representada na figura 5 e tabela 2. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da contagem total dos leucócitos no PLA entre os tempos da coleta, não ultrapassando os limites máximos para espécie. Essa leucocitose pode ser atribuída ao estresse promovido pela contenção física no momento da eutanásia. Frente ao estresse agudo, a liberação endógena de glicocorticóides promove um aumento da

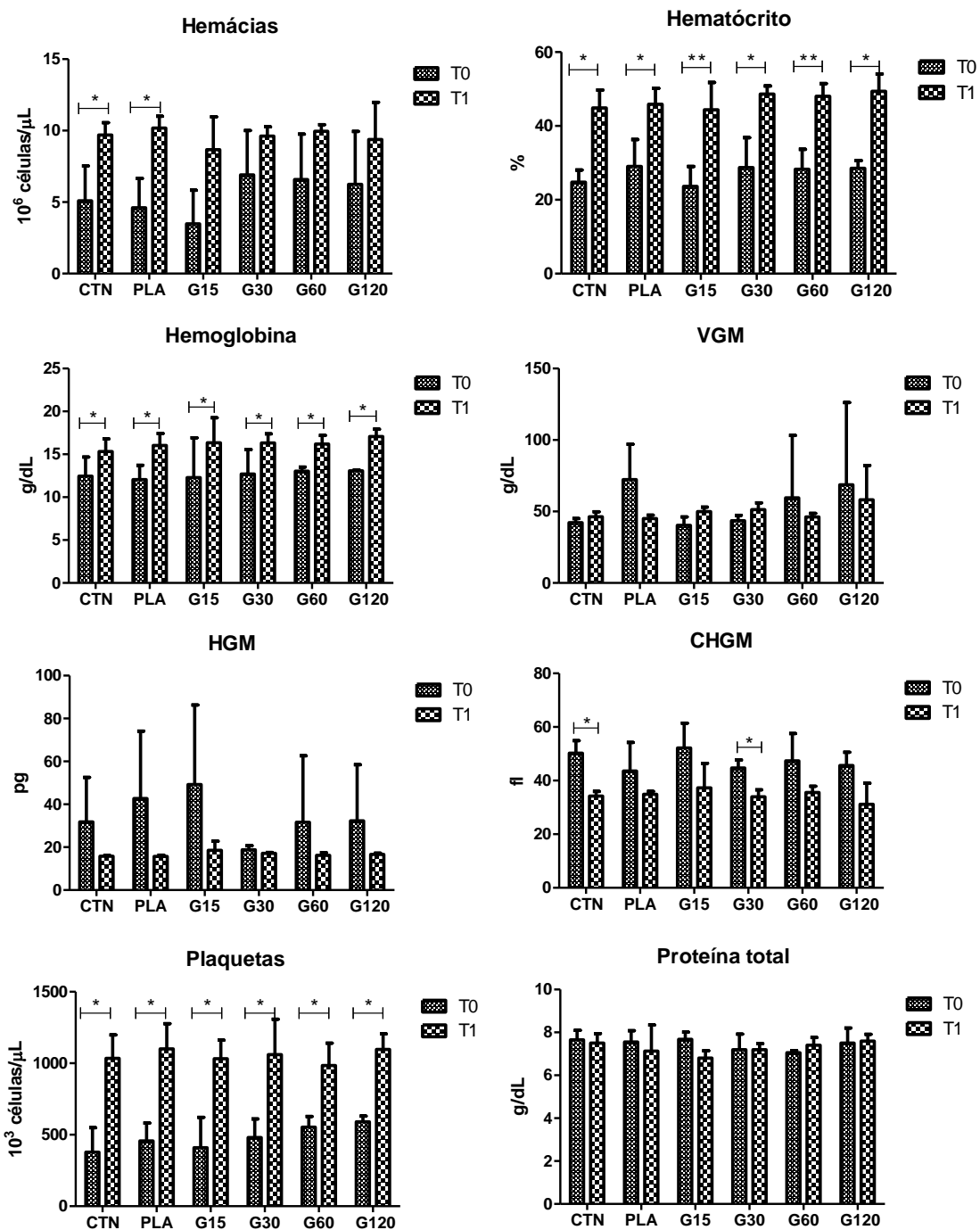


Figura 4 - Gráficos das médias e desvio padrão dos valores hematológicos de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), plaquetas e proteína total de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1- 8 dias após o trauma) (*p<0,05 e **p<0,01).

Tabela 1 – Parâmetros hematológicos de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC

		Avaliação hematológica					
		CTN	PLA	G15	G30	G60	G120
Hemácias (x10 ⁶ células/ μ L) (7,62-9,99)*	T0	5,09 ^{Aa}	4,60 ^{Aa}	3,48 ^{Aa}	6,91 ^{Aa}	6,58 ^{Aa}	8,32 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		2,42	2,05	2,34	3,10	3,17	1,24
	T1	9,69 ^{Ab}	10,18 ^{Ab}	8,67 ^{Aa}	9,62 ^{Aa}	9,82 ^{Aa}	10,35 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,87	0,82	2,30	0,65	0,39	0,47
Hematócrito (%) (38,5-52)*	T0	24,75 ^{Aa}	29 ^{Aa}	23,60 ^{Aa}	28,73 ^{Aa}	28,25 ^{Aa}	28,50 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		3,30	7,31	5,44	8,10	5,44	2,12
	T1	44,86 ^{Ab}	45,89 ^{Ab}	44,37 ^{Ab}	48,62 ^{Ab}	48,02 ^{Ab}	49,37 ^{Ab}
		±	±	±	±	±	±
		4,84	4,28	7,43	2,20	3,44	4,70
Hemoglobina (g/dL) (13,5-17,4)*	T0	12,45 ^{Aa}	12,05 ^{Aa}	12,27 ^{Aa}	12,70 ^{Aa}	13,02 ^{Aa}	13,06 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		2,23	1,67	4,66	2,85	0,49	0,12
	T1	15,31 ^{Ab}	16,04 ^{Ab}	16,35 ^{Ab}	16,32 ^{Ab}	16,20 ^{Ab}	17,07 ^{Ab}
		±	±	±	±	±	±
		1,48	1,38	2,90	1,07	1,00	0,85
VGM (g/dL) (46,3-56,2)*	T0	42,14 ^{Aa}	72,31 ^{Aa}	40,33 ^{Aa}	43,50 ^{Aa}	59,55 ^{Aa}	68,73 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		2,95	24,70	5,86	3,77	43,63	57,39
	T1	46,30 ^{Aa}	45,07 ^{Aa}	49,98 ^{Aa}	51,32 ^{Aa}	46,19 ^{Aa}	58,21 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		3,46	2,38	3,12	4,69	2,56	23,95
HGM (pg) (16,3-19,5)*	T0	31,75 ^{Aa}	42,70 ^{Aa}	49,18 ^{Aa}	18,80 ^{Aa}	31,62 ^{Aa}	32,30 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		3,73	31,45	37,16	1,90	30,40	26,16
	T1	15,78 ^{Aa}	15,67 ^{Aa}	18,53 ^{Aa}	17,17 ^{Aa}	16,24 ^{Aa}	16,60 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,46	0,63	4,27	0,35	1,26	0,65
CHGM (fl) (31,9-38,5)*	T0	50,21 ^{Aa}	43,56 ^{Aa}	52,20 ^{Aa}	44,70 ^{Aa}	47,40 ^{Aa}	45,64 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		4,71	10,70	9,27	2,98	10,14	4,90
	T1	34,21 ^{Ab}	34,87 ^{Aa}	37,29 ^{Aa}	33,97 ^{Ab}	35,56 ^{Aa}	31,18 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		1,78	1,07	9,16	2,57	2,35	7,84
Plaquetas (x10 ³ células/ μ L) (574-1253)*	T0	378,40 ^{Aa}	456,80 ^{Aa}	409,40 ^{Aa}	481 ^{Aa}	553,25 ^{Aa}	590,25 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		171,42	125,20	240,65	129,40	74,62	39,80
	T1	1034,71 ^{Ab}	1101 ^{Ab}	1031,33 ^{Ab}	1060,50 ^{Ab}	984,17 ^{Ab}	1097 ^{Ab}
		±	±	±	±	±	±
		163,80	175,74	130,42	247,99	156,50	108,70

*Valores fisiológicos de ratos, machos, com mais de 17 semanas de idade, de acordo com Giknis e Clifford (2008). Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas) e das mesmas letras minúsculas não diferem entre os tempos (linhas) (p<0,05).

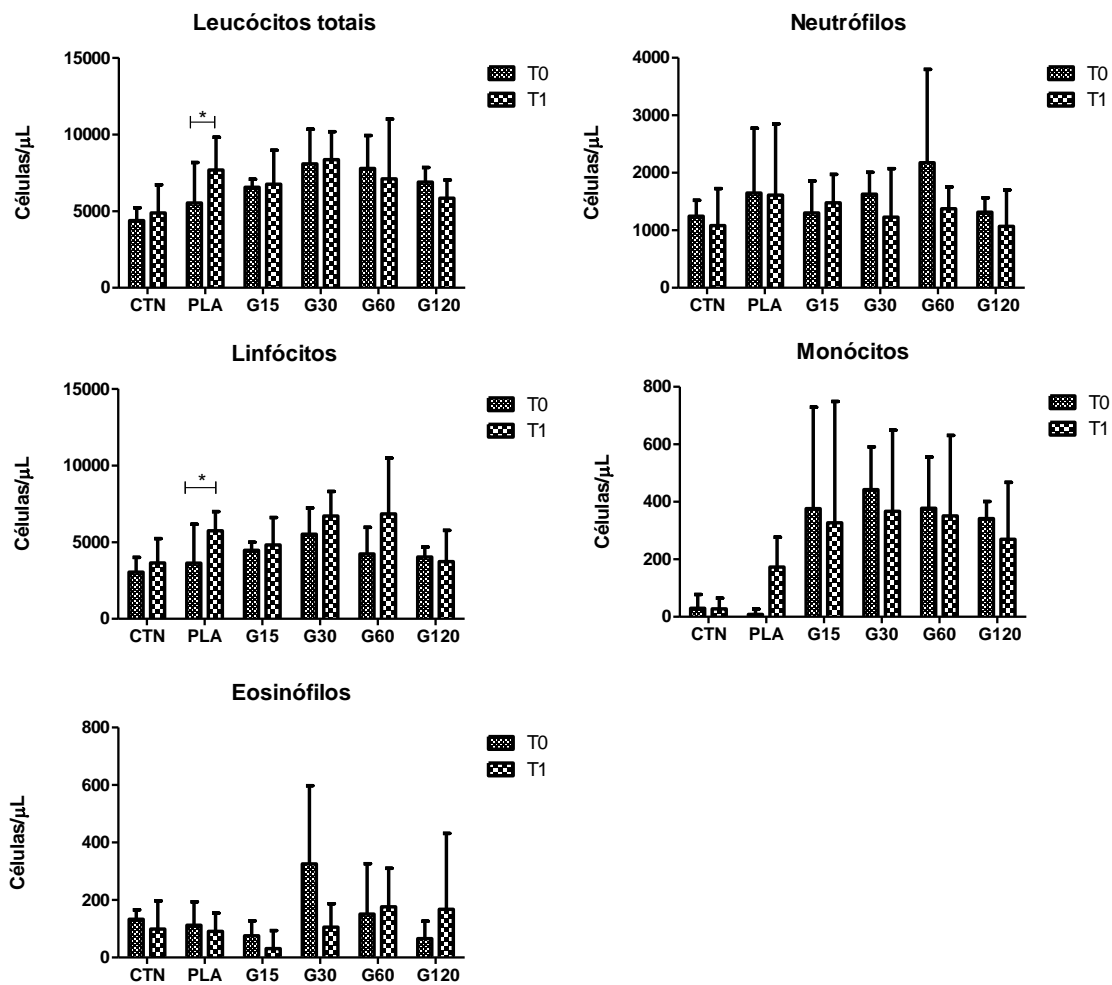


Figura 5 - Gráficos das médias e desvio padrão dos valores de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1- 8 dias após o trauma) ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Valores do leucograma de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIIC

		Leucograma					
		CTN	PLA	G15	G30	G60	G120
Leucócitos totais (10³/μL) (1,98-11,06)*	T0	4,38 ^{Aa}	5,53 ^{Aa}	6,55 ^{Aa}	8,08 ^{Aa}	7,78 ^{Aa}	6,89 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,84	2,64	0,52	2,27	2,14	0,94
	T1	4,88 ^{Aa}	7,68 ^{Ab}	6,75 ^{Aa}	8,35 ^{Aa}	7,10 ^{Aa}	5,85 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		1,85	2,14	2,22	1,83	3,90	1,19
Neutrófilos (10³/μL) (0,33-1,89)*	T0	1,24 ^{Aa}	1,65 ^{Aa}	1,30 ^{Aa}	1,63 ^{Aa}	2,17 ^{Aa}	1,32 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,28	1,13	0,55	0,38	1,62	0,25
	T1	1,08 ^{Aa}	1,61 ^{Aa}	1,48 ^{Aa}	1,23 ^{Aa}	1,37 ^{Aa}	1,07 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,64	1,24	0,49	0,84	0,38	0,63
Linfócitos (10³/μL) (1,19-9,45)*	T0	3,04 ^{Aa}	3,63 ^{Aa}	4,47 ^{Aa}	5,52 ^{Aa}	4,23 ^{Aa}	4,03 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,96	2,53	0,52	1,70	1,74	0,66
	T1	3,64 ^{Aa}	5,75 ^{Ab}	4,82 ^{Aa}	6,70 ^{Aa}	6,84 ^{Aa}	3,73 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		1,59	1,25	1,79	1,60	3,63	2,04
Monócitos (10³/μL) (0,03-0,27)*	T0	0,030 ^{Aa}	0,008 ^{Aa}	0,38 ^{ABa}	0,44 ^{Ba}	0,38 ^{ABa}	0,34 ^{ABa}
		±	±	±	±	±	±
		0,047	0,018	0,35	0,15	0,18	0,060
	T1	0,028 ^{Aa}	0,17 ^{Aa}	0,33 ^{Aa}	0,37 ^{Aa}	0,35 ^{Aa}	0,27 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,038	0,10	0,42	0,28	0,28	0,20
Eosinófilos (10³/μL) (0,01-0,19)*	T0	0,13 ^{Aa}	0,11 ^{Aa}	0,075 ^{Aa}	0,32 ^{Aa}	0,15 ^{Aa}	0,066 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,033	0,081	0,052	0,27	0,17	0,060
	T1	0,099 ^{Aa}	0,091 ^{Aa}	0,031 ^{Aa}	0,10 ^{Aa}	0,18 ^{Aa}	0,17 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,098	0,063	0,062	0,081	0,13	0,26

*Valores fisiológicos de ratos, machos, com mais de 17 semanas de idade, de acordo com Giknis e Clifford (2008). Dados apresentados como média±desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas) e das mesmas letras minúsculas não diferem entre os tempos (linhas) (p<0,05).

Tabela 3 - Valores totais de proteína de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC

		Proteína total						
Proteínas total (g/dL) (5,6-7,6)*	T0	7,65 ^{Aa}	7,55 ^{Aa}	7,68 ^{Aa}	7,20 ^{Aa}	7,05 ^{Aa}	7,50 ^{Aa}	
		±	±	±	±	±	±	
	T1	0,44	0,53	0,33	0,72	0,10	0,71	
		±	±	±	±	±	±	
			7,50 ^{Aa}	7,13 ^{Aa}	6,80 ^{Aa}	7,20 ^{Aa}	7,40 ^{Aa}	7,60 ^{Aa}
			±	±	±	±	±	±
		0,44	1,21	0,35	0,28	0,36	0,32	

*Valores fisiológicos de ratos, machos, com mais de 17 semanas de idade, de acordo com Giknis e Clifford (2008). Dados apresentados como média±desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas) e das mesmas letras minúsculas não diferem entre os tempos (linhas) ($p<0,05$).

circulação de sangue e linfa de modo que os leucócitos passem para o sangue periférico causando leucocitose fisiológica (Paludo et al., 2002). Todavia, apenas o grupo PLA apresentou esse aumento significativo. Outra possível explicação é que nos animais submetidos ao trauma medular, haja uma maior reação inflamatória local. Em contrapartida, os animais tratados com a MVIIC não apresentaram aumento significativo e os grupos G60 e G120 mostraram uma diminuição nos níveis totais de leucócitos. Pode-se inferir um possível efeito antiinflamatório, necessitando de maiores investigações para confirmação.

Conforme observado na tabela 2, não houve alteração do número absoluto de neutrófilos entre grupos ou tempos. Em relação ao número de linfócitos, pode-se observar um aumento significativo ($p<0,05$) também dos animais do PLA no oitavo dia após o trauma. Os linfócitos são as principais células circulantes dos ratos, portanto a leucocitose provavelmente decorre da linfocitose.

Em relação ao número absoluto de monócitos e eosinófilos, não houve diferença entre os tempos e grupos estudados. Ressalta-se que a MVIIC não causou processos de hipersensibilização indicados pela eosinofilia (Jain, 1993).

Os estudos relacionados ao perfil hematológico de animais submetidos a aplicação da conotoxina MVIIC mostra-se de extrema importância, pois essas informações são necessárias para padronizar a melhor dose da MVIIC de uso terapêutico, sem causar danos colaterais ao paciente. Esses resultados são inéditos na literatura.

Dessa maneira, sugere-se que não houve efeito tóxico do tratamento e, portanto, a toxina nas doses utilizadas não acarretou qualquer alteração hematológica.

6.2.2 Avaliação bioquímica das enzimas hepática e renal

Na tabela 4 e figura 6 encontram-se os valores das enzimas ALT, AST, creatinina e uréia. Os valores séricos das enzimas hepática (AST e ALT) e renal (creatinina e uréia) não apresentaram diferença entre os momentos de avaliação antes e oito dias após a cirurgia. A enzima ALT mostrou diferença entre o G120 com os grupos CTN e PLA oito dias após o trauma.

Tabela 4 – Valores médios das enzimas hepáticas e renais de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC

		Bioquímica sérica					
		CTN	PLA	G15	G30	G60	G120
Uréia (mg/dL) (10,7-20)*	T0	57,8 ^{Aa}	44,33 ^{Aa}	50,50 ^{Aa}	52,75 ^{Aa}	53,75 ^{Aa}	63,50 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		19,74	15,92	10,41	9,91	14,15	4,80
	T1	57,57 ^{Aa}	54,67 ^{Aa}	52,25 ^{Aa}	54,75 ^{Aa}	62,75 ^{Aa}	54,50 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		5,47	9,27	2,22	12,82	24,38	11,68
Creatinina (mg/dL) (0,3-0,5)*	T0	0,67 ^{Aa}	0,66 ^{Aa}	0,40 ^{Aa}	0,40 ^{Aa}	0,72 ^{Aa}	0,48 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,31	0,22	0,18	0,22	0,22	0,25
	T1	0,73 ^{Aa}	0,54 ^{Aa}	0,88 ^{Aa}	0,52 ^{Aa}	0,90 ^{Aa}	0,60 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		0,21	0,11	0,59	0,12	0,50	0,17
ALT (U/L) (19-48)*	T0	114,17 ^{Aa}	100,71 ^{Aa}	78,25 ^{Aa}	65,20 ^{Aa}	76 ^{Aa}	42,80 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		23,45	21,24	35,76	51,47	55,45	33,46
	T1	131 ^{Aa}	110,71 ^{Aa}	78 ^{ABa}	63 ^{ABa}	71,75 ^{ABa}	34,60 ^{Ba}
		±	±	±	±	±	±
		22,14	10,83	38,94	53,34	49,51	12,82
AST (U/L) (63-175)*	T0	99,50 ^{Aa}	104,67 ^{Aa}	78,50 ^{Aa}	114,60 ^{Aa}	110,75 ^{Aa}	159,75 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		29,88	35,94	15,42	28,82	32,66	36,95
	T1	89,33 ^{Aa}	92,33 ^{Aa}	73 ^{Aa}	105 ^{Aa}	113,50 ^{Aa}	130,75 ^{Aa}
		±	±	±	±	±	±
		37,26	52,80	11,75	26,86	49,43	11,70

*Valores fisiológicos de ratos, machos, com mais de 17 semanas de idade, de acordo com Giknis e Clifford (2008). Dados apresentados como média±desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre os grupos (colunas) e das mesmas letras minúsculas não diferem entre os tempos (linhas) (p<0,05).

A bioquímica sérica é uma importante fonte de avaliação nos estudos com toxinas por refletir o funcionamento hepático e renal. Algumas enzimas, AST e ALT, são utilizadas para avaliação do fígado, um órgão chave para metabolização de medicamentos. Elas refletem anormalidades no fígado, sendo que efeitos deletérios de toxinas podem elevar os níveis dessas enzimas, sendo a ALT mais específica para alterações hepáticas em ratos (Tennant e Center, 2008). Os valores de ALT e AST estão apresentados na tabela 4 e figura 6.

Observa-se que não houve diferença dos valores de AST entre os tempos e os grupos

estudados. Além de refletir anormalidades hepáticas, a AST é utilizada para avaliação do miocárdio. Assim, de acordo com os resultados observados, pode-se afirmar que não ocorreu lesão muscular cardíaca significativa.

Já a ALT apresentou diferença estatística entre os grupos PLA e CTN com o grupo G120. Entretanto, eles se encontram próximos dos valores no tempo pré-operatório, não implicando em influência dos tratamentos.

Além disso, a excreção renal é uma das principais rotas para eliminação das drogas

e o seu comprometimento pode ser evidenciado pelos aumentos dos níveis séricos de creatinina e uréia, indicadores da filtração glomerular. Considera-se a creatinina um indicador mais fidedigno por sofrer menores influências de fatores extrarenais (Magro e Vattimo, 2007). Os valores de uréia e creatinina não

apresentaram diferença entre os tempos e grupos. Entretanto, notam-se valores elevados de uréia nos tempos avaliados em comparação com os dados fisiológicos estabelecidos por Giknis e Clifford (2008), tanto no período pré-operatório quanto no oitavo dia após o trauma.

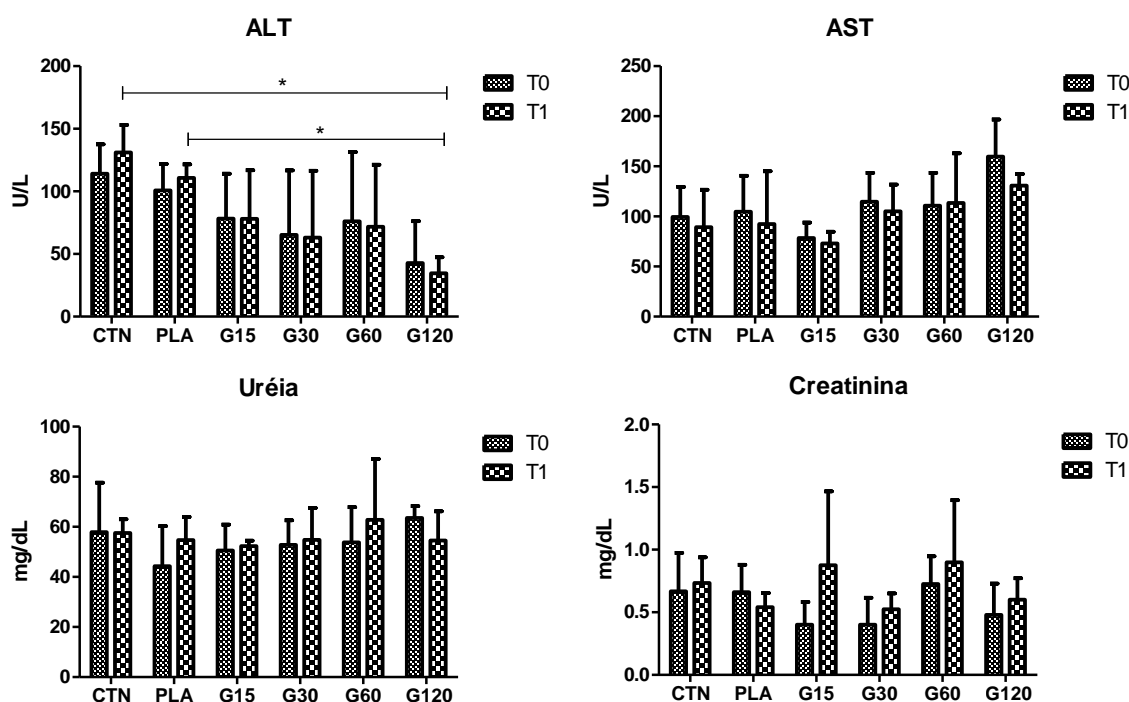


Figura 6 - Gráficos das médias dos valores séricos de ALT, AST, creatinina e uréia de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1- 8 dias após o trauma) ($p < 0,05$).

Ou seja, foram observados dados fisiológicos iniciais diferentes dos encontrados na literatura.

As concentrações de creatinina observadas no presente experimento estão acima do limite superior, nos dois momentos de avaliação, de acordo com valores fisiológicos propostos Giknis e Clifford (2008). Observa-se que apesar da não

diferença entre os tempos, os grupos tratados com a MVIIC mostraram um aumento nos valores de creatinina.

A creatinina é o produto final da utilização energia pelo tecido muscular e sua concentração no sangue depende de lesões musculares, esforço físico e também da ingestão de carnes no caso de carnívoros. Ela é filtrada pelos glomérulos renais,

portanto lesões renais glomerulares são verificadas por aumentos de creatinina e posteriormente de uréia (Finco, 1997; Thrall et al., 2006). Os valores de uréia se mantiveram próximos dos dados no tempo pré-operatório, sendo necessário, portanto avaliações histológicas renais para possíveis implicações em lesões nesse órgão.

Dessa maneira, sugere-se que não houve efeito tóxico do tratamento e, portanto, a toxina nas doses utilizadas não acarretou em alteração das enzimas hepáticas e renais.

6.2.3 Urinálise

Os animais que foram submetidos ao trauma medular agudo apresentaram hemoglobinúria acentuada 24 horas após o trauma, diferente dos achados de Herrera e colaboradores (2010), que encontraram picos acentuados no tempo de seis horas. No presente estudo, houve diferença estatística dos grupos CTN e PLA, CTN e G30 e CTN e G60 ($p < 0,05$), retornando aos níveis normais sete dias após a injúria (Figura 7).

O trauma medular causa, além das alterações motoras, déficits funcionais da bexiga pela interrupção de tratos ascendentes e/ou descendentes (Houltbosch, 2002). Esses pacientes podem exibir ulceração e irritação da mucosa, com consequente ruptura do uroepitélio e cistite hemorrágica com pico em seis horas (Herrera et al., 2010), sendo observada até três dias após o trauma (Apodaca et al., 2003). Apodaca e colaboradores (2003) demonstraram que isso é decorrente de um componente neurogênico, o qual leva a rápida ruptura do uroepitélio, resultando na perda da

resistência transepitelial e aumento da permeabilidade à água e uréia.

Além disso, no presente estudo também foi avaliada a albumina urinária, utilizada como indicativo de injúria do uroepitélio ou do trato urinário superior (Herrera et al., 2010). Similarmente à hemoglobina, o pico da albumina ocorreu no tempo de 24 horas, apresentando diferença estatística dos grupos CTN e PLA ($p < 0,01$) e CTN e G60 ($p < 0,05$), retornando aos níveis normais oito dias após a injúria (Figura 7), diferente do encontrado por Herrera e colaboradores (2010) com pico seis horas após o trauma.

Apodaca e colaboradores (2003) ressaltam que a frequente massagem vesical diária após o TMA possa prevenir esses danos vesicais com consequente redução da hematúria e proteinúria. A massagem foi realizada em todos os grupos e, mesmo assim houve elevação de hemoglobina e albumina urinária, mas acredita-se que esse ato atenuou maiores complicações.

Os grupos G15 e G120 não se diferenciaram do CTN em relação à avaliação de hemoglobina e albumina urinária. Não há relato na literatura da influência da MVIIC sobre esses parâmetros. Sugere-se que as doses de 15 e 120 pmol apesar de não apresentarem diferença estatística em relação do grupo PLA, reduzem as lesões vesicais secundárias ao TMA, uma vez que são semelhantes ao CTN. Isso ocorre possivelmente por agir no foco primário medular e proporcionar uma maior preservação dos tratos ascendentes e descendentes na medula espinal relacionado à bexiga. Entretanto, esse fato só pode ser confirmado quando associado a análises anatomoistopatológica e imunoistoquímica da medula espinal.

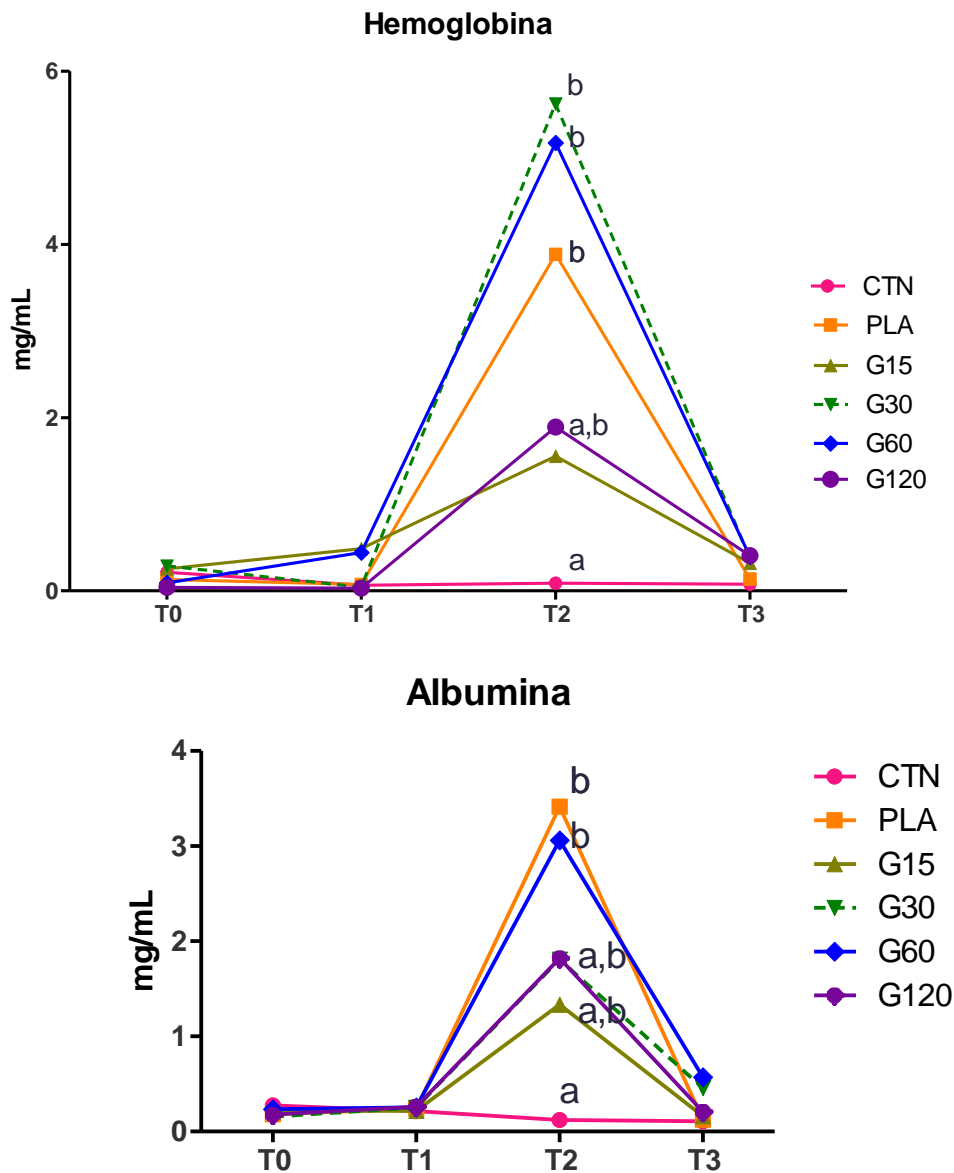


Figura 7 - Gráficos das médias dos valores de hemoglobina e albumina urinárias de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC; T0 – antes da intervenção cirúrgica; T1- 6 horas após o trauma; T2 – 24 horas após o trauma; T3 – 8 dias após o trauma) ($p < 0,05$).

6.3 Avaliação anatomoistopatológica extraneural

Com exceção dos rins e bexigas, não foram observadas alterações macro ou microscópicas significativas no coração,

fígado, baço, intestino, pâncreas, pulmão, adrenal, cérebro e músculo longíssimo dorsal.

Observou-se à microscopia óptica, em todos os grupos com trauma medular,

acúmulo de material proteináceo amorfo eosinofílico nos túbulos renais (Figura 8B), conhecido como amilóide de acordo com DiBartola et al. (1990), associado à atrofia e esclerose glomerular também observado nesses animais. Esse tipo de lesão pode levar ao quadro de insuficiência renal e ocorreu em todos os animais após o trauma medular em algum tipo de grau, em acordo com Wall et al. (1999). Além disso, Nars et al. (2006) relatam que a primeira manifestação da amiloidose é a proteinúria, também observada nestes animais.

Verifica-se que, além da amiloidose ser causada pela TMA, a dose de 120 pmol agravou o quadro de lesão renal, com

diferença estatística significativa entre os grupos CTN e PLA com o G120 (Figura 8B) ($p < 0,05$) (Figura 9), mesmo que ainda não tenha sido refletido na elevação dos níveis de ureia e creatinina de maneira significativa, já que isso ocorre frente a perda funcional do rim quando acima de 75% (Braun e Lefebvre, 2008). Embora não haja registro dos efeitos da MVIIC no organismo, verifica-se que a dose mais elevada da toxina intensificou as alterações renais, possivelmente por uma glomerulopatia direta, pela lesão dos túbulos renais, ou indireta, pela resposta inflamatória induzida, como visto no emprego também de fármacos (Hill, 1986).

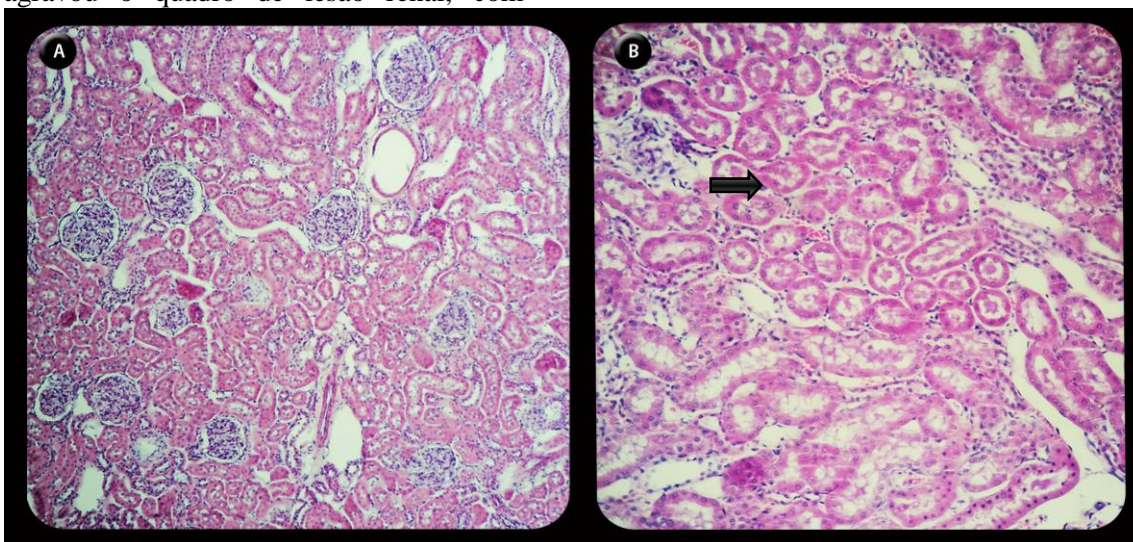


Figura 8 – Fotomicroscopia de secções longitudinais do rim de ratos Wistar corados com hematoxilina-eosina (x). A) Observa-se a integridade dos glomérulos e túbulos renais do grupo CTN (210x). B) Material proteináceo eosinofílico (seta) acentuado difuso no grupo G120 (207x).

Amiloidose renal

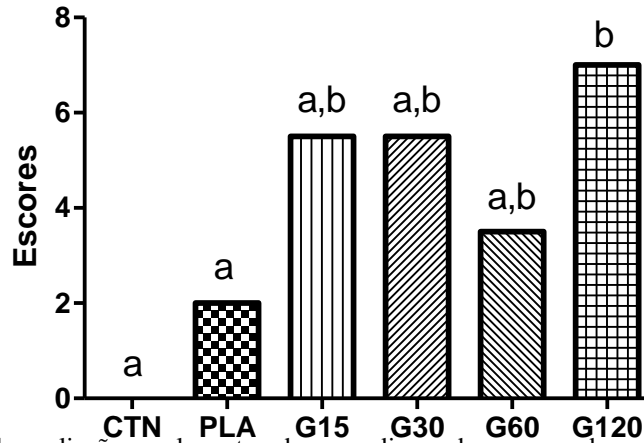


Figura 9 - Gráfico da avaliação renal mostrando as medianas dos escores de amiloidose em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).

Sabe-se que a lesão medular resulta em graves alterações funcionais do trato urinário inferior (Meyer et al., 2003). À necropsia, a bexiga estava distendida na maioria dos animais submetidos ao trauma. Já o grupo CTN, animais submetidos apenas a laminectomia, não mostrava alterações no tamanho. Corroborando Apodaca et al. (2003), o qual relata que, com a interrupção da inervação vesical frente ao TMA há perda do controle voluntário de esvaziamento, distensão e aumento da pressão da bexiga em pacientes com lesões craniais a região lombar.

Os pacientes com TMA apresentaram ulceração do uroepitélio e o envolvimento tecidual ficou evidenciado pela reação inflamatória na bexiga (Meyer et al., 2003; Herrera et al, 2010), entretanto não se observou diferença estatística entre os escores dos grupos.

Além disso, foi observado em todos os animais, à exceção do grupo CTN, descamação do epitélio, evidenciada pelo número reduzido de camadas, representando morte celular decorrente da distensão e oclusão vascular (Apodaca et al., 2003; Meyer et al, 2003; Herrera et al., 2010).

Outro achado histopatológico foi a cistite hemorrágica comumente encontradas em pacientes que sofreram TMA (Apodaca et al., 2003). À avaliação histológica, as bexigas dos animais do CTN não apresentavam alterações, diferentemente dos grupos submetidos ao trauma que apresentaram focos hemorrágicos (Figura 10B). A categorização desses focos na bexiga mostrou que os animais que receberam placebo (PLA) apresentaram hemorragia significativamente maior quando comparados aos do grupo CTN e G15 ($p < 0,05$) (Figura 10A).

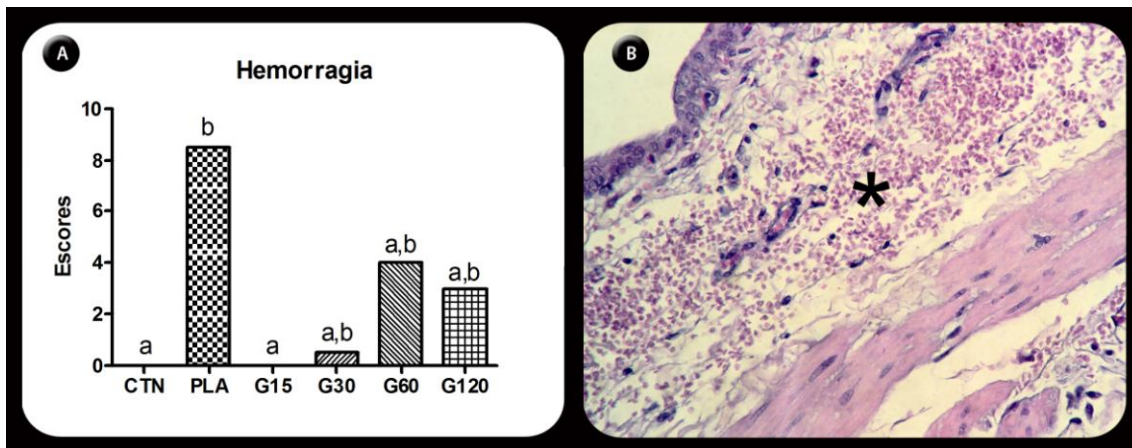


Figura 10 – A) Gráfico da avaliação da bexiga mostrando as medianas dos escores de hemorragia em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$). B) Fotomicroscopia de seções da bexiga de ratos Wistar submetido ao trauma medular agudo e tratados com placebo, corados com hematoxilina-eosina, com foco hemorrágico acentuado difuso (asterisco) (140x).

Não foram observados na literatura relatos do efeito da MVIIC sobre a histologia da bexiga, entretanto, os resultados demonstraram que a dose de 15 pmol foi capaz de reduzir drasticamente o processo hemorrágico, resultando em menor intensidade das lesões vesicais que, portanto, sugerem uma ação protetora do fármaco sobre este órgão.

6.4 Avaliação anatomoistopatológica da medula espinal

À avaliação macroscópica, a medula espinal (ME) do grupo CTN não apresentava quaisquer alterações. Nos grupos submetidos ao trauma, por sua vez, notava-se congestão e aderência da duramáter e leptomeninges na altura de T12, em uma região levemente abaulada.

À avaliação microscópica, os segmentos cranial, epicentro e caudal apresentaram arquitetura preservada no grupo CTN. Foram observadas a duramáter e leptomeninges circundando a ME arredondada, dividida em substância

cinzenta, em formato de “H”, e ao redor, a substância branca. A substância cinzenta era composta principalmente por corpos neuronais e axônios pouco mielinizados, e a substância branca, por axônios mielinizados. Localizado centralmente, havia o canal central formado por células ependimárias. Essas características encontradas nesse estudo coincidem com a histologia relatada da medula normal (Hogg, 2008; Costa, 2010), confirmando que o procedimento da laminectomia não ocasionou alterações histológicas na ME.

No presente estudo observou-se um padrão semelhante de alterações histológicas nos grupos submetidos ao trauma (PLA, G15, G30, G60 e G120). Na região do epicentro, como relatado por Dusart e Schwab (1994), nota-se malácia grave difusa, caracterizada pela perda de celularidade e áreas de cavitação. Com a propagação da lesão em regiões adjacentes, craniais e caudais, havia malácia discreta a moderada e focal a focalmente extensa no funículo dorsal, debris celulares, cavitação, infiltração por macrófagos, degeneração axonal e

tumefação mielínica (Figura 11A), células Gitter (Figura 11B), gliose (Figura 11C), cromatólise neuronal e cicatriz glial. Os segmentos afastados do foco da lesão apresentavam-se gradativamente mais íntegros. Os resultados histopatológicos de

experimentos relacionados ao TMA revelam uma injúria primária localizada, resultando secundariamente em lesão na coluna dorsal da ME (Fujiiki et al., 1996), que se estende rostrocaudalmente (Figura 11D) (Hausmann, 2003).

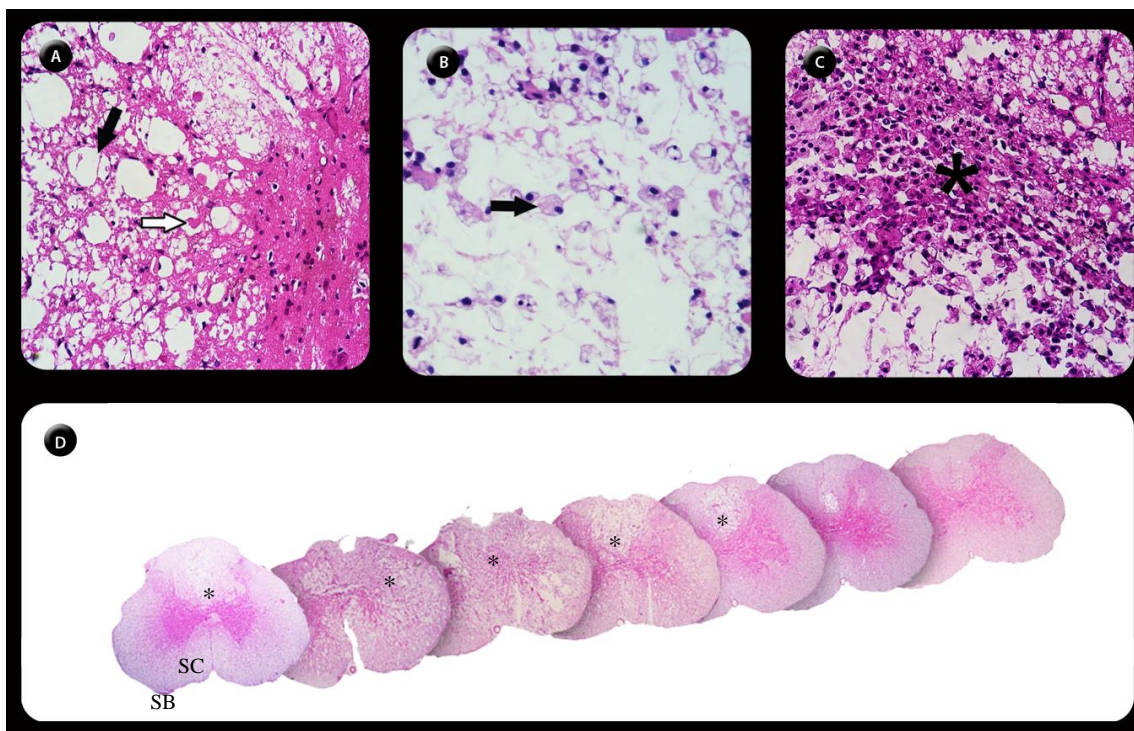


Figura 11 – Fotomicroscopia de seções da medula espinal de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com placebo, corados com hematoxilina-eosina. A) Degeneração axonal (seta branca) e tumefação mielínica (seta cheia) em segmento adjacente ao epicentro do animal do G120 (290x). B) Células Gitter (seta) em área de malácia de animal do PLA (290x). C) Gliose em área de malácia do animal do PLA (290x). D) Cortes em regiões adjacentes e também no epicentro da lesão com diferentes áreas de injúria. Observa-se a substância branca (SB) circundando a substância cinzenta (SC). Regiões próximas ao epicentro mostram áreas de malácia (asterisco) (41x).

Além disso, relata-se que as lesões do epicentro são bem diferentes das regiões adjacentes, sendo caracterizadas em ratos, por tecido necrótico, devido a isquemia, cavitação e ausência de tecido cicatricial (Dusart e Schwab, 1994).

Após o trauma medular agudo, com a compressão da medula espinal ocorre uma sequência de eventos patológicos, incluindo edema e necrose axonal, necrose neuronal, desmielinização seguido de formação

cística (Taoka e Okajima, 1998), cromatólise neuronal, ativação de astrócitos e células periféricas induzindo uma resposta inflamatória local (Xu et al., 2008).

Além disso, a desmielinização axonal e a disfunção da mielina acarretam prejuízos funcionais para medula espinal, por terem importantes efeitos biológicos sobre o axônio. Iniciam-se no epicentro da lesão progredindo para fascículos da substância branca adjacente (Bo e Xian-Ju, 2009)

devido à degeneração axonal (Zhang e Guth, 1997). A ausência de reparo funcional e anatômico dos axônios ocorre devido a inabilidade de regeneração no sistema nervoso central. Deste modo, esse tecido é substituído pela cicatriz glial constituída essencialmente por astrócitos reativos (Menet et al., 2003), o que ficou evidenciado nesse estudo nas regiões adjacentes mais distantes do epicentro.

6.5 Avaliação imunoistoquímica da medula espinal

A quantificação neuronal foi realizada nos segmentos craniais e caudais e permitiu avaliar a integridade da medula, nos diferentes tratamentos e a intensidade da injúria. Observou-se que os neurônios marcados apresentavam-se íntegros, enquanto aqueles em apoptose ou necrose não mostraram imunorreatividade (Figura 14A e 14B). Essa técnica não foi realizada no epicentro devido à alta destruição tecidual observada.

O neurônio na medula espinal pode ser identificado pela técnica de imunoistoquímica usando anticorpos contra

um antígeno nuclear neurônio-específico, o NeuN, o qual marca núcleo e citoplasma em animais adultos (Portiansky et al., 2006). Nos resultados do presente estudo, constatou-se que NeuN é um marcador neuronal específico e sensível como relatado por Wolf et al. (1996).

Quanto ao número médio de neurônios marcados com anti-corpo anti-NeuN por campo, no segmento cranial, os grupos com trauma medular PLA ($26,58 \pm 6,71$), G15 ($38,8 \pm 3,90$), G30 ($31,07 \pm 2,00$), G60 ($28,58 \pm 4,83$) e G120 ($26,1 \pm 1,28$) diferiram entre si, sendo que o G15 apresentou uma média de neurônios marcados por campo superior aos demais, estando mais próximo ao CTN ($43,87 \pm 3,52$) (Figura 11).

Nos segmentos caudais, os números médios de neurônios marcados por campo dos grupos com trauma medular PLA ($26,9 \pm 2,05$), G15 ($29,16 \pm 4,67$), G30 ($24,26 \pm 9,68$), G60 ($25,46 \pm 1,94$) e G120 ($26,93 \pm 3,23$) não mostraram diferença estatística significativa. Todavia, G15 foi semelhante ao CTN ($43,11 \pm 5,52$), no segmento caudal (Figura 12).

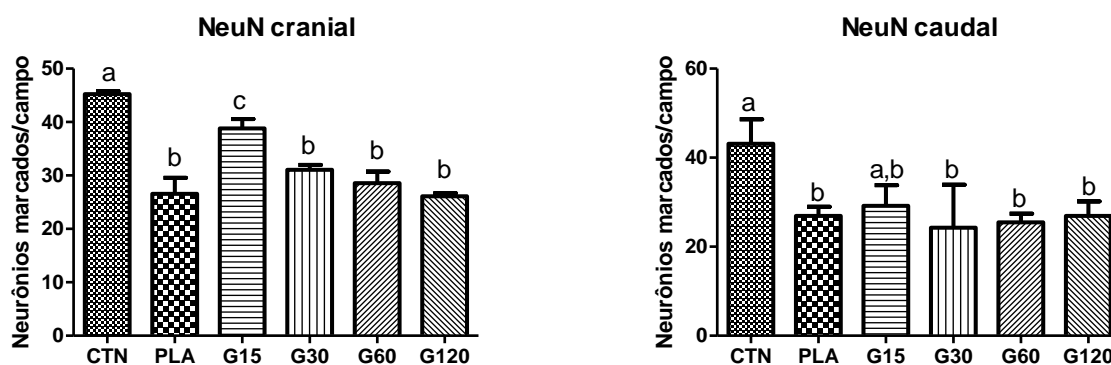


Figura 12 - Gráficos das médias e desvio padrão do número de corpos neuronais NeuN positivos, por campo, na medula espinal de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC) ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).

Na literatura não existem relatos do efeito da MVIIC sobre integridade da medula espinal frente a injúrias. Baseando-se nos resultados acima, observa-se dentre os grupos submetidos ao trauma, o grupo G15 apresentou uma maior quantidade de neurônios íntegros marcados. Assim, sugere-se uma neuroproteção da dose 15 pmol, o que justifica os dados encontrados anteriormente, quanto a preservação da bexiga e a menor concentração de hemoglobina e albumina na urina desses animais.

6.6 TUNEL

A técnica do TUNEL permitiu a detecção da fragmentação do DNA de neurônios e células da glia como mostrado por Liu et al. (1997). As células foram classificadas como apoptóticas, quando eram TUNEL-positivas (coloração amarronzada) associadas a alterações morfológicas vistas na microscopia (Figura 14D). A marcação dessas células foi encontrada não apenas no local da lesão, mas também onde a medula espinal aparentemente estaria intacta (Hagg e Oudega, 2006), possivelmente devido à

degeneração mielínica decorrente do edema (Li et al., 1999).

A apoptose é um mecanismo essencial para eliminação de células abundantes no desenvolvimento do sistema nervoso central, entretanto quando associado ao TMA tem se mostrado como um fator importante na perda celular. Ela é detectada de horas a semanas após a lesão e ocorre em diversos tipos celulares como oligodendrócitos, neurônios, neutrófilos, microglia e macrófagos (Hall e Springer, 2004).

Quanto ao número de células marcadas por campo, nos segmentos craniais, os grupos submetidos ao trauma PLA ($1,61 \pm 0,53$), G15 ($1,07 \pm 0,76$), G30 ($1,93 \pm 0,58$), G60 ($1,88 \pm 1,42$) e G120 ($0,98 \pm 0,77$) não diferiram entre si ($p < 0,05$). Porém o G15 e G120, com um menor número médio de células marcadas, também foram semelhantes ao CTN ($0,16 \pm 0,11$). No segmento caudal, apenas o grupo CTN teve diferença estatística significativa em relação aos demais grupos (Figura 13).

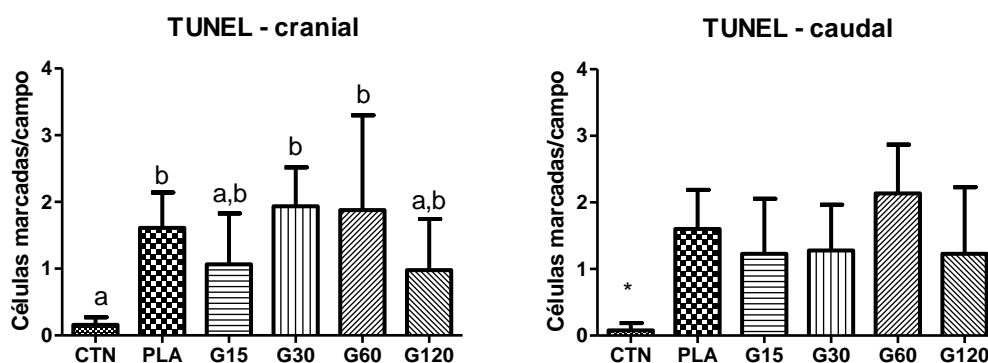


Figura 13 - Gráficos das médias e desvio padrão do número de células marcadas TUNEL positivas, por campo, na medula espinal de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC (CTN – controle negativo; PLA – controle positivo; G15 – 15 pmol MVIIC; G30 – 30 pmol MVIIC; G60 – 60 pmol MVIIC; G120 – 120 pmol MVIIC) ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).

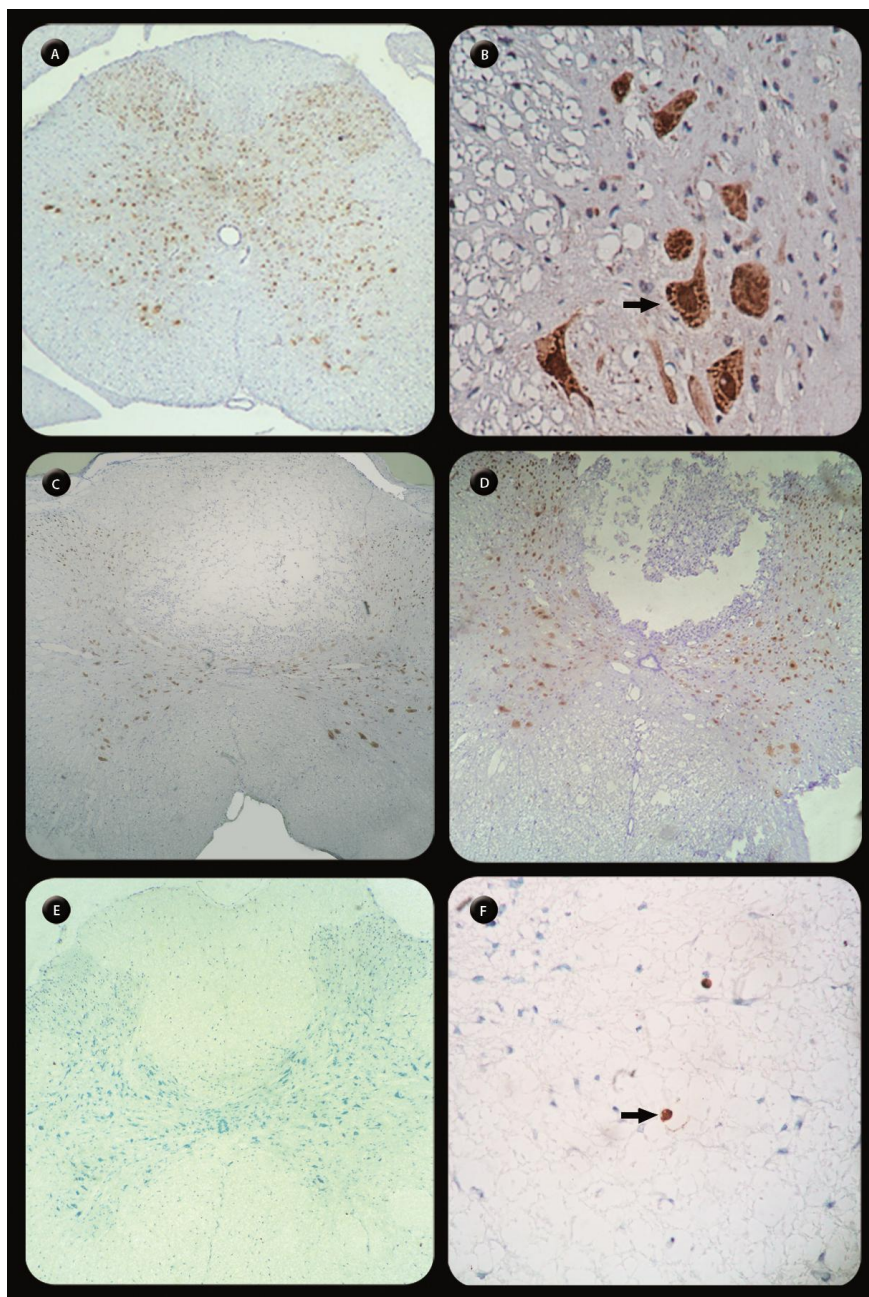


Figura 14 – Fotomicroscopia de secções da medula espinal de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados, ou não, com diferentes doses de MVIIC. A) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada) em animal do CTN (29x). B) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada – seta) em animal do PLA (290x). C) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada) em animal do PLA (71x). D) Marcação de corpos neuronais íntegros (NeuN positivo – coloração amarronzada) em animal do G15 (71x). E) Coloração de lâminas do grupo CTN com TUNEL e contracoloração com Methylgreen (71x). D) Marcação de morte celular (TUNEL positivo – seta) em animal do PLA (290x).

Na literatura, não existe relato sobre a influência da MVIIC na apoptose. Pode-se apenas inferir que ao bloquear os CCVD tipo N e P/Q na medula espinal, há redução dos níveis intracelulares de cálcio e também de glutamato, impedindo a excitotoxicidade que consequentemente, diminuiria a morte neuronal.

Baseado nos resultados acima, o G15 e G120 possuem um menor número de células marcadas, assemelhando-se ao CTN (Figura 13A).

7. CONCLUSÕES

A MVIIC, em dose única de 15, 30, 60 e 120 pmol, pela via intralésional medular, para o tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo, mostrou-se segura quando avaliados parâmetros hematológicos, bioquímicos das enzimas hepáticas e renais e valores urinários.

A MVIIC, em dose única de 120 pmol, pela via intralésional medular, apresentou efeito deletério renal.

A MVIIC, em dose única de 15 pmol, pela via intralésional medular, é capaz de reduzir o processo de cistite hemorrágica, apresentando ação protetora sobre esse órgão.

A MVIIC, em dose única de 15 pmol, pela via intralésional medular, apresentou uma melhor recuperação da capacidade motora, assemelhando-se ao grupo controle negativo no último dia de avaliação.

A MVIIC, em dose única de 15 pmol, pela via intralésional medular, mostrou preservação de corpos neuronais no segmento cranial quando comparado os grupos submetidos ao trauma. Além disso, apresentou semelhança ao controle negativo quanto à marcação de células apoptóticas.

Sugere-se baseado nos resultados, que a dose de 15 pmol possui ação neuroprotetora, quando aplicado pela via intralésional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERY, A.; TATOR, C.; KRASSIOUKOV, A. A Global perspective on Spinal Cord injury Epidemiology. *J. Neurotrauma*, v. 21, n. 10, p. 1355-1370, 2004.

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, 1911.

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.; ZEIDEL, M.; BIRDER, L. Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 284, p. F966-F976, 2003.

ARAGON, G.; YOUNOSSI, Z. M. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. *Clev. Clin. J. Med.*, v. 77, n. 3, p. 195-204, 2010.

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

- 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.
- BOWERSOX, S. S.; GADBOIS, T.; SINGH, T. et al. Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent, and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 279, p. 1243-1249, 1996.
- BOWERSOX, S. S.; LUTHER R. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in venom of *Conus magus*. *Toxicon.*, v. 36, n. 11, p. 1651-1658, 1998.
- BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P. Kidney function and damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. cap. 13, p. 485-528.
- 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 GABA_B 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. Exp. Neuro. Ther.*, v. 4, p. 184-198, 2007.
- CARLSON, G. D.; GORDEN, C. Current developments in spinal cord injury research. *Spine J.*, v. 2, p. 116-128, 2002.
- CHOI, D. W. Excitotoxicity cell death. *J. Neurobiol.*, n. 23, p. 1261-1276, 1992.

- COATES, J. R. Paraparesis. In: *Canine and Feline Neurology*. 3. ed. Gloucester: BSAVA, 2004. p. 237-264.
- COSTA, P. M. Avaliação anátomo-clínica do dantroleno sódico no trauma medular agudo experimental em ratos por período prolongado. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DALMOLIN, G. D.; SILVA, C. R.; RIGO, F. K. et al. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. *Pain*, v. 152, p. 2224-2332, 2011.
- DECUYPERE, J.; MONACO, G.; MISSIAEN, L.; DE SMEDT, H. et al. IP₃ receptors, mitochondria, and Ca²⁺ signaling: implications for aging. *J. Aging Res.*, p. 1-20, 2011.
- DELAMARTER, R. B.; SHERMAN, J.; CARR, J. B. Pathophysiology of spinal cord injury. *J. Bone Joint Surg.*, v. 77, p. 1042-1049, 1995.
- DIAZ, A.; DICKENSON, A. H. Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurons produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain*, v. 69, p. 93-100, 1997.
- DiBARTOLA, S. P., TARR, M. J., WEBB, D. M. et al. Familial renal amyloidosis in Chinese Shar-Pei dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 197, p. 483-487, 1990.
- DUNLAP, K.; LUEBKE, J. I.; TURNER, R. J. Exocytotic Ca⁺⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.*, v. 18, n. 2, p. 89-98, 1995.
- DUSART, I.; SCHWAB, M. E. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, v. 6, p. 712-724, 1994.
- 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 (Wld^S) that causes delayed Wallerian degeneration. *J. Comp. Neurol.*, v. 371, p. 469-484, 1996.
- GAUR, S.; NEWCOMB, R.; RIVNAY, B. et al. Calcium channel antagonist peptides define several components of transmitter release in the hippocampus. *Neuropharmacol.*, v. 33, n. 10, p. 1211-1219, 1994.
- GIKNIS, M. L. A.; CLIFFORD, C. B. Clinical laboratory parameters for crl:wi (han). *Charles River Lab.*, p. 1-17, 2008.
- GREENBERG, D. A. Calcium channels in neurological disease. *Ann. Neurol.*, v. 42, p. 275-282, 1997.
- GRILL, R. J. User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. *Exp. Neurol.*, v. 196, p. 1-5, 2005.
- GUAN, R. J.; WANG, C. G.; WANG, M. et al. A depressant insect toxin with a novel analgesic effect from scorpion *Buthus*

- martensii* Karsch. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1549, p. 9-18, 2001.
- GUERTIN, P. A. Paraplegic mice are leading to new advances in spinal cord injury research. *Spinal Cord*, v. 43, p. 459-461, 2005.
- HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 23, n. 3/4, p. 264-280, 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.
- HAMA, A.; SAGEN, J. Antinociceptive effects of the marine snail peptides conantokin-G and conotoxin MVIIA alone and in combination in rat models of pain. *Neuropharmacol.*, n. 56, p. 556-563, 2009.
- HAUSMANN, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, n. 41, p. 369-378, 2003.
- HERMANN, J. E.; IMURA, T.; SONG, B. et al. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v. 28, n. 28, p. 7231-7243, 2008.
- HERRERA, J. J.; HAYWOOD-WATSON II, J. L.; GRILL, R. J. Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. *J. Neurotrauma*, v. 27, p. 423-431, 2010.
- HILL, G. S. Drug-associated glomerulopathies. *Toxic. Pathol.*, v. 14, n. 1, p. 37-44, 1986.
- HILLYARD, D. R.; MONJE, V. D.; MINTZ, I. M. et al. A nem *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron*, v. 9, n. 1, p. 69-77, 1992.
- HOGG, D. A. Topographical anatomy of the central nervous system. In: KING, A.S. *Physiological and Clinical Anatomy of the Domestic Mammals*. 5. ed. Oxford: Backwell Science, 2008. p. 256-296.
- HOLTZ, A.; NYSTROM, B.; GERDIN, B. Relation between spinal cord blood flow and functional recovery after blocking weight-induced spinal cord injury in rats. *Neurosurg.*, v. 26, n. 6, p. 952-957, 1990.
- HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol. Educ.*, v. 26, n. 4, p. 238-255, 2002.
- HUNG, E. W.; DAROUICHE, R. O.; TRAUTNER, B. W. Proteus bacteriuria is associated with significant morbidity in spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 45, p. 616-620, 2007.
- IMAIZUMI, T.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S. G. The role of voltage-gated Ca⁺⁺ channels in anoxic injury of spinal cord matter. *Brain Res.*, v. 817, p. 84-92, 1999.
- ISAAC, L.; PEJIC, L. Secondary mechanisms of spinal cord injury. *Surg. Neurol.*, v. 43, p. 484-485, 1995.
- JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea&Febiger. 1993, 417p.
- JIANG, C. L.; ZHAANG, W. Q. Effect of scorpion venom on the release of GABA in hippocampus of epileptic rats induced by kainic acid. *Sheng Li Xue Bao*, v. 51, p. 609-614, 1999.
- KAPOOR, V. K. Natural toxins and their therapeutic potential. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 48, p. 228-237, 2010.
- KIKUKAWA, S.; KAWAGUCHI, S.; MIZOGUCHI, A. et al. Regeneration of

- dorsal column axons after spinal cord injury in young rats. *Neurosci. Letters*, v. 249, p. 135-138, 1998.
- KOBAYASHI, T.; MORI, Y. Ca²⁺ channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 363, p. 1-15, 1998.
- KOCHEGAROV, A. A. Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium*, v. 33, p. 145-162, 2003.
- 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.
- LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potencial of venom peptides. *Nat. Ver.*, v. 2, p. 790-802, 2003.
- LI, G. L.; FAROOQUE, M.; HOLTZ, A. et al. Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol.*, v. 98, p. 473-480, 1999.
- 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.
- LIVETT, B. G.; GAYLER, K. R.; KHALIL, Z. Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics. *Curr. Med. Chem.*, v. 11, p. 1715-1723, 2004.
- LORY, P.; OPHOFF, R. A.; NAHMIA, J. Towards a unified nomenclature describing voltage-gated calcium channel genes. *Hum. Genet.*, v. 100, p. 149-150, 1997.
- LU, J.; ASHWELL, K. W.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury. *Spine*, v. 25, p. 1859-1866, 2000.
- LUNA, L.G. *Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258p.
- MAGRO, M. C. S.; VATTIMO, M. F. Evaluation of renal function: creatinine and other biomarkers. *Rev. Bras. Ter. Int.*, v. 19, n. 2, p. 182-185, 2007.
- MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J. Neuroscience*, v. 14, n. 8, p. 4882-4890, 1994.
- MARCHI, M.; RISSO, F.; VIOLA, C. et al. Direct evidence that release-stimulating alpha7* nicotinic cholinergic receptors are localize on human and rat brain glutamatergic axon terminal. *J. Neurochem.*, v. 80, n. 6, p. 1071-1078, 2002.
- MAROTO, R.; FUENTE, M. T.; ZAPAPTER, P. et al. Effects of ω -conotoxin MVIIC on veratridine-induced cytotoxicity and cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Brain Res.*, v. 714, p. 209-214, 1996.

- MARTIN-MOUTOT, N.; LEVEQUE, C.; SATO, K. et al. Properties of ω conotoxin MVIIC receptors associate with α 1A calcium channel subunits in rat brain. *FEBS Letters*, v. 366, p. 21-25, 1995.
- 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.
- MCDONOUGH, S. I.; SWARTZ, K. J.; MINTZ, I. M. et al. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by ω -conotoxin MVIIC. *J. Neuroscience*, v. 16, n. 8, p. 2612-2623, 1996.
- MCINTOSH, J. M.; JONES, R. M. Cone venom from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon*, v. 39, p. 1447-1451, 2001.
- MEHDIRATTA, R.; SABERWAL, G. Bio-business in brief: the case of conotoxins. *Cur. Sci.*, v. 92, p. 39-45, 2007.
- MENET, V.; PRIETO, M.; PRIVAT, A. et al. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *PNAS*, v. 100, n. 15, p. 8999-9004, 2003.
- MEYER, J.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 18, n. 3, p. 203-208, 2003.
- MINAMI, K.; RAYMOND, C.; MARTIN-MOUTOT, N. et al. Role of Thr¹¹ in the binding of ω -conotoxin MVIIC to N-type Ca²⁺ channels. *FEBS Let.*, v. 491, p. 127-130, 2001.
- NARS, S. H.; SCHWARZ, R.; D'AGATI, V. D. et al. Paraplegia, proteinuria, and renal failure. *Kidney Intern.*, v. 69, p. 412-415, 2006.
- NEBE, J.; VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Spinal application of ω -conotoxin GIVA, an N-type calcium channel antagonist, attenuates enhancement of dorsal spinal neuronal responses caused by intra-articular injection of mustard oil in the rat. *Exp. Brain Res.*, v. 120, p. 61-69, 1998.
- NORTON, R. S.; OLIVERA, B. M. Conotoxins down under. *Toxicon*, v. 48, p. 780-798, 2006.
- 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, n. 6, p. 762-769, 2003.
- OLIVERA, B. M.; CRUZ, L. J.; SANTOS, V. et al. Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using ω -conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochem.*, v. 26, p. 2086-2090, 1987.
- OLIVERA, B. M.; MILJANICH, G.; RAMACHANDRAN, J. et al. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 63, p. 823-867, 1994.
- OLIVERA, B. M.; TEICHERT, R. W. Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: a model of concerted pharmacological discovery. *Mol. Interv.*, v. 7, n. 5, p. 251-260, 2007.
- ONIFER, S. M.; RABCHESVKY, A. G.; SCHEFF, S. W. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J.*, v. 48, n. 4, p. 385-395, 2007.
- PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C. et al. Snake venom as therapeutic agents:

- from toxin to drug development. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 40, p. 1353-1358, 2002.
- PALUDO, G. R.; MEMANUS, C.; MELO, R. Q. et al. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exército brasileiro. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 31, p. 1130-1142.
- PINHEIRO, A. C. N.; SILVA, A. J.; PRADO, M. A. M. et al. Phosphatidylcholine block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus*, v. 19, n. 11, p. 1123-1129, 2009.
- PORTIANSKY, E. L.; BARBEITO, C. G.; GIMENO, E. J. et al. Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging. *Exp. Neurol.*, v. 202, p. 519-521, 2006.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Res.*, v. 45, p. 125-141, 2004.
- RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg. Neurol.*, v. 10, n. 1, p. 38-43, 1978.
- 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.; GREGORY, W. J.; HAWRYLUK, M. D. et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus*, v. 25, n. 5, suppl. E2, p. 1-17, 2008.
- RUIZ, A.; MATUTE, C.; ALBERDI, E. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} release through ryanodine and IP_3 receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium*, v. 46, p. 273-281, 2009.
- SALIM, A.; HADJIZACHARIA, P.; DuBOSE, J. et al. What is the significance of thrombocytosis in patients with trauma? *J. TRAUMA*, v. 66, p. 1349-1354, 2009.
- SANTANA, A. M.; FAGLIARI, J. J.; CAMARGO, C. M. S. et al. Proteinograma sérico de veados-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) criados em cativeiro obtido por eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida (SDS PAGE). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, n. 6, p. 1560-1563, 2008.
- SATO, K.; RAYMOND, C.; MARTIN-MOUTOT, N. et al. Binding of chimeric analogs of ω -conotoxin MVIIA and MVIIIC to the N- and P/Q-type calcium channels. *FEBS Letters*, v. 414, p. 480-484, 1997.
- SCOTT, V. E. S.; FELIX, R.; ARIKKATH, J. et al. Evidence for a 95 kDa short form of the α_{1A} subunit associated with the ω -conotoxin MVIIIC receptor of the P/Q-type. *J. Neuroscience*, v. 18, n. 2, p. 641-647, 1998.
- 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 espinal de cães e gatos. *Med. Vet.*, v. 1, n. 2, p. 78-85, 2007.
- SHEN, G. S.; LAYER, R. T.; McCABE, T. Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. *DDT*, v. 5, n. 3, p. 98-105, 2000.
- 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.
- SNUTCH, T. P.; SUTTON, K. G.; ZAMPONI, G. W. Voltage-dependent calcium channels – beyond dihydropyridine antagonists. *Cur. Opin. Pharmacol.*, v. 1, p. 11-16, 2001.
- SOTO, J. C. H.; OLIVEIRA, R. G.; MENEGUETI, V. C. et al. Policitemia e eritrocitose em animais domésticos – revisão de literatura. *Rev. Cient. Elet. Med. Vet.*, n. 11, ISSN: 1679-7353, 2008.
- 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.
- SULLIVAN, P. G.; SPRINGER, J. E.; HALL, E. D. et al. Mitochondrial uncoupling as a therapeutic target following neuronal injury. *J. Bioenerg. Biomemb.*, v. 36, n. 4, p. 353-356, 2004.
- TAKAZAWA, A.; YAMAZAKI, O.; KANAI, H. et al. Potent and long-lasting anticonvulsant effects of 1-naphthylacetyl spermine, na analogue of Joro spider toxin, against amygdaloid kindled seizures in rats. *Brain Res.*, v. 706, p. 173-176, 1996.
- TALAC, R.; FRIEDMAN, J. A.; MOORE, M. J. et al. Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials*, v. 25, p. 1505-1510, 2004.
- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Neurobiol.*, v. 56, p. 341-358, 1998.
- TARLOV, I. M.; KLINGER, H.; VITALE, S. Spinal cord compression studies: experimental techniques to produce acute and gradual compression. *Arch. Neurol. Psychiatry.*, v. 70, n. 6, p. 813-819, 1953.
- TATOR, C. H. Strategies for recovery and regeneration after spinal cord injury. *Inj. Prev.*, v. 8, suppl. IV, p. iv33-iv36, 2002.
- TENNANT, B. C.; CENTER, S. A. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. cap. 13, p. 379-412.
- TERLAU, H.; OLIVERA, B. M. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.*, v. 84, p. 41-68, 2004.
- THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W. et al. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Rocca, 2006. 582p.
- TORRES, B. B. J.; SILVA, C. M. O.; ALMEIDA, Á. E. R. F. et al. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, n. 1, p. 92-99, 2010.
- 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, n. 5, p. 719-733, 2003.
- TURNER, T. J.; LAMPE, R. A.; DUNLAP, K. Characterization of presynaptic calcium channels with ω -conotoxin MVIIC and ω -grammotoxin SIA: role for a resistant calcium channel type in neurosecretion. *Mol. Interv.*, v. 47, p. 348-353, 1995.
- UCHITEL, O. D. Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon.*, v. 35, p. 1161-1191, 1997.
- VALADE, N.; DECAILLIOT F.; RÉBUFAT, Y. et al. Thrombocytosis after trauma: incidence, aetiology, and clinical significance. *Br. J. Anaesth.*, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2005.

- VALENTINO, K.; NEWCOMB, R.; GADBOIS, T. et al. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Pract. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 7894-7897, 1993.
- VANICKÝ, I.; URDŽÍKOVÁ, L.; SAGANOVÁ, K. et al. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J. Neurotrauma*, v. 18, n. 12, p. 1399-1407, 2001.
- WALL, B. M.; HUCH, K. M.; MANGOLD, T. A. et al. Risk factors for development of proteinuria in chronic spinal cord injury. *Am. J. Kidney Dis.*, v. 33, n. 5, p. 899-903, 1999.
- WEISS, D. J.; WARDROP, J.; SCHALM, O. W. *Schalm's veterinary hematology*. 6. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010, 1206p.
- WHORLOW, S. L.; LOIACONO, R. E.; ANGUS, J. A. et al. Distribution of N-type Ca²⁺ channel binding sites in rabbit brain following central administration of ω -conotoxin GVIA. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 315, p. 11-18, 1996.
- WOLF, H. K.; BUSLEI, R.; SCHMIDT-KASTNER, R. et al. NeuN: useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 44, n. 10, p. 1167-1171, 1996.
- WRIGHT, C. E.; ANGUS, J. Effects of N-, P- and Q-type neuronal calcium channel antagonists on mammalian peripheral neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.*, v. 119, p. 49-56, 1999.
- XU, P.; WEI-MING, G.; LI, Y. et al. Destructive pathological changes in the rat spinal cord due to chronic mechanical compression. *Spine*, v. 8, p. 279-285, 2008.
- 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.
- 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.
- ZOLI, M.; MORETTI, M.; ZANARDI, A. et al. Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J. Neuroscience*, v. 22, n. 20, p. 8785-8789, 2002.

Anexo I



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 75/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Ômega-Conotoxina MVIIC do veneno de caramujos marinhos (*Conus magus*) no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo**", que tem como responsável(is) **Eliane Gonçalves de Melo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/06/2010**.

Este certificado expira-se em **9/06/2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 75/2010**, related to the project entitled "**Omega-conotoxin MVIIC of cone snails (*Conus magus*) venom in the rat treatment submitted to spinal cord compressive acute injury**", under the supervisors of **Eliane Gonçalves de Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 9, 2010**.

This certificate expires in **June 9, 2015**.

Belo Horizonte, 14 de Junho de 2010.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)