

KAREN MACIEL DE OLIVEIRA

**ω-CONOTOXINA MVIIA ISOLADA OU ASSOCIADA AO DANTROLENE
SÓDICO NO TRAUMA MEDULAR AGUDO EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientador: Profa. Dra. Marília Martins Melo

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2014

O48o Oliveira, Karen Maciel de, 1983-
ω-conotoxina MVIIA isolada ou associada ao dantrolene sódico no trauma medular agudo em ratos / Karen Maciel de Oliveira. – 2014.
129 p. : il.

Orientador: Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientador: Marília Martins Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Traumatismo da medula espinhal – Teses. 3. Medicamentos – Administração – Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Melo, Marília Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 7

FOLHA DE APROVAÇÃO

KAREN MACIEL DE OLIVEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 12 de setembro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Eliane Gonçalves de Melo

Prof^a. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador

Alexandre Mazzanti

Prof. Alexandre Mazzanti
Universidade Federal de Santa Maria

Mário Sérgio Lima de Lavor

Prof. Mário Sérgio Lima de Lavor
Universidade Estadual de Santa Cruz

Benito Soto Blanco

Prof. Benito Soto Blanco
Escola de Veterinária - UFMG

Milene Alvarenga Rachid

Prof^a. Milene Alvarenga Rachid
Instituto de Ciência Biológicas - UFMG

“Em questão de cultura e saber

Só se perde o que se guarda

Só se ganha o que se dá”

(Antônio Machado)

AGRADECIMENTOS

A força divina que possibilita caminhos lindos e alguns inexplicáveis, fornecendo coragem e sabedoria para viver cada etapa de nossas vidas. Gratidão por tudo o que se foi, tem sido e o que virá!

A minha amada família, em especial, pais e irmãs, pela compreensão e apoio sempre! Agradeço por deixarem a estrada muito mais dócil, tranquila e segura.

Aos meus animais e aqueles que não são meus, que sempre me inspiraram, quanto à profissão, ao amor, carinho, respeito, lealdade e me ensinaram o amor incondicional.

Aos animais que cederam suas vidas para realização desse projeto, em prol de tantas outras vidas! Gratidão eterna!

A professora Eliane, pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação. Obrigada pelos conhecimentos, apoio, confiança e o engrandecimento na minha formação no decorrer desses anos!

A minha co-orientadora, Marília, pelos conselhos, apoio, disponibilidade e abertura do seu laboratório. Muito obrigada!

Ao professor Marcus Vinícius Gomez, pela parceria e por ter me auxiliado e recebido tão prontamente em seu laboratório. E a sua pós-doutoranda, Nancy, pelas opiniões enriquecedoras e o suporte pleno nas etapas e dificuldades do projeto!

A equipe de neurologia, Carla, Mário, Isabel, Tatiana, Bernardo, pela ajuda nos experimentos cada um na sua essencialidade!

Aos amigos, André, Enilma, Felipe, Juneo, Juliana, Karine, Lorena, Michelle, Patrícia, Simone, Vivian, Endrigo pelo apoio, amizade e carinho!

Aos queridos trabalhadores do Hospital Veterinário, Fábio, Carlos, Luís, Adão, Leimar, Natália, Elizete, Ronaldo, Renan, Luzette que sempre me receberam com grande sorriso e disposição! Muito obrigada por deixar os dias de trabalho mais suaves!

Ao apoio fundamental do CNPq pela bolsa e apoio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

Agradeço a todos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional em mais essa etapa da minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE ANEXOS	12
LISTA DE ABREVIACÕES	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1. Revisão de Literatura	19
1. Trauma medular.....	19
2. Fisiopatologia do trauma medular.....	21
2.1 A excitotoxicidade pelo glutamato.....	24
2.2 O influxo exacerbado do cálcio.....	25
2.3 Óxido nítrico.....	28
2.4 Disfunção mitocondrial.....	28
2.5 Estresse oxidativo.....	29
2.6 Sistema de defesa antioxidante.....	30
2.7 Morte por apoptose.....	31
3. Uso de bloqueadores de canais para cálcio como agentes neuroprotetores.....	32
3.1 Toxinas de caramujos marinhos.....	33
3.1.1 Ômega-conotoxina MVIIA.....	35
3.2 Dantrolene sódico.....	36
4. Modelo experimental.....	37
4.1 Estudo <i>in vivo</i>	37
4.2 Modelo do trauma.....	37
CAPÍTULO 2. Comparação entre diferentes modelos de aplicação da MVIIA no trauma medular agudo em ratos	38
RESUMO	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	39
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	72
CAPÍTULO 3. Efeito antioxidante da ω-conotoxina MVIIA no trauma medular agudo em ratos	73
RESUMO	73
INTRODUÇÃO	74
MATERIAL E MÉTODOS	74
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	81
CONCLUSÃO	82
CAPÍTULO 4. Efeito da associação de bloqueadores de canais para cálcio, ω-conotoxina MVIIA e dantrolene, no trauma medular agudo em ratos	84
RESUMO	84
INTRODUÇÃO	85
MATERIAL E MÉTODOS	86
RESULTADOS	91

DISCUSSÃO.....	98
CONCLUSÃO.....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 -	Localização dos neurônios motores superiores e inferiores e sintomatologia característica.....	21
Figura 2 -	Lesões após o trauma medular.....	22
Figura 3 -	Caracterização histológica da medula espinhal após o trauma medular.....	24
Figura 4 -	Representação esquemática dos eventos relacionados ao quadro de excitotoxicidade após trauma medular espinhal.....	26
Figura 5 -	Sistema de detoxificação do radical superóxido.....	31
Figura 6 -	Caramujo marinho <i>Conus magus</i>	35

CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Fotografias do procedimento cirúrgico do trauma medular experimental realizado em ratos Wistar tratados com a ω -conotoxina MVIIA.....	42
Figura 2 -	Avaliação da capacidade motora após trauma medular em ratos.....	50
Figura 3 -	Avaliação da MVIIA sobre a liberação do glutamato 48 horas após trauma medular em ratos.....	51
Figura 4 -	Avaliação da MVIIA sobre a viabilidade mitocondrial 48 horas após trauma medular em ratos.....	52
Figura 5 -	Efeito da MVIIA sobre a morte celular 48 horas após trauma medular em ratos.....	53
Figura 6 -	Efeito da MVIIA sobre produção de espécies reativas de oxigênio 48 horas após trauma medular em ratos.....	54
Figura 7 -	Avaliação da MVIIA sobre a lipoperoxidação 48 horas após trauma medular em ratos.....	55
Figura 8 -	Avaliação da capacidade motora após trauma medular em ratos.....	56
Figura 9 -	Efeito da MVIIA sobre a liberação do glutamato 48 horas após trauma medular em ratos.....	56
Figura 10 -	Efeito da MVIIA sobre a viabilidade celular 48 horas após trauma medular em ratos.....	57
Figura 11 -	Efeito da MVIIA sobre a morte celular 48 horas após trauma medular em ratos.....	58
Figura 12 -	Efeito da MVIIA sobre produção de espécies reativas de oxigênio 48	

	horas após trauma medular em ratos.....	59
Figura 13 -	Avaliação da MVIIA sobre a lipoperoxidação 48 horas após trauma medular em ratos.....	59
Figura 14 -	Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa de Bcl-x1 48 horas após trauma medular em ratos.....	60
Figura 15 -	Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa de Bax 48 horas após trauma medular em ratos.....	61
Figura 16 -	Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-9 48 horas após trauma medular em ratos.....	61
Figura 17 -	Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-12 48 horas após trauma medular em ratos.....	62
Figura 18 -	Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da nNOS 48 horas após trauma medular em ratos.....	62
Figura 19 -	Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-8 48 horas após trauma medular em ratos.....	63
Figura 20 -	Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-3 48 horas após trauma medular em ratos.....	63
CAPÍTULO 3		
Figura 1 -	Efeito da MVIIA sobre atividade da superóxido dismutase 48 horas após trauma medular em ratos.....	78
Figura 2 -	Efeito da MVIIA sobre atividade da catalase 48 horas após trauma medular em ratos.....	79
Figura 3 -	Efeito da MVIIA sobre atividade da glutatona peroxidase 48 horas após trauma medular em ratos.....	79
Figura 4 -	Efeito da MVIIA sobre atividade da glutatona redutase 48 horas após trauma medular em ratos.....	80
Figura 5 -	Efeito da MVIIA sobre atividade da glutatona-S-transferase 48 horas após trauma medular em ratos.....	81
CAPÍTULO 4		
Figura 1 -	Avaliação da capacidade motora após o trauma medular em ratos tratados com MVIIA, dantrolene e sua associação.....	92
Figura 2 -	Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a liberação do glutamato 48 horas após trauma medular em ratos.....	92

Figura 3 -	Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a viabilidade mitocondrial 48 horas após trauma medular em ratos.....	93
Figura 4 -	Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a morte celular 48 horas após trauma medular em ratos.....	94
Figura 5 -	Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre produção de espécies reativas de oxigênio 48 horas após trauma medular em ratos.....	95
Figura 6 -	Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a lipoperoxidação 48 horas após trauma medular em ratos.....	95
Figura 7 -	Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre atividade da glutationa peroxidase 48 horas após trauma medular em ratos.....	96
Figura 8 -	Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre atividade da glutationa redutase 48 horas após trauma medular em ratos.....	97
Figura 9 -	Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre atividade da glutationa-S-transferase 48 horas após trauma medular em ratos.....	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	
Tabela 1 -	Genes e sequência de nucleotídeos dos primers iniciadores para RT-PCR em tempo real..... 46
Tabela 2 -	Relação dos animais que apresentaram efeitos colaterais em diferentes doses e vias de aplicação da MVIIA após o trauma medular agudo em ratos..... 48
Tabela 3 -	Porcentagem de ratos com retenção urinária após trauma medular e tratamento com MVIIA por via intralésional e intratecal..... 49

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1	
Quadro 1 -	Principais mecanismos secundários após o trauma medular inicial..... 23

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais..... 127
Anexo 2 -	Descrição dos escores para avaliação da capacidade motora..... 128

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Mi
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA	Análise de variância
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
CAT	Catalase
CCVD	Canais para cálcio voltagem dependentes
CDBN	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
cDNA	DNA complementar
COEC	Canais operados por estoques de cálcio
CT	<i>Threshold</i>
DFC-DA	Diclorofluoresceína-diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EV	Escola de Veterinária
FasL	Faz ligante
FC	<i>Fold change</i>
g	Gramma
GDH	Glutamato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Tripeptídeo glutaciona
GSSG	Dissulfeto glutaciona
GT	Glutaciona transferase
h	Hora
iGLUr	Receptores ionotrópicos
IL	Intralesional
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
IP	Intraperitoneal
IP3	Inositol 1,45-trifosfato
IP3r	Receptor inositol 1,4,5-trifosfato
IT	Intratecal
IV	Intravenosa
KAr	Receptor cainato
LCE	Líquido cerebroespinal
M	Molar
MDA	Malondialdeído
ME	Medula espinal
METr	Receptor metabotrópico
mGLUr	Receptores metabotrópicos de glutamato
mM	Milimolar
MVIA	Ômega-conotoxina MVIA
NaCl	Cloreto de sódio

NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAr	Receptor N-metil-D-aspartato
NMI	Neurônio motor inferior
NMS	Neurônio motor superior
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PL	Peroxidação lipídica
PLA	Placebo
q	Intervalos de aplicação
RE	Retículo endoplasmático
Rir	Receptor rianodina
g	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
s	Segundos
SB	Substância branca
SC	Substância cinzenta
SHAM	Controle negativo
SNC	Sistema nervoso central
SNK	Student Newman Keuls
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TKF	Tampão fosfato de potássio
TMA	Trauma medular agudo
TME	Trauma medular espinhal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TTC	2,3,5 trifeniltetrazólio
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VO	Via oral

RESUMO

Foram realizados três experimentos. O experimento 1 avaliou o efeito neuroprotetor da ω -conotoxina MVIIA (MVIIA) em diferentes doses, tanto pela via intralesional (IL) quanto intratecal (IT) em ratos após trauma medular agudo (TMA), com ensaios de viabilidade mitocondrial, morte celular, dosagem de glutamato, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica. Com a definição da dose e via adequadas, avaliou-se também o momento de aplicação agudo (60 minutos) e subagudo (quatro horas) após o trauma medular. Após definição do momento de aplicação, avaliou-se a expressão gênica de fatores relacionados a apoptose. O experimento 2 avaliou os efeitos antioxidantes da MVIIA após o TMA em ratos, com quantificação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GT) e glutathione reductase (GR). O experimento 3 avaliou os efeitos neuroprotetores e antioxidantes da associação dos diferentes bloqueadores de canais para cálcio, a MVIIA e o dantrolene, em ratos após o TMA. No experimento 1, a MVIIA aplicada por via IT, quatro horas após o trauma, na dose de 10 μ M apresentou efeito neuroprotetor com redução da morte celular em 22,46% \pm 2,99, do estresse oxidativo, da expressão de fator pró-apoptótico (Bax), da caspase-3, caspase-8, nNOS e aumento da viabilidade mitocondrial e do fator antiapoptótico (Bcl-x1). No experimento 2, sugeriu-se que uma possível via da neuroproteção apresentada pela MVIIA envolva seu potencial antioxidante, com aumento, em relação ao placebo (100), da enzima SOD (188,41% \pm 72,05), GPx (199,96% \pm 68,65), GR (193,86% \pm 59,39) e GT (175,93% \pm 68,92). No experimento 3, observou-se que não houve diminuição da morte celular com a associação da MVIIA e dantrolene (82,70% \pm 17,02), apesar da redução das ERO (68,34% \pm 17,33) e aumento da atividade da GR (229,18% \pm 116,58). Conclui-se que a MVIIA possui potencial neuroprotetor e que os possíveis mecanismos envolvidos estejam relacionados à modulação do sistema antioxidante e das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Além disso, não houve efeito de adição farmacológica na associação da MVIIA ao dantrolene.

Palavras chave: conotoxina, MVIIA, trauma medular, neuroproteção, apoptose, antioxidante, dantrolene, ratos.

ABSTRACT

Three experiments were performed. Experiment 1 evaluated the neuroprotective potential of ω -conotoxin MVIIA (MVIIA) at different doses, via intralesional and intrathecal in rats after acute spinal cord injury with mitochondrial viability, cell death, glutamate levels, production of reactive oxygen and lipid peroxidation assays. Defining the proper dose and route, it was also evaluated the time of application, acute (60 minutes) and subacute (four hours), after spinal cord trauma. After setting the time of application, it was evaluated the gene expression of apoptosis-related factors. Experiment 2 assessed the antioxidants effects of MVIIA after acute spinal cord injury in rats, quantifying of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GT) and glutathione reductase (GR). Experiment 3 evaluated the antioxidant and neuroprotective effect of calcium channel blockers association, MVIIA and dantrolene, in rats after acute spinal cord injury. The experiment 1 showed that the MVIIA applied intrathecally, four hours after the trauma, at a dose of 10 μ M has neuroprotective effect reducing neuronal death in 22.46% \pm 2.99, oxidative stress, expression of pro-apoptotic factor (Bax), caspase-3, caspase-8, nNOS and increased mitochondrial viability and anti-apoptotic factor (Bcl-xl). The experiment 2 suggested that a pathway of MVIIA neuroprotection was provided due to its antioxidant effects, with increase, related to placebo, in enzymes SOD (188.41% \pm 72.05), GP (199.96% \pm 68.65), GR (193.86% \pm 59.39) e GT (175.93% \pm 68.92). The experiment 3 showed that there was no cell death reduction in association of MVIIA and dantrolene (82.70% \pm 17.02), despite declining ERO (68.34% \pm 17.33) and increasing GR (229.18% \pm 116.58). It was concluded that MVIIA has a neuroprotective potential and the possible mechanisms are related to modulation of antioxidant system and apoptosis pathways intrinsic and extrinsic. Moreover, there was not effect of pharmacological addition on the association MVIIA and dantrolene.

Keywords: *contoxin, MVIIA, spinal cord injury, neuroprotection, apoptosis, antioxidant, dantrolene, rats.*

INTRODUÇÃO

O trauma medular espinhal (TME) ainda é uma das principais causas de debilidade permanente, liderando os maiores desafios de reabilitação, que não só afeta a qualidade de vida do paciente, como de todas as pessoas ao redor. Os déficits neurológicos estão relacionados ao trauma inicial e, principalmente, à extensão das lesões secundárias neurodegenerativas que limitam o processo restaurativo. Dessa forma, as estratégias terapêuticas focam no combate à cascata de eventos secundários desencadeada logo após o trauma medular (Oyinbo, 2011; Jia et al., 2013).

Entre esses eventos, o excesso do cálcio intracelular é um dos mais críticos, pois determina alterações iônicas e gera morte celular por apoptose e necrose pelo aumento da ativação de enzimas celulares, danos mitocondriais, acidose e produção de radicais livres (Isaac e Pejic, 1995; Amar e Levy, 1999; Lu et al., 2000; Carlson e Gorden, 2002; Hall e Springer, 2004; Liu et al., 2011). Sabe-se que a medula espinhal (ME) possui canais para cálcio voltagem dependente (CCVD) dos tipos N e P/Q (Dunlap et al., 1995; Diaz e Dickenson, 1997), sendo o tipo N expresso em altas concentrações nas lâminas dorsais da substância cinzenta (Gohil et al., 1994). Dessa maneira, agentes bloqueadores de canais para cálcio mostram grande potencial na redução de injúrias cerebrais e medulares, por impedir o influxo exacerbado desse íon secundário à lesão, e assim, prevenir sua progressão (Choi, 1992; Lanz et al., 2000).

A MVIIA (*Ziconotide* ou Prialt®), toxina proveniente de caramujos marinhos, purificada inicialmente como SNX-111, é um potente bloqueador reversível dos canais para cálcio tipo N (Nadasdi, 1995; Lewis, 2000), capaz de inibir, em sinaptossomas, a liberação de diferentes neurotransmissores, como norepinefrina

(Gaur et al., 1994; Bowersox et al., 1995; Ghosh e Greenberg, 1995; Igelmund et al., 1996) e glutamato (Gonçaves et al., 2011), que são essenciais no desenvolvimento da lesão espinhal secundária (Olivera et al., 1994; Uchitel, 1997; Minami et al., 2001). Esse medicamento foi aprovado nos Estados Unidos, pela *Food and Drug Administration* para uso terapêutico por suas propriedades analgésicas, sendo utilizada atualmente no tratamento de dores crônicas graves e neuropáticas do câncer (Olivera et al., 1994; Greenberg, 1997; Bowersox e Luther, 1998; Bingham et al., 2010; Souza et al., 2013). Além disso, a aplicação da MVIIA tem mostrado neuroproteção significativa em lesões cerebrais traumáticas em ratos (Hovda et al., 1994; Verweij et al., 1997; Bowersox e Luther, 1998; Berman et al., 2000; Verweij et al., 2000), em modelos de isquemia cerebral em ratos (Valentino et al., 1993; Buchan et al., 1994; Bowersox et al., 1997) e coelhos (Perez-Pinzon et al., 1997) e isquemia medular em ratos (Burns et al., 1999). Todavia, não há relatos, ainda, na literatura sobre investigação neuroprotetora da MVIIA no trauma medular agudo (TMA) (pesquisa em bases de dados Google e Pubmed – português, inglês e espanhol). Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos neuroprotetores da ω -conotoxina MVIIA em diferentes doses, modelos e momentos de aplicação e sua associação com dantrolene após o trauma medular agudo.

OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a ação neuroprotetora da MVIIA isolada ou associada ao dantrolene em modelo de trauma medular agudo em ratos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação da MVIIA sobre a liberação de glutamato após o trauma medular agudo (Capítulo 2).
- Avaliar o efeito da MVIIA sobre a viabilidade mitocondrial e morte celular após o trauma medular agudo (Capítulo 2).
- Avaliar a ação da MVIIA sobre a geração de espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação após o trauma medular agudo (Capítulo 2).
- Avaliar a ação da MVIIA sobre a expressão gênica de fatores relacionados a apoptose Bax, Bcl-x1, caspase-3, caspase-8, caspase-9, caspase-12 e nNOS após o trauma medular agudo (Capítulo 2).
- Avaliar a ação da MVIIA sobre o sistema de defesa antioxidante com avaliação da atividade enzimática (superóxido dismutase, catalase, glutathiona redutase, glutathiona-S-transferase e glutathiona peroxidase) após o trauma medular agudo (Capítulo 3).
- Avaliar o efeito da MVIIA associada ao dantrolene sobre a liberação do glutamato após o trauma medular agudo (Capítulo 4).
- Avaliar o efeito neuroprotetor da MVIIA associada ao dantrolene sobre a viabilidade mitocondrial e morte celular após o trauma medular (Capítulo 4).
- Avaliar o efeito neuroprotetor da MVIIA associada ao dantrolene sobre a

produção de espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação após o trauma medular (Capítulo 4).

- Avaliar o efeito neuroprotetor da MVIIA associada ao dantrolene sobre atividade enzimática do sistema antioxidante (glutathiona redutase, glutathiona-S-transferase e glutathiona peroxidase) após o trauma medular (Capítulo 4).

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

1. O trauma medular

O TME é um evento grave, repentino e inesperado que pode ser devastador na vida das pessoas e dos animais tanto econômica quanto socialmente, sendo associado diretamente a incapacidades permanentes e diminuição de expectativa de vida. Além de afetar principalmente o gênero masculino (82,9%) com idade altamente produtiva entre 18 a 32 anos (Rahimi-Movaghar et al., 2013), tem-se relatado com frequência em pessoas com mais de 65 anos devido ao aumento da longevidade (Van den Berg et al., 2010; Lee et al., 2013). As informações mundiais sobre prevalência (pessoas com lesão medular) e incidência (casos novos anuais) são escassas em algumas regiões do mundo, mas esses dados globais são estimados, respectivamente, em 236-1009 e 12-36 casos por milhão de habitantes (Cripps et al., 2011; Lee et al., 2013), sendo a incidência mais elevada em países em desenvolvimento (2,1-130,7/milhão habitantes/ano) (Rahimi-Movaghar et al., 2013). Ressalta-se que os países desenvolvidos têm melhorado significativamente a sobrevivência dos pacientes, principalmente em situações de tetraplegia, enquanto os em desenvolvimento apresentam ainda alta taxa de mortalidade (26%) (Neumann et al., 2009; Cripps et al., 2011).

As principais causas extrínsecas envolvidas no TME são, na seguinte ordem no Brasil, acidentes automobilísticos (31-39%), quedas (26-39%), violência (12-21%) e acidentes esportivos (7-14%) (Brasil e Coelho, 1998; Neumann et al., 2009). Considerando dados mundiais, há alteração nessa disposição dependendo da situação atual dos países como, por exemplo, conflitos internacionais (Lee et al., 2013). Além dessas etiologias, lesões intrínsecas

também culminam em lesões medulares, principalmente em paraplegia, devido a distúrbios degenerativos do canal vertebral, neoplasias, alterações vasculares e de desenvolvimento, causas inflamatórias/imunomediadas e infecções virais e bacterianas (New et al., 2014).

Os danos na ME resultam em déficits neurológicos com alteração nas funções motoras, sensoriais e autonômicas. Dependendo da altura da lesão se torácica, lombar ou sacral, gera-se a paraplegia, ou cervical em tetraplegia, com predominância do primeiro tipo (58,7%) (Barros et al., 1990; Campos da Paz et al., 1992; Divanoglou e Levi, 2009; Rahimi-Movaghar et al., 2013). O TME gera também complicações secundárias em diversos sistemas do organismo e quem lidera esse grupo são as úlceras de decúbito. Além disso, há ocorrências no sistema urinário como infecções, incontinência, cálculo renal; no sistema gastrointestinal com constipação, colicistite, apendicite, pancreatite; no sistema cardiovascular com disreflexia autonômica, tromboembolismo; no sistema respiratório com infecções do trato respiratório, falha ventilatória, apneia do sono; no sistema musculoesquelético com osteoporose, fraqueza muscular, paralisia, atrofia, espasticidade, dor; no sistema endócrino com hipercalcemia; em órgãos sexuais com disfunção erétil, infertilidade masculina; e alterações psiquiátricas como depressão (Rahimi-Movaghar et al., 2013).

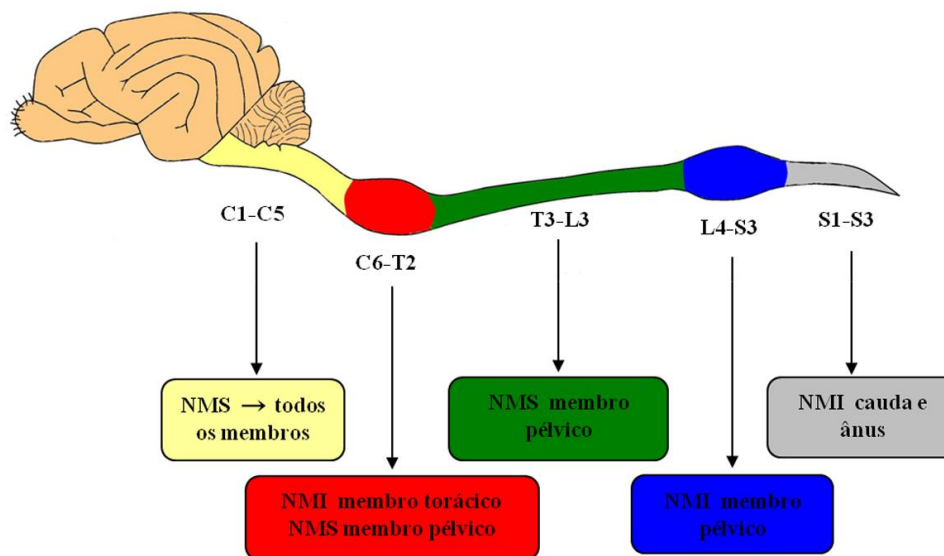
Na medicina veterinária, as lesões traumáticas à coluna vertebral também ocorrem frequentemente, sendo a causa de morte ou razão para eutanásia em 49,2% dos animais com lesão medular (Mendes e Arias, 2012). As informações sobre as frequências do trauma medular em animais de companhia são mínimas, mas tem sido relatada predominância em machos (68%), domiciliados (79%), com menos de cinco anos de idade (68%) correlacionado ao

comportamento imprudente desses animais (Chai et al., 2008; Mendes e Arias, 2012). Dentre as causas mais comuns na veterinária, destacam-se atropelamentos (66%), agressão por outro animal (9%) e quedas (7%) (Chai et al., 2008; Figuera et al., 2008; Mendes e Arias, 2012). Além disso, existe a lesão medular intrínseca, com maior ocorrência para a doença degenerativa do disco vertebral (27,8 em cada 10000 cães/ano), a qual atinge constantemente raças condrodistróficas, machos (60,2%), de área urbana (57%) (Bergknut et al., 2012), sendo a maioria dos animais acometidos castrados (72,8%) (Olby et al., 2003).

O TME pode afetar diferentes partes, mas os segmentos medulares mais acometidos, na medicina veterinária, são toracolombar/lombar (49-68,1%) e lombossacro (19,3-33%) (Bali et al., 2009; Mendes e Arias, 2012), possivelmente por serem os segmentos mais fracos do esqueleto axial, sofrerem com altas forças estáticas e dinâmicas (Zotti et al., 2011), e a presença de estreitamento do canal vertebral na região toracolombar (Olby et al., 2003; Coates, 2004; Bubenik e Hosgood, 2008). A apresentação neurológica e severidade do trauma são ditadas pela localização, força do trauma inicial e extensão dos eventos patológicos

secundários, os quais variam desde hiperestesia espinhal até para/tetraplegia (Chai et al., 2008) (Fig. 1). Lesões sistêmicas secundárias também são constatadas como dermatites, feridas por pressão, constipação, incontinência fecal (Chen et al., 2005; Cerda-Gonzalez e Olby, 2006), incontinência ou retenção urinária, infecção urinária (Olby et al., 2010), pielonefrite e insuficiência renal aguda, que culminam na redução da qualidade e expectativa de vida do paciente (Olby et al., 2003; Santos et al., 2011).

A recuperação neurológica depende da gravidade da lesão, do seu tempo de duração e da localização (Delamarter et al., 1995). 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; Castro et al., 2013).



SINTOMATOLOGIA		
EXAME CLÍNICO	NMI	NMS
Postura	Dificuldade na sustentação do peso; posição agachada	Frequentemente normal; Posição anormal dos membros (adução, abdução, cruzados)
Ambulação	Passos curtos; tendência a cair	Passos duros e atáxicos
Função motora	Paresia flácida/paralisia	Paresia espástica/paralisia
Reflexos espinhais	Diminuídos a ausentes	Normal a aumentado
Tônus muscular	Diminuídos a ausentes	Normal a aumentado
Atrofia muscular	Atrofia precoce e grave	Atrofia tardia e moderada

Figura 1 – Localização dos neurônios motores superiores e inferiores e sintomatologia característica. A apresentação neurológica é relacionada à localização do trauma inicial, sendo classificada em desordens neurológicas de neurônios motor inferior (NMI) ou superior (NMS). (Fonte: Adaptado de Garosi, 2004 e Fitzmaurice, 2011).

2. Fisiopatologia do trauma medular

A compreensão da fisiopatologia do trauma medular é necessária para o desenvolvimento de terapias neuroprotetoras. Embora estejam envolvidos tanto mecanismos primários quanto secundários (Fig. 2), as pesquisas focam no entendimento de lesões

secundárias e redução da morte celular após o trauma medular, já que o impacto inicial pode ser apenas prevenido (Oyinbo, 2011). A lesão é caracterizada por processo contínuo de destruição tecidual, reparação e cicatrização da lesão ao redor e no local do trauma mecânico (Grill, 2005; Severo et al., 2007).

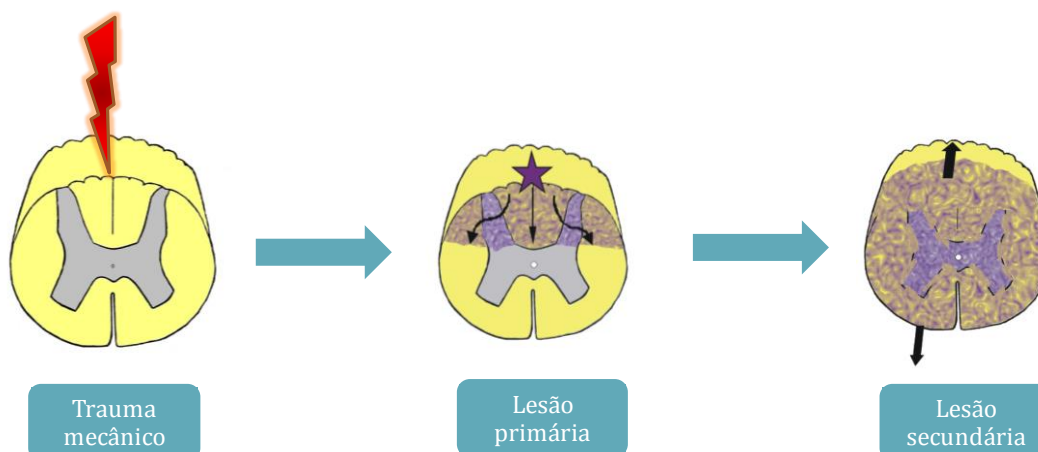


Figura 2 – Lesões após o trauma medular. No momento do trauma, ocorre a lesão primária que acarreta a ruptura de axônios, corpos neuronais e células da neuroglia, resultando na interrupção da passagem dos impulsos nervosos. Na sequência, iniciam-se eventos neurodegenerativos secundários, os quais são responsáveis pela presença de sequelas e redução das chances de recuperação do indivíduo. (Fonte: Karen Maciel de Oliveira).

Segundos após o impacto mecânico medular, a fase aguda se inicia com hemorragia imediata e rápida morte celular, sendo caracterizada tanto por alterações sistêmicas quanto localizadas como hipotensão, vasoespasmos, isquemia, comprometimento da membrana plasmática, desequilíbrio iônico, acúmulo de neurotransmissores e interrupção dos impulsos nervosos (Grill, 2005; Severo et al., 2007; Oyinbo, 2011). Na sequência, em minutos, desenvolve-se a fase subaguda definida por uma cascata de eventos secundários como alterações vasculares, resposta inflamatória, desequilíbrio iônico, aumento de neurotransmissores excitatórios e estresse oxidativo, que apesar de serem essenciais para o funcionamento normal da célula, quando exacerbados são correlacionados a apoptose/morte celular e ao impedimento da recuperação neurológica (Sekhon e Fehlings, 2001; Cadotte e Fehlings, 2011; Jia et al., 2013). A maior parte desses eventos ocorre ou é ativada na fase subaguda, em torno de 48 horas após o TME (Li et al., 1996; Dong et al., 2000; Lu et al., 2000; Hwan et al., 2006; Oyinbo, 2011; Yip e Malaspina, 2012), mostrando altos índices de expressão ou produção

proteica dos fatores nesse momento (Hwan et al., 2006) (Quadro 1).

Quadro 1 - Principais mecanismos secundários após o trauma medular inicial.

FASES NO TRAUMA MEDULAR		
AGUDA	SUBAGUDA	CRÔNICA
Hipotensão sistêmica		
Vasoespasmo	Vasoespasmo	
Morte celular pela lesão direta	Morte celular pela lesão direta	
Isquemia	Isquemia	
Edema	Edema	
Desequilíbrio iônico	Desequilíbrio iônico	
Acúmulo de neurotransmissores	Acúmulo de neurotransmissores	
Comprometimento da membrana plasmática	Comprometimento da membrana plasmática/permeabilidade	
Produção de radicais livres		
Peroxidação lipídica		
Excesso de óxido nítrico		
Excesso de noradrenalina		
Depleção energética e diminuição de ATP		
Invasão de células imunes e liberação de citocinas		
Morte celular mediada por inflamação		
Inibição de fatores de crescimento de neuritos		
Cromatólise central		
Compressão vertebral/instabilidade		
	Desmielinização de axônios sobreviventes	Desmielinização contínua
	Apoptose	Apoptose contínua
	Início de cavitação central	Cavitação contínuo
	Início da cicatriz astrogial	Cicatriz glial
Alteração dos canais iônicos e receptores		
Processo regenerativo		
Neurocircuitos alterados		
Siringomielia		

Adaptado de Oyinbo (2011).

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 (Fig. 3). Além disso, podem-se desenvolver cistos locais (Zhang et al., 1997), cicatriz astrogial

extensa (Rossignol et al., 2007), dissolução da substância cinzenta, deposição de tecido conectivo e gliose, degeneração axonal pela diminuição da perfusão local, degeneração

neuronal (Kikukawa et al., 1998), obstrução da drenagem venosa e os efeitos diretos da pressão sobre a função celular (Talach et al., 2004; Grill, 2005; Severo et al., 2007).



Figura 3 – Caracterização histológica da medula espinhal após o trauma medular. A lesão inicial se expande progressivamente tanto no sentido retrógrado quanto anterógrado com características de desmielinização parcial ou total responsável pelos déficits de condução. Na área do trauma inicial e proximidades, há regiões de malácia (asterisco) na substância branca (SB) e cinzenta (SC) (Oliveira, 2012).

2.1 A excitotoxicidade pelo glutamato

No trauma medular, as concentrações extracelulares de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, alcançam níveis elevados e levam a transmissão sináptica excitatória prolongada com ativação de mecanismos glutamatérgicos, culminando em eventos neurotóxicos (McAdoo et al., 2000; Mills et al., 2001; Hulsebosch, 2002; Hausmann, 2003; Rowland et al., 2008). A excitotoxicidade se refere ao estado patológico causado pela exposição excessiva ou prolongada ao glutamato, o que resulta em morte neuronal (Doble, 1999). Normalmente, após a liberação do glutamato, proteínas específicas transportadoras rapidamente o removem da fenda sináptica, prevenindo acumulações e consequentes efeitos indesejáveis (McAdoo et al., 2000; Xu et al., 2004; Kim et al., 2011).

Dentro dos primeiros minutos após a lesão medular, o glutamato atinge níveis tóxicos como resultado da lise celular pela lesão mecânica, exocitose e/ou inibição da

recaptação nas fendas sinápticas (McAdoo et al., 2000; Hausmann, 2003; Kwon et al., 2004). O glutamato atinge o pico no líquido cerebrospinal entre 15 (Mills et al., 2001) a 40 minutos (Xu et al., 2004), com redução em uma hora (Liu et al., 2013) e retorno aos níveis basais com três (Liu et al., 1991; Liu e McAdoo, 1993; Xu et al., 2004) a quatro horas após o trauma medular (Ishikawa e Marsala, 1996; Yamamoto e Sakashita, 1998), sendo regulado/recaptado por proteínas transportadoras de glutamato. Logo após o trauma, essas proteínas estão reduzidas tanto no epicentro quanto regiões adjacentes, locais onde houve perdas teciduais e apoptose, sendo que um dos principais transportadores, o GLT-1, permanece reduzido por semanas (Kim et al., 2011; Lepore et al., 2011). Essas proteínas atingem o pico com seis horas depois do TME (Vera-Portocarrero et al., 2002), o que justifica a alta redução do glutamato e, algumas, ainda foram detectadas em altos índices por semanas no tecido medular adjacente ao epicentro, na tentativa de reestabelecer a homeostasia (Kim et al., 2011). Em contrapartida, alguns

autores relatam a persistente elevação do glutamato no líquido cerebrospinal por dias (Kunihara et al., 2004) ou no homogenato medular por semanas dependendo da intensidade da lesão (Panter et al., 1990 citado por Lepore et al., 2011).

Na membrana plasmática, há receptores do glutamato que são divididos em dois subtipos principais, os ionotrópicos (iGLUr) (N-metil-D-aspartato, NMDA; ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico, AMPA; e cainato) e metabotrópicos (mGLUr) (Kunihara et al., 2004). Os iGLUr estão associados a canais iônicos e, quando estimulados, são permeáveis a cátions, como cálcio e sódio. Os mGLUr estão acoplados à proteína G e ligados a um sistema de segundos mensageiros, ativando ou inibindo eventos de transdução do sinal celular. Com a ativação desses receptores, iniciam-se diversos processos celulares como aumento intracelular de cálcio, ativação da proteína quinase C (Choi, 1992), aumento da liberação de glutamato (Herrero et al., 1994), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio e isquemia secundária, os quais levam a morte celular (Nakamura et al., 1994; Liu et al., 1999b; Mills et al., 2001; Brouns et al., 2009; Oyibo, 2011). A excitotoxicidade do glutamato atinge principalmente neurônios e oligodendrócitos, resultando em desmielinização, interrupção de impulsos

nervosos e contribui para déficits motores e sensoriais. Nesse contexto, uma estratégia de neuroproteção é a redução dos níveis dos neurotransmissores excitatórios (Kunihara et al., 2004; Xu et al., 2004; Gensel et al., 2012).

2.2 O influxo exacerbado do cálcio

Embora o cálcio seja fundamental à manutenção da vida, o aumento intracelular exacerbado destaca-se como uma importante via para morte neuronal devido aos seus efeitos deletérios. O aumento do cálcio citoplasmático ocorre através de canais presentes na membrana plasmática, do transporte por bombas iônicas ou da sua liberação de reservas intracelulares. Esse processo envolve canais CCVD, operados por receptores glutamatérgicos, operados pela proteína G, operados por segundos mensageiros e operado por estoque de cálcio (COEC) (Récasens e Vignes, 1995; Greenberg, 1997; Berridge, 2002) (Fig. 4). A depleção do cálcio do meio extracelular em direção ao intracelular se inicia minutos após o insulto mecânico (Young et al., 1982; Stokes et al., 1983; Gelderd e Sampson, 1990), com o primeiro aumento significativo aos 45 minutos, concentração máxima com oito horas (Happel et al., 1981) e pode permanecer elevado por 24 a 48h (Fineman et al., 1993) ou mesmo por semanas (Liverman et al., 2005 citado por Oyibo, 2011).

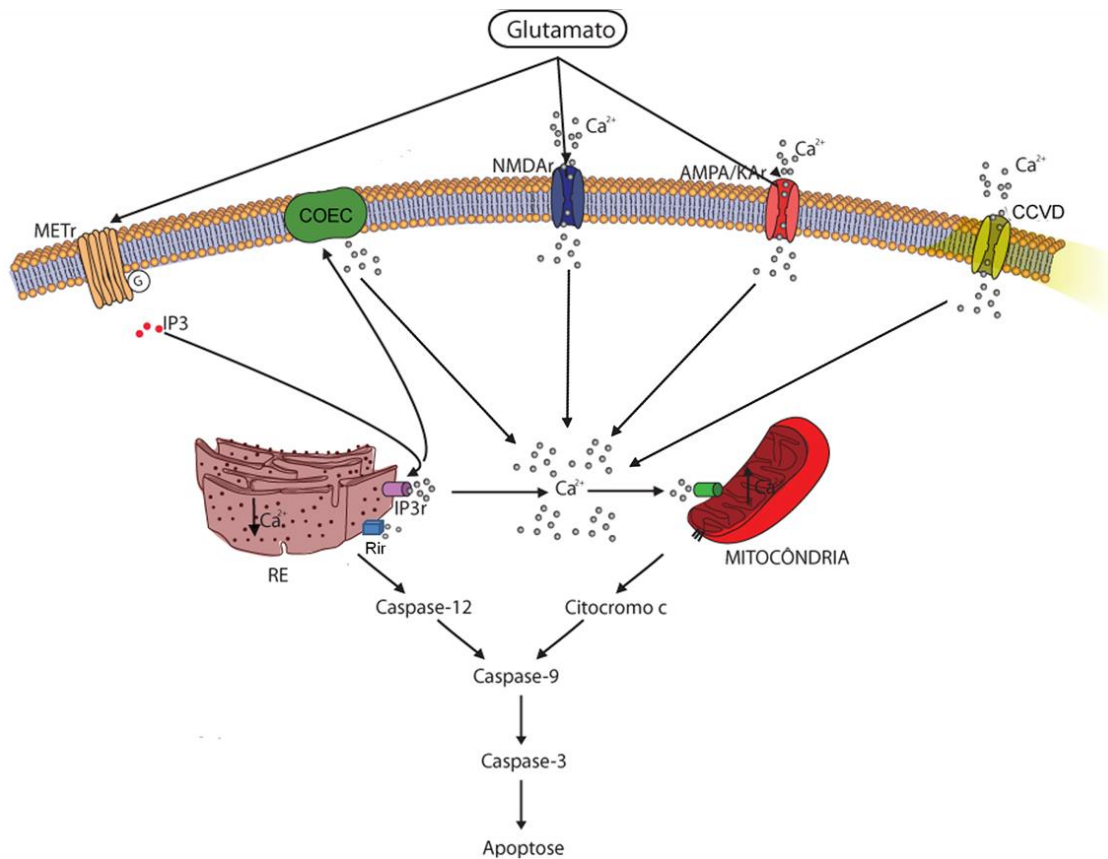


Figura 4 – Representação esquemática dos eventos relacionados ao quadro de excitotoxicidade após trauma medular espinhal. Essa cascata é resultante da alta disponibilidade de glutamato com consequente influxo de cálcio e morte celular por apoptose. (METr: receptor metabotrópico; COEC: canais operados pelo estoque de cálcio; NMDAr: receptores de N-metil-D-aspartato; AMPA: receptores de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico; KAR: receptores de cainato; CCVD: canais para cálcio voltagem dependentes; IP₃: inositol1,4,5-trifosfato; IP₃r: receptores de inositol1,4,5-trifosfato; Rir: receptores de rianodina; RE: retículo endoplasmático; Ca²⁺: cálcio). (Fonte: Felipe Ajzenberg e Karen Maciel de Oliveira)

A ativação de CCVD constitui uma das vias mais importantes de entrada de cálcio e representa um passo chave na regulação dos processos celulares (Uchitel, 1997; Agrawal et al., 2000). A despolarização da membrana plasmática desencadeia uma mudança conformacional na molécula sensível a voltagem, promovendo o influxo do cálcio. Os CCVD são proteínas heteroméricas que compõem o canal de transmembrana formado por subunidades α -1 e subunidades regulatórias (Lory et al., 1997). São divididos em duas grandes classes fisiológicas baseadas nas voltagens de ativação (voltagem de baixo limiar – tipo

T ou alto limiar – tipo L, N, P/Q e R) e três subfamílias, designadas como tipo Cav.1 (L), Cav.2 (N, P/Q e R) e a Cav.3 (T) com base na similaridade de suas características farmacológicas (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). Já o tipo R é ativado por voltagens intermediárias (Uchitel, 1997) presente em corpos celulares e dendritos. E, por último, 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). Na ME, foi evidenciada a participação dos CCVD tipo N, P/Q e R na corrente de cálcio dos motoneurônios (Carlin et al., 2000).

Bloqueadores de CCVD têm mostrado neuroproteção em lesões medulares traumáticas (Lavor, 2013; Oliveira et al., 2014) e isquêmicas (Burns et al., 1999; Lavor, 2013) e lesões cerebrais traumáticas (Hovda et al., 1994; Verweij et al., 1997; Bowersox e Luther, 1998; Berman et al., 2000; Verweij et al., 2000) e isquêmicas (Buchan et al., 1994; Bowersox et al., 1997; Perez-Pinzon et al., 1997).

O aumento intracelular do cálcio também pode ocorrer pela mobilização do íon de reservas intracelulares, como do retículo endoplasmático (RE) através da ativação dos receptores de rianodina (Rir) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃r), os quais possuem papel crucial na função neuronal (Suzuki et al., 2012). A ativação dos canais operados por ligantes (AMPA e KA) produz despolarização da membrana e abertura dos canais NMDA e CCVD, que está intimamente ligada aos Rir, permitindo a liberação do cálcio para o citoplasma. Em neurônios, as três formas dos Rir foram encontradas (Rir1, Rir2 e Rir3) (McPherson e Campbell, 1993; Thorell et al., 2002; Ouardouz et al., 2003; Mori et al., 2005; Zalk et al., 2007) e estão relacionadas a ativação da via de apoptose dependente da sobrecarga de cálcio mitocondrial. Outra via de aumento do cálcio intracelular é

determinada pela ativação de IP₃r por IP₃, um segundo mensageiro formado com a ligação da proteína G a receptores metabotrópicos, o que ocasiona o efluxo do cálcio do RE. Com a depleção do cálcio do RE, gera influxo desse íon extracelular por sinais de abertura de canais para cálcio na membrana plasmática, via conhecida como ativação COEC (Glitsch et al., 2002; Bose e Thomas, 2006).

Evidências têm mostrado importante participação do RE na apoptose em processos neurodegenerativos e excitotóxicos, devido a depleção de cálcio que desencadeia o acúmulo de proteínas desdobradas, ativação da caspase-12, disfunção mitocondrial e morte celular (Berridge, 2002; Ruiz et al., 2009). A utilização de bloqueadores de cálcio que se ligam nos Rir (Zhang et al., 1993; Tasker et al., 1998; Niebauer e Gruenthal, 1999; Aslan et al., 2009; Muehlschlegel e Sims, 2009; Costa, 2010; Torres et al., 2010, 2011) e IP₃r tem evidenciado potencial neuroprotetor (Thorell et al., 2002; Chinopoulos et al., 2004; Lipski et al., 2006).

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 (NO); ativação da fosfolipase A₂ que libera o ácido araquidônico e converte a ciclooxigenase 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).

2.3 Óxido nítrico

O NO é um radical livre com importante participação na patologia do trauma medular. Está envolvido na formação de cavitação na ME após a lesão (Matsuyama et al., 1998). A citotoxicidade do NO é relacionada com sua reação ao ânion superóxido, formando o peroxinitrito e, consequente, lipoperoxidação (Beckman et al., 1990).

Esse radical é produzido a partir da L-arginina por uma reação mediada pela NOS (Palmer et al., 1987), a qual possui três isoformas: induzida (iNOS) ou constitutiva do tipo neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) (Alaqaarsamy et al., 1994), encontradas no SNC (Conti et al., 2007). A nNOS é constantemente expressa por neurônios, sendo dependente do influxo de cálcio, e atua protegendo contra a morte celular (Knowles et al., 1989). Todavia no trauma medular, os aminoácidos excitatórios causam intensa estimulação de receptores NDMA, com influxo de cálcio, gerando produção elevada de NO logo após o trauma e um segundo pico entre 24 e 72 horas (Nakahara et al., 2002). A nNOS, então, perde o papel neuroprotetor quando expressa em alta concentração, sendo relacionada ao primeiro aumento do NO (Nakahara et al., 2002). Dessa maneira, a redução da nNOS tem sido foco na neuroproteção como já demonstrado em ratos submetidos ao trauma medular com recuperação neurológica (Cohen et al., 1996), em ratos com ruptura do plexo braquial (Luo et al., 2014), em ratos com transecção medular (Sharma et al., 2005) tratados com inibidores da nNOS.

Além disso, a iNOS, produzida em condições patológicas como trauma, respostas imunes e desordens inflamatórias independente do cálcio, apresenta potencial neurotóxico no trauma medular, tendo picos de expressão vistos com 24 e 72 horas (Chatzipanteli et al., 2002), apesar de

Satake et al. (2000) e Kwak et al. (2005) relatarem normalização no terceiro dia. Inibidores de iNOs utilizados no trauma medular como aminoguanidina melhoraram os resultados histológicos e neurológicos após trauma medular contusivo (Chatzipanteli et al., 2002).

2.4 Disfunção mitocondrial

O aumento do cálcio dentro da célula contribui diretamente para disfunção mitocondrial (Bernardi et al., 1999), pois na tentativa de interromper os potenciais eventos letais, ela sequestra esse íon para seu interior (Santo-Domingo e Demareux, 2010). Entretanto no TMA, a intensa elevação do cálcio excede a capacidade de tamponamento da mitocôndria, o que compromete a sua função e estabilidade. A disfunção mitocondrial se inicia nas primeiras horas (Azbill et al., 1997; Wingrave et al., 2003; Sullivan et al., 2007) após a lesão, com pico em 12 horas (Singh et al., 2006) e permanece alterada por 24 horas (Azbill et al., 1997; Sullivan et al., 2007) ou as 72 horas (Wu et al., 2009), momento máximo avaliado em trauma medular.

O excesso de cálcio mitocondrial contribui para o gatilho da apoptose pela formação de poros transitórios na membrana interna mitocondrial, edema da mitocôndria com ruptura da membrana externa e, consequente, liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c e fator indutor de apoptose que então ativam caspases executoras como caspase-3 e caspase-7 (Azbill et al., 1997; Berridge, 2002; Xu et al., 2005; Ruiz et al., 2009; Patel et al., 2010; Decuypere et al., 2011). Nessa via intrínseca de apoptose, observa-se a translocação de proteínas próapoptóticas (Bax e Bak) e ativação de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xl, que antagonizam a apoptose a nível mitocondrial (Decuypere et al., 2011).

Além do aumento do cálcio, estudos relacionam a produção de ERO com a desestabilização mitocondrial já que esta é uma das principais fontes desses radicais livres (Lander, 1997; Liu et al., 1998; Sullivan et al., 2007; Wu et al., 2009; Bains e Hall, 2012).

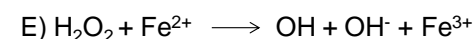
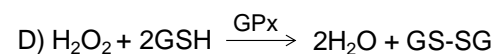
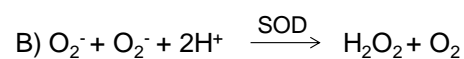
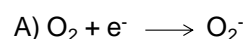
2.5 Estresse oxidativo

Os radicais livres fazem parte de um mecanismo fundamental nas doenças neurológicas, provocando as chamadas lesões oxidativas. Além do aumento de cálcio intracelular ativar vias de produção de radicais livres, a mitocôndria é uma das maiores fontes de geração de ERO proveniente da formação do radical superóxido (O_2^-) na reação respiratória, os quais são altamente reativos a estruturas macromoleculares (Lander, 1997; Liu et al., 1998; Delanty e Dichter, 2000; Xu et al., 2005; Wu et al., 2009; Dasuri et al., 2013).

Em condições normais, a ERO funciona como mensageiro intracelular e modula a resposta celular, a toxicidade e morte da célula (Rhee, 1999). Em excesso, essas moléculas com elétrons não pareados sobrecarregam as defesas antioxidantes, seguido pelo estresse oxidativo onde há modificação estrutural e funcional das moléculas, levando a degeneração e morte neuronal (Qian e Liu, 1997; Liu et al., 1998; Rhee, 1999; Liu et al., 2000, 2003; Varizi et al., 2004; Xiong et al., 2007; Bains e Hall, 2012). Para minimizar essas disfunções, existem as defesas antioxidantes enzimáticas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (Azbill et al., 1997; Nagai et al., 2001; Masella et al., 2005), convertendo a ERO em compostos menos nocivos, sendo importante na regulação do estresse oxidativo no trauma medular (Liu et al., 2004; Ozgiray et al., 2011).

A primeira ERO formada no organismo é o O_2^- (A) (Liu et al., 1998), o qual é

convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Liu et al., 1999a) pela SOD (B). O H_2O_2 , por sua vez, é convertido em água e moléculas de oxigênio pela enzima CAT (C) ou glutatona peroxidase (GPx) do sistema de glutatona (D). Entretanto, na presença de elétrons doadores, como íon ferroso ou excesso de superóxido, o H_2O_2 pode ser convertido em radical hidroxila (OH^-) (E) (Liu et al., 2003), o qual é altamente reativo e citotóxico (Varizi et al., 2004; Dasuri et al., 2013). Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes:



Esses eventos são relatados como as primeiras alterações bioquímicas após o trauma medular, desempenhando papel central nos danos secundários a lesão traumática (Juurlink e Paterson, 1998). Relata-se o aumento rápido de ERO após o TMA (Liu et al., 1998; Liu et al., 1999a; Xu et al., 2005; Liu et al., 2013), com elevação até o período de 11 horas e retorno aos níveis basais com 12 horas após a lesão. Entretanto, Varizi et al. (2004) acrescentam que há aumento dos níveis das ERO com um (Azbill et al., 1997) e 14 dias após a lesão medular, momentos avaliados pelos autores. O desequilíbrio da alta produção de radicais livres é um mecanismo lesivo em potencial nas doenças, já que a ERO interage com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, causando ou acentuando a lesão neuronal, além de ser sinalizador do processo inflamatório (Azbill et al., 1997; Nagai et al., 2001; Masella et al., 2005; Xu et al., 2005).

Entre as ERO formadas, o O_2^- pode reagir com o NO, formando o peroxinitrito ($O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$) (Azbill et al., 1997; Liu et al., 2000; Ozdogan et al., 2006). Esse é um radical livre altamente citotóxico, que instiga a peroxidação lipídica (PL) (Bains e Hall, 2012) e resulta no rompimento da membrana celular e em fatores neurotóxicos, como o malondialdeído (MDA) (Seligman et al., 1977; Dasuri et al., 2013). A PL também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de tumores e a exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Todavia, nem sempre os processos de PL são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na resposta inflamatória. Mas, em excesso deles torna-se lesivo (Ferreira e Matsubara, 1997).

A PL é um dos mecanismos mais prejudiciais desenvolvidos após o TMA (Bains e Hall, 2012), com aumento do MDA logo após o trauma (Qian e Liu, 1997; Xiong et al., 2007) até atingir pico dentro das primeiras quatro horas (Azbill et al., 1997; Liu et al., 2004; Christie et al., 2008), ou elevação gradativa até 24 horas (Xu et al., 2005; Song et al., 2013). Outros trabalhos mostram que o MDA retorna aos níveis basais com nove (Qian e Liu, 1997) a 12 horas (Christie et al., 2008), mas ocorre um segundo pico com 24 horas (Azbill et al., 1997; Christie et al., 2008), mantendo-se elevado por cinco (Christie et al., 2008), seis (Dong et al., 2000) ou sete dias (Song et al., 2013). Outras espécies de radicais livres formadas, como 4-hidroxinonal, também são detectadas em altos níveis por, no mínimo, sete dias (Luo et al., 2005; Xiong et al., 2007).

2.6 Sistema de defesa antioxidante

Os danos oxidativos ocorrem rapidamente após a lesão medular devido a grande quantidade de radicais livres como ânion

superóxido (Liu et al., 1998), peróxido de hidrogênio (Liu et al., 1999a), radical hidroxila (Liu et al., 2003) e peroxinitrito (Liu et al., 2000), enquanto mecanismos naturais de defesa antioxidante, em sua maioria intracelular (mitocôndria e citoplasma), não são eficientes ou suficientes para neutralizá-los (Azbill et al., 1997; Ozdogan et al., 2006; Dasuri et al., 2013).

As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx possuem papel importante na prevenção de danos oxidativos por participarem da primeira linha de defesa celular contra O_2^- e H_2O_2 , convertendo-os em compostos menos nocivos (Hayes e McLellan, 1999), como visto anteriormente. A SOD é a primeira enzima da cascata de detoxificação, catalisando a conversão do radical O_2^- em H_2O_2 e molécula de oxigênio, enquanto a CAT catalisa a redução do H_2O_2 e protege o tecido contra reação de radicais hidroxilas. Além dessa, a GPx ao oxidar o tripeptídeo glutationa (GSH) a dissulfeto de glutationa (GSSH), também reduz o H_2O_2 (Fig. 5) (Dasuri et al., 2013).

No trauma medular, a diminuição das atividades enzimáticas de SOD e GPx está bem estabelecida 24 horas após o trauma (Kanter et al., 2006; Erol et al., 2008; Cemil et al., 2010; Aslan et al., 2012) ou por dias (Dong et al., 2000), provavelmente pelo aumento do consumo para detoxificação dos radicais livres (Taskiran et al., 2000; Kanter et al., 2006; Erol et al., 2008; Cemil et al., 2010; Serarslan et al., 2010). Quanto à CAT, em alguns estudos tem sido relatado o aumento de sua atividade nos grupos submetidos ao trauma, relacionado à resposta de defesa do organismo (Azbill et al., 1997; Aslan et al., 2012), embora Kanter et al. (2006) e Cemil et al. (2010) tenham observado redução dessa enzima após o trauma.

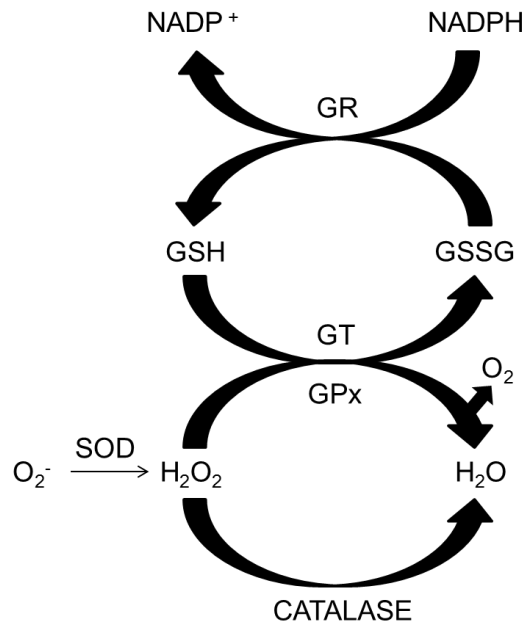


Figura 5 – Sistema de detoxificação do radical superóxido. (O₂: molécula de oxigênio; O₂^{•-}: radical superóxido; SOD: superóxido dismutase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; GPx: glutatona peroxidase; GSH: tripeptídeo glutatona; GSSG: dissulfeto de glutatona; H₂O: molécula de água; GR: glutatona redutase; GT: glutatona-S-transferase; NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidase). (Adaptado de Garrel et al., 2010).

Como as enzimas anteriores não neutralizam todas as ERO, estas ainda reagem com macromoléculas e geram produtos secundários à oxidação, o que demanda detoxificação a fim de prevenir novos danos intracelulares e eventual morte celular (Hayes e McLellan, 1999). Essa segunda linha de defesa contra ERO é realizada por enzimas além da GPx, a glutatona redutase (GR) e glutatona transferase (GT). A GR é responsável pela regeneração do GSH, através da redução do GSSG formado na reação da redução de radicais livres da GPx e GT. Essa reciclagem se faz necessária já que o GSH é um importante antioxidante celular com função de limpar as ERO, radicais livres e metabólitos reativos (Gilbert et al., 1990; Valko et al., 2007), além de agir como substrato para antioxidação e detoxificação da enzima GPx (Nogues et al., 2006; Dasuri et al., 2013).

Estudos com terapias que promovam a síntese de GSH ou restaurem a atividade de enzimas GR após o trauma medular, têm mostrado preservação da função neurológica em ratos (Kamencic et al., 2001). Além disso, evidências demonstram que a defesa neuronal contra o peróxido de hidrogênio é mediada pelo sistema glutatona, principalmente pela GPx e a GT com capacidade peroxidase ao conjugar os peróxidos orgânicos a GSH, ao auxiliar a GPx dismutar o peróxido de hidrogênio, reduzindo assim os danos gerados pelo estresse oxidativo (Hayes et al., 2005).

2.7 Morte celular por apoptose

A apoptose é um mecanismo essencial durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) para eliminação de células excessivas. Entretanto após o TMA, mostra-se como importante fator 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). Após o impacto mecânico, algumas células no sítio da lesão morrem por necrose seguida do trauma, enquanto outras por apoptose. 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 (Li et al., 1999).

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 desmielinização crônica, conhecido como degeneração Walleriana (Liu et al., 1996; Hausmann, 2003).

As principais proteases executoras da apoptose são conhecidas como caspases, as quais são divididas em iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) e efetoras (caspase-3, -6 e -7). A resposta apoptótica pode ser mediada por via intrínseca ou extrínseca, dependendo do estímulo recebido (Riedl e Shi, 2004), que culmina na ativação de caspase efetora, especialmente a caspase-3 (Springer et al., 1999; Citron et al., 2000; Li et al., 2000; Zhang et al., 2012). A via intrínseca é ativada/regulada principalmente pela mitocôndria com liberação do citocromo c e ativação de caspases iniciadoras, como a caspase-9, que por sua vez ativa a caspase-3 (Krajewski et al., 1999; Portt et al., 2011). Neste processo, em resposta ao estímulo apoptótico, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax e Bak) tornam-se ativados e agem sobre a mitocôndria para liberação do

citocromo c (Portt et al., 2011). Para controlar a ativação aberrante da caspase, outras proteínas da família Bcl-2 anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x1) regulam a liberação do citocromo c alterando a permeabilidade mitocondrial (Jurgensmeier et al., 1998; Riedl e Shi, 2004; Portt et al., 2011). Sabe-se, ainda, que há uma importante ativação apoptótica pelo estresse no RE, frente à diminuição do cálcio, mediada pela caspase-12 (Nakagawa et al., 2000).

A via extrínseca é iniciada por ligantes extracelulares do subgrupo de receptores do fator de necrose tumoral aos seus receptores de morte celular, gerando a ativação da caspase-8 (Boldin et al., 1996; Matsushita et al., 2000; Wu et al., 2014) e -10 iniciadoras, as quais ativam a caspase-3 que cliva proteínas intracelulares estruturais e regulatórias (Casha et al., 2001; Takagi et al., 2003). Pode haver comunicação da via extrínseca com a intrínseca, através da clivagem e ativação de BID (família Bcl-2) pela caspase-8, o qual aciona a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais (Riedl e Shi, 2004; Portt et al., 2011).

3. Uso de bloqueadores de canais para cálcio como agentes neuroprotetores

Apesar de recentes avanços no estudo da fisiopatologia do TMA (Talach et al., 2004), ainda não foi estabelecido um tratamento efetivo que detenha a expansão da lesão secundária e, com isso, diminua as sequelas permanentes (Hausmann, 2003; Kwon et al., 2004). Dentre os diferentes tratamentos propostos estão os anti-inflamatórios esteroidais (Bartholdi e Schwab, 1995; Rosado et al., 2014) e não esteroidais (Guth et al., 1999), células tronco (Dasari et al., 2007; Caldeira, 2011), bloqueadores de canais para sódio (Schwartz e Fehlings, 2001; Martins, 2012), bloqueadores de canais para cálcio (Regan e Choi, 1994; Lavor, 2013; Oliveira et al., 2014) e anestésicos gerais (Kawaguchi et al., 2005;

Lavor et al., 2011; Fukushima, 2012; Lavor, 2013). Agentes bloqueadores de canais para cálcio se mostraram especialmente promissores na redução de lesões cerebrais e medulares, por impedir o influxo exacerbado desse íon, e assim, prevenir a progressão da lesão secundária (Choi, 1992; Lanz et al., 2000).

Uma estratégia neuroprotetora importante é o bloqueio de CCVD (Imaizumi et al., 1999), por estarem envolvidos em processos celulares, como liberação de neurotransmissores (Snutch et al., 2001), entre os demais efeitos deletérios do aumento exacerbado do cálcio (Lee et al., 2009; Vaishnav et al., 2010; Liu et al., 2013). 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). A inibição do influxo de cálcio no CCVD por toxinas tem sido altamente correlacionada a neuroproteção (Bowersox et al., 1997; Perez-Pinzon et al., 1997; Verweij et al., 1997; Verweij et al., 2000).

Ademais, a mobilização de reservas intracelulares também mostra papel participativo na elevação do cálcio

citoplasmático. Os Rir são um dos maiores responsáveis pelo aumento do cálcio intracelular com a liberação do íon do RE e sarcoplasmático, como já citado anteriormente (Suzuki et al., 2012). Estão localizados tanto no corno dorsal quanto ventral da ME (Staats et al., 2012). A depleção do cálcio no RE gera acúmulo de proteínas desdobradas, ativação da caspase-12, estímulo ao influxo do cálcio mitocondrial com consequente liberação de fatores apoptóticos e ativação da cascata de apoptose por diferentes vias, culminando na morte neuronal (Berridge, 2002; Sullivan et al., 2004; Ruiz et al., 2009; Decuyper et al., 2011). Portanto, bloqueadores de Rir parecem promissores no estudo de novas terapias para o trauma medular (Aslan et al., 2009; Torres et al., 2010).

3.1 Toxinas de caramujos marinhos

Desde a descoberta da interação de toxinas com os CCVD, o seu uso nas afecções neurológicas vem sendo investigado (Olivera et al., 1987; Greenberg, 1997; Verweij et al., 2000; Oliveira et al., 2014). Ressalta-se que na ME, 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). Especula-se que o bloqueio dos CCVD proteja 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. 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; Souza et al., 2008; 2011), já que a mobilização do cálcio controla diversos

neurotransmissores e polipeptídeos que mediam a resposta dolorosa (Triggle, 2003).

Há quase 30 anos, o primeiro componente ativo do veneno de caramujo marinho do gênero *Conus* foi caracterizado bioquimicamente, instigado pelo modo como esses animais paralisavam as presas. Eles são predadores de águas tropicais e subtropicais, com aproximadamente 500 espécies, 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). O veneno do caramujo marinho do gênero *Conus* causa acidente grave, com quadros de dor intensa seguida de parestesia generalizada, além da paralisia neuromuscular e óbito por insuficiência respiratória (Watters e Stommel, 2004).

Essas toxinas têm sido estudadas por terem ações específicas em canais iônicos e em receptores para neurotransmissores (Uchitel, 1997; Kapoor, 2010). Para sua obtenção, ela é extraída dos ductos de veneno desses animais e purificada por fracionamento pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa baseada em superfície de óxidos inorgânicos (Aguilar et al., 2009). A toxina purificada é composta por pequenos peptídeos, denominados conopeptídeos, variando o tamanho de oito a 31 aminoácidos, enriquecida com pontos de dissulfeto (Shen et al., 2000), os quais mostraram resultados promissores em estudos experimentais de desordens neurológicas como epilepsia (Malmberg et al., 2003), Parkinson (Zoli et al., 2002), Alzheimer (Marchi et al., 2002), lesões cerebrais (Verweij et al., 2000), isquemia (Lavor et al., 2011) e trauma medular (Oliveira et al., 2014) e já são utilizados em

síndromes neuropáticas de dores crônicas (Livett et al., 2004; Norton e Olivera, 2006; Mehdiratta e Saberwal, 2007).

Atualmente, conhece-se cerca de 10 superfamílias de conotoxinas com 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 ω -conotoxinas são específicas para CCVD, 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).

No TMA, como visto anteriormente, ocorre morte neuronal devido ao aumento do cálcio intracelular que pode ser prevenido com bloqueadores de canais para cálcio. As ω -conotoxinas, provenientes de *C. magus* e *C. geographus*, mostraram-se valiosas na pesquisa para identificação dos subtipos de CCVD envolvidos em determinados processos celulares (Hillyard et al., 1992). Com essas descobertas, tornaram-se alvos de terapias direcionadas contra dores crônicas, danos isquêmicos cerebrais e medulares, algumas formas de epilepsia e ataxia. Ao antagonizar CCVD, mostraram também efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral em coelhos e ratos (Minami et al., 2001; Rajendra et al., 2004; Pinheiro et al., 2009), isquemia (Lavor et al., 2011; Lavor, 2013) e trauma medular em ratos (Oliveira et al., 2014). Com o bloqueio desses canais, previniu-se a liberação excessiva de neurotransmissores, como glutamato e dopamina (Robichaud et al., 1994), atuou como protetores da

hiperexcitabilidade e supressores da atividade epileptiforme (Yamada et al., 1994; Rajendra et al., 2004) e mostrou potencial neuroprotetor no trauma medular (Oliveira et al., 2014).

3.1.1 Ômega-conotoxina MVIIA

Dentre as conotoxinas, a MVIIA é um peptídeo com 25 aminoácidos, peso molecular de 2639 dáltons e fórmula molecular $C_{102}H_{172}N_{36}O_{32}S_7$, derivada do caramujo *Conus magus* (Fig. 6) (Olivera et al., 1990). Ela é um potente bloqueador

reversível dos canais para cálcio tipo N, conhecida como SNX-111 ou *Ziconotide* (Ziconotida) ou Prialt® (Nadasdi, 1995; Lewis, 2000), com rápido início de ação de aproximadamente 22 minutos (Bowersox e Luther, 1998) e meia vida de 2,9-6,5 horas via intratecal (IT) em humanos (Wermeling et al., 2003). A sua degradação é realizada por enzimas proteolíticas, com segurança renal e hepática (Wallace, 2006) e eliminação em média por até 24 horas, sendo mínima por via urinária (1%) quando aplicada por via intravenosa (Smith e Deer, 2009).



Figura 6 – Caramujo marinho *Conus magus*. Encontrada nas regiões do oceano Índico e Pacífico, o *Conus magus* sintetiza a toxina com uma mistura complexa de conopeptídeos para paralisar sua presa rapidamente. Entre esses componentes, há a ω -conotoxina MVIIA, a partir do qual é derivado a ziconotida. Fotografia de Jeanette e Scott Johnson (Hannon e Atchison, 2013).

O mecanismo de ação neuroprotetor da MVIIA ainda não está totalmente esclarecido, mas com o bloqueio dos canais para cálcio é capaz de inibir, em sinaptossomas, a liberação de diferentes neurotransmissores, como norepinefrina (Gaur et al., 1994; Bowersox et al., 1995; Ghosh e Greenberg, 1995; Igelmund et al., 1996) e glutamato (Takizawa et al., 1995; Gonçalves et al., 2011), essenciais no desenvolvimento da lesão espinhal secundária (Olivera et al., 1994; Uchitel, 1997; Minami et al., 2001), além da inibição direta do influxo do cálcio (Twede et al., 2009). A utilização clínica dessa conotoxina é limitada a baixas doses, devido aos possíveis efeitos colaterais.

Esses incluem tremor, ataxia e hiperreatividade em ratos (Malmberg e Yaksh, 1994; Horvath et al., 2002; Scott et al., 2002; Wermeling et al., 2003; Skov et al., 2007; Souza et al., 2008), além de tontura, confusão mental, náusea e síncope relatados no homem. Iniciam em média de 30 a 60 minutos após aplicação IT, via rotineiramente utilizada (Scott et al., 2002; Hama e Sagen, 2009), com finalização em até 24 horas (Malmberg e Yaksh, 1994; Scott et al., 2002; Souza et al., 2008). Apesar disso, são necessárias doses picomolares via IT para que se obtenha o efeito de inibição dos canais para cálcio do tipo N (Souza et al., 2011), sendo recomendado aplicá-la vagarosamente ou

reduzi-la para prevenir o aparecimento desses sinais (Miljanich e Ramachandran, 1995; McGivern, 2007).

A MVIIA foi aprovada pela *Food and Drug Administration*, nos Estados Unidos, para uso terapêutico por suas propriedades analgésicas, sendo utilizada para tratamento da dor crônica grave e neuropática do câncer (Olivera et al., 1994; Greenberg, 1997; Bowersox e Luther, 1998; Bingham et al., 2010). Em modelos animais de dor, mostrou efeitos antinociceptivos (Olivera et al., 1994; Greenberg, 1997; Bowersox e Luther, 1998; Souza et al., 2008; Hama e Sagen, 2009; Bingham et al., 2010; Souza et al., 2011, 2013) e anti-inflamatórios satisfatórios (Buchan et al., 1994; Chaplan et al., 1994; Bowersox et al., 1996; Smith et al., 2002) através da modulação de substância P, IL-1 β , TNF- α (Lee et al., 2010), pela sensibilização de canais para cálcio do tipo N (Binshtok et al., 2008; Czeschik et al., 2008). Além disso, sua aplicação em lesões cerebrais traumáticas mostrou preservação mitocondrial depois do trauma, se administrada em até 24 horas do impacto (Verweij et al., 1997; Verweij et al., 2000). Reforçando seu potencial farmacológico, estudos mostraram neuroproteção em modelos de isquemia cerebral focal em ratos (Bowersox et al., 1997) e coelhos (Perez-Pinzon et al., 1997) se aplicado em até 24 horas (Buchan et al., 1994) e também em isquemia medular (Burns et al., 1999). Na isquemia cerebral, a MVIIA foi capaz de prevenir a degeneração de células neuronais com melhora comportamental e cognitiva (Berman et al., 2000).

3.2 Dantrolene sódico

Um dos bloqueadores de reservas intracelulares do cálcio do receptor de rianodina (Zhao et al., 2001), o qual também inibe o influxo de cálcio pelos receptores NMDA, é o dantrolene sódico (1-[[[5-(4-Nitrofenil)-2-

furanyl]metileno]amino]-2,4-imidazolidine-dione sódico), com fórmula estrutural C₁₄H₉N₄NaO₅ e massa molecular 399,3u (Makarewicz et al., 2003), aprovado pelo *Food and Drug Administration*, nos Estados Unidos, para o tratamento de hipertermia maligna (Salomone et al., 2009). É uma molécula pequena altamente lipossolúvel, que atinge o pico da concentração plasmática com seis horas após administração oral e possui metabolização hepática e excreção pela urina e bile (Dykes, 1975 citado por Muehlschlegel e Sims, 2009). O tempo de meia vida foi estimado em 12 horas, com LD50 de 780mg/kg em ratos via intraperitoneal (Fournier, 1982; Krause et al., 2004).

Ele tem capacidade de inibir os subtipos do receptor Rir1 e Rir3, não agindo em Rir2, condizente com a ausência de efeitos significativos no coração (Krause et al., 2004). Os efeitos colaterais comumente relatados em humanos são tontura, vertigens e sonolência (Dykes, 1975 citado por Muehlschlegel e Sims, 2009), sendo o mais grave a hepatotoxicidade em uso crônico (Chan, 1990). Contudo, esse efeito sobre o fígado ainda é um dado inconsistente na literatura, já que outros autores mostram efeitos hepatoprotetores em ratos (Yamagishi et al., 1993).

O dantrolene é um relaxante muscular, usado clinicamente em hipertermia maligna, espasticidade muscular e síndrome maligna neuroléptica (Inan e Wei, 2010). Os seus efeitos neuroprotetores têm sido relatados em culturas celulares (Duzenli et al., 2005), em estudos experimentais de isquemia e reperfusão (Kocogullari et al., 2008) e trauma medular com preservação neuronal (Costa, 2010; Torres et al., 2010) e propriedade antioxidante (Aslan et al., 2009); em estudos de isquemia cerebral com redução da liberação excessiva de glutamato (Frandsen e Schousboe, 1991; Nakayama et al., 2002) e diminuição da

lesão (Zhang et al., 1993; Li et al., 2005; Staats et al., 2012); e também em crises epiléticas (Salinska et al., 2008; Nagarkatti et al., 2010). Além das avaliações isoladas, a administração do dantrolene associada à nimodipina, um bloqueador de CCVD tipo L, mostrou efeito sinérgico em estudos de isquemia cerebral em ratos (Salomone et al., 2009).

4 Modelo experimental

4.1 Estudo *in vivo*

O estudo *in vitro* é considerado 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 do tratamento em potencial e sua aplicabilidade, com a vantagem de observação clínica do paciente e de investigação de diferentes efeitos do tratamento (Blight, 2000; Rossignol et al., 2007).

Os ratos são modelos laboratoriais mais utilizados para o estudo do tratamento do TMA. Eles são relativamente baratos, de fácil manuseio, tamanho adequado, que proporciona a mensuração de parâmetros fisiológicos, com baixo índice de infecção e possibilita o uso de um número grande de animais (Taoka e Okajima, 1998; Vanický et al., 2001; Talac et al., 2004).

4.2 Modelo do trauma

Diversos modelos de trauma medular *in vivo* têm sido utilizados para investigação de mecanismos fisiopatológicos e testes terapêuticos (Blight, 2000). Estudos pré-clínicos do TMA necessitam de modelo reprodutível, consistente, confiável e que mimetize as características do trauma em

animais e humanos (Taoka e Okajima, 1998; Hausmann, 2003).

Há 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 e Tator, 1978), técnicas contusivas e compressivas como balão extradural (Tarlov et al., 1953), além de transecção da ME (Krassioukov et al., 2002).

Os modelos contusivos e compressivos mimetizam de maneira representativa e induzem um tipo de lesão mais relevante e semelhante ao que ocorre na maioria dos casos (Rowland et al., 2008). Pesquisadores têm relatado o uso do impactador controlado por computador. Apesar dos parâmetros serem controlados com maior precisão, o equipamento, além de caro, necessita de treinamento para manuseá-lo (Blight, 2000; Talac et al., 2004). 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 ME (Blight, 2000). O aparelho estereotáxico modificado da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais é de fácil execução, baixo custo, eficaz e capaz de reproduzir lesões simétricas e homogêneas (Silva et al., 2008; Costa, 2010; Drummond, 2010; Torres et al., 2010; Caldeira, 2011; Martins, 2012; Oliveira et al., 2014; Rosado et al., 2014), de maneira compressiva como a grande parte da rotina médica veterinária e humana (Taoka e Okajima, 1998).

CAPÍTULO 2

Comparação entre diferentes modelos de aplicação da MVIIA no trauma medular agudo em ratos

RESUMO

Os agentes bloqueadores de canais para cálcio voltagem dependentes, como MVIIA, mostram-se com grande potencial na redução de injúrias cerebrais e medulares. Objetivou-se assim investigar o efeito neuroprotetor da MVIIA em ratos submetidos ao trauma medular com determinação de via, dose, momento de aplicação adequados e possíveis mecanismos de ação. Esse experimento foi realizado em duas etapas: avaliações de diferentes doses da MVIIA administrada pela via intralésional (IL) (5, 10 e 20 μ M) e intratecal (IT) (2,5, 5, 10 e 20 μ M) com tratamentos aplicados em, respectivamente, cinco minutos e quatro horas. Com a determinação da melhor dose (10 μ M) e via (IT), avaliou-se a aplicação da MVIIA em uma e quatro horas após a lesão. Após definição do momento de aplicação, avaliou-se a expressão gênica de fatores relacionados à apoptose, pela técnica de RT-PCR em tempo real. Após a eutanásia, com 48 horas do trauma, um segmento medular coletado, incluindo o epicentro e região caudal a lesão. Foram realizados ensaios de viabilidade mitocondrial, morte celular, dosagem de glutamato, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica. A aplicação IT de 10 μ M da MVIIA apresentou efeito neuroprotetor quando fornecida quatro horas após o trauma medular, caracterizado pela redução na produção de ERO (22,34% \pm 9,8), PL (42,69% \pm 12,38) e da morte celular (22,57% \pm 3,62) e aumento da viabilidade mitocondrial (180,70% \pm 68,20). O modelo IL não apresentou resultados significativos. Além disso, o tratamento com MVIIA pela via IT uma hora após o trauma medular, apesar de reduzir a produção de ERO (50,32% \pm 7,36), não mostrou redução da morte celular (97,42% \pm 12,09) ou aumento da viabilidade mitocondrial (144,63% \pm 56,30), mostrando resultados favoráveis quando aplicada apenas quatro horas após o trauma, via IT. O grupo tratado com MVIIA, teve redução na expressão de proteína pró-apoptótica (Bax), da caspase-3, caspase-8, nNOS, além de aumento da expressão de Bcl-xl, sugerindo que o mecanismo de neuroproteção envolva também via intrínseca e extrínseca, além da redução do estresse oxidativo.

Palavras chave: MVIIA, vias, doses, momentos, neuroproteção, ratos.

INTRODUÇÃO

O trauma medular agudo (TMA) gera morte neuronal no local e ao redor da lesão, resultando em disfunções motora e sensorial que podem ser permanentes. Entre os diversos eventos que contribuem para morte neuronal secundária, destacam-se excitotoxicidade mediada pelo glutamato, o influxo exacerbado de cálcio com consequente disfunção mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO, por sua vez, reagem com os componentes celulares, entre eles, o lipídio da membrana plasmática, culminando com a peroxidação lipídica (PL), o que leva a ruptura dessa membrana e morte neuronal (Isaac e Pejic, 1995; Amar e Levy, 1999; Lu et al., 2000; Carlson e Gorden, 2002; Hall e Springer, 2004; Severo et al., 2007; Dasuri et al., 2013). Na tentativa de interromper ou reduzir essas injúrias secundárias, estratégias farmacológicas neuroprotetoras vêm sendo desenvolvidas, entretanto nenhuma mostrou eficiência adequada.

Sabe-se que a medula espinhal (ME) possui diversos CCVD, mas os tipos N e P/Q estão envolvidos no mecanismo do trauma medular (Dunlap et al., 1995; Diaz e Dickenson, 1997), sendo o tipo N expresso em altas concentrações nas lâminas dorsais da substância cinzenta (Gohil et al., 1994). Dessa maneira, agentes bloqueadores de canais para cálcio mostram grande potencial na redução de injúrias cerebrais e medulares, por impedir o intenso influxo desse íon, e assim, prevenir a progressão da lesão (Choi, 1992; Lanz et al., 2000). Toxinas provenientes de caramujos marinhos como a ω -conotoxina MVIIA ou *Ziconotide*, purificada inicialmente como SNX-111, é um potente bloqueador reversível dos canais para cálcio tipo N (Nadasdi, 1995; Lewis, 2000), capaz de inibir, em sinaptossomas, a liberação de diferentes neurotransmissores, como norepinefrina (Gaur et al., 1994; Bowersox

et al., 1995; Ghosh e Greenberg, 1995; Igelmund et al., 1996) e glutamato (Gonçalves et al., 2011), essenciais para o desenvolvimento da lesão espinhal secundária (Olivera et al., 1994; Uchitel, 1997; Minami et al., 2001). Esse medicamento foi aprovado pela *Food and Drug Administration*, nos Estados Unidos, para uso terapêutico por suas propriedades analgésicas, sendo utilizada no tratamento de dores crônicas graves e neuropática do câncer (Olivera et al., 1994; Greenberg, 1997; Bowersox e Luther, 1998; Bingham et al., 2010).

A aplicação da MVIIA tem mostrado melhora significativa em lesões cerebrais traumáticas em ratos (Hovda et al., 1994; Verweij et al., 1997; Bowersox e Luther, 1998; Berman et al., 2000; Verweij et al., 2000), em modelos de isquemia cerebral em ratos (Valentino et al., 1993; Buchan et al., 1994; Bowersox et al., 1997) e em coelhos (Perez-Pinzon et al., 1997) e isquemia medular em ratos (Burns et al., 1999). Não há relatos, ainda, na literatura sobre investigação da MVIIA no TMA. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos neuroprotetores da MVIIA em diferentes doses, modelos e momentos de aplicação após o TMA.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências físicas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, da Escola de Veterinária (EV), e no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esse estudo seguiu os princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (projeto aprovado sob protocolo 226/2012, anexo 1).

Animais

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, provenientes da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos na Escola de Veterinária da 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 roedores¹ e água *ad libitum* por todo o período. Além disso, antes do início do experimento, foram desverminados com tiabendazol² (100mg/kg, VO) e submetidos a 14 dias de aclimação.

A ω -conotoxina MVIIA

A MVIIA³ foi reconstituída, de acordo com indicação comercial, em PBS estéril e centrifugada para dissolução completa. Posteriormente, foi fracionada em alíquotas de 20 μ L a 50pmol/ μ L em tubos para microcentrífugas e armazenada a -20°C até o uso.

Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais receberam antibiótico de forma profilática, cefalotina sódica⁴ (60mg/kg, SC), e sulfato de morfina⁵ (2,5mg/kg, SC) como medicação pré-anestésica, 20 minutos antes da cirurgia. Em seguida, realizou-se a indução anestésica, em câmara com isoflurano⁶, e manutenção do plano anestésico cirúrgico com mesmo agente,

fornecido por máscara facial em sistema de não-reinalação.

Após a tricotomia da região dorsal, os ratos foram fixados em decúbito esternal em uma superfície de vidro e posicionados no aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFMG (Torres et al., 2010; Oliveira et al., 2014; Rosado et al., 2014). Esse aparelho consta de uma prancha de polietileno perfurada, com elevação em relação à superfície, aderida a um eixo, no qual se encaixa um suporte removível com uma haste de aço inoxidável (0,5g) acoplada a um peso de 40g (Fig. 1). Posteriormente à antisepsia com iodopovidona degermante⁷ e solução de álcool iodado⁸, foram realizadas incisões cutânea e subcutânea na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica a primeira lombar, e dos músculos epiaxiais, afastando-os lateralmente. Realizou-se a ostectomia do processo espinhoso da vértebra torácica número 12, com auxílio da pinça de Kocher, seguida da remoção da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico⁹ e pinça hemostática de Halsted, sob irrigação intermitente com solução fisiológica¹⁰. O trauma mecânico foi obtido pela compressão da ME com peso de 40,5g mantido sobre a dura-máter exposta, durante cinco minutos (0,5g da haste somado ao peso de 40g). Após o tratamento, realizou-se a aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto empregando-se sutura padrão simples contínua com fio inabsorvível sintético, polipropileno 3-0¹¹. A dermorrafia foi feita com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio.

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

²Thiaben® – Uci-Farma. São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

³Conotoxin MVIIA (ω -)® – Latoxan. Valence, France.

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.

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

⁸Riodene – Álcool Iodado Rioquímica indústria farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil.

⁹With ECCOS® Aesculap – Laboratórios B. Braun S.A. São Gonçalo, RJ, Brasil.

¹⁰Cloreto de sódio 0,9% – Laboratório Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG, Brasil.

¹¹Prolene® – Ethicon Endo Surgery. São Paulo, SP, Brasil.

Após a cirurgia, todos os animais receberam solução de NaCl 0,9%, na taxa de manutenção (15ml/kg), via subcutânea (SC). Os animais foram mantidos em caixas aquecidas, à temperatura de 37°C, com oxigenoterapia até completa recuperação anestésica. No pós-operatório, foi realizada analgesia com sulfato de morfina¹² (2,5mg/kg, SC, q4h) no dia da cirurgia e cloridrato de tramadol¹³ (5mg/kg, SC, q8h) nos dias subsequentes; antibioticoterapia com cefalexina¹⁴ (60mg/kg, VO, q12h) e massagem abdominal para esvaziamento vesical, três vezes ao dia, até a eutanásia.

¹²Morfina 10mg/mL – Produto genérico, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

¹³Tramadon® – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

¹⁴Cefalexina suspensão® – Medley S.A. Indústria farmacêutica. Sumaré, SP, Brasil.

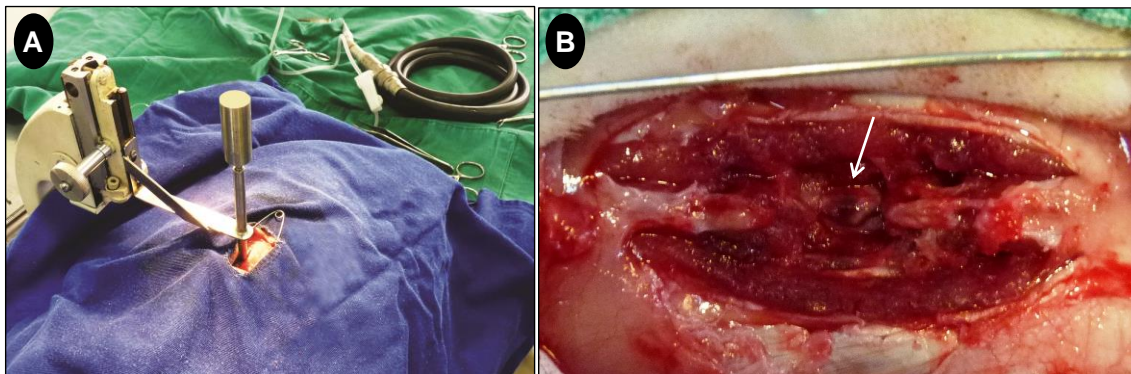


Figura 1 – Fotografias do procedimento cirúrgico do trauma medular experimental realizado em ratos Wistar tratados com a ω -conotoxina MVIIA. A) Realização do trauma medular com o aparelho estereotáxico. B) Foco hemorrágico (seta branca) após o trauma medular com o peso de 40,5g.

Tratamentos

-Etapa 1: Determinação da via e dose de aplicação

Foram utilizados 25 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, 3 meses de idade, pesando em média 300g (\pm 23,36), divididos aleatoriamente em cinco grupos: controle negativo (SHAM), placebo (PLA – PBS estéril), 5 μ M MVIIA, 10 μ M MVIIA e 20 μ M MVIIA. Preparou-se a MVIIA em PBS estéril, diluindo respectivamente 10, 20 e 40pmol em volume total de 2 μ L para se chegar nessas concentrações finais. No SHAM, o procedimento realizado foi apenas laminectomia. Os demais grupos, cinco minutos após o trauma, receberam o tratamento específico no epicentro da lesão (via intralésional). Esse tratamento foi realizado com auxílio da seringa de Hamilton de 10 μ L¹⁵ conectada a uma sonda de polietileno (PE10) e agulha gengival 30G, à velocidade de 0,4 μ L/min, perfazendo um volume total de 2 μ L por cinco minutos e, mais um minuto final com agulha apenas posicionada para evitar o refluxo da toxina. Após a aplicação, realizaram-se as suturas como descrito anteriormente.

¹⁵Modelo 701N – Hamilton Company, Reno, NV, USA.

Os outros 42 ratos, pesando em média 275,8g (\pm 26,68), foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos: controle negativo (SHAM - laminectomia), placebo (PLA – PBS estéril), 2,5 μ M MVIIA, 5 μ M MVIIA, 10 μ M MVIIA e 20 μ M MVIIA. Preparou-se a MVIIA em PBS estéril, diluindo respectivamente 25, 50, 100 e 200 pmol em volume total de 10 μ L para se chegar nessas concentrações finais. O SHAM se difere dos demais, pois foi submetido somente à laminectomia. Os grupos PLA, 2,5 μ M MVIIA, 5 μ M MVIIA, 10 μ M MVIIA e 20 μ M MVIIA, quatro horas após o trauma, receberam o tratamento específico por via IT. Essa injeção foi realizada de acordo com metodologias previamente descritas (Mestre et al., 1994). Administrou-se o volume de 10 μ L com a microseringa agulhada de Hamilton¹⁶, enquanto os ratos eram gentilmente contidos com compressa cirúrgica que ao recobri-lo, fornecia tranquilidade ao animal. O ligeiro movimento da cauda (“*flick*”) indicava a perfuração da duramater e o local exato da aplicação.

¹⁶Modelo 701LT – Hamilton Company, Reno, NV, USA.

-Etapa 2: Determinação do momento de aplicação

Com a determinação da via e dose mais adequadas, foram utilizados 24 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, pesando em média 289,7g (\pm 21,37), distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de seis animais: controle negativo (SHAM), placebo (PLA – PBS estéril), 10 μ M MVIIA 1 hora e 10 μ M MVIIA 4 horas. O SHAM se difere dos demais, pois foi submetido até a laminectomia. Os grupos PLA e 10 μ M MVIIA 1 hora e o 10 μ M MVIIA 4 horas, receberam o tratamento específico, respectivamente uma e quatro horas após o trauma, por via IT com auxílio da seringa de Hamilton¹⁷, perfazendo um volume total de 10 μ L, de acordo com procedimento descrito por Mestre et al. (1994). A contenção foi realizada manualmente, auxiliado por uma compressa cirúrgica.

Avaliação dos efeitos colaterais

A avaliação dos efeitos colaterais iniciou um dia antes do procedimento cirúrgico para condicionamento dos animais, além de serem acompanhados nas primeiras cinco horas após a aplicação da toxina e diariamente até o dia da eutanásia. Os animais foram colocados em campo aberto e avaliados, por 15 minutos, quanto à presença de tremor generalizado e de cauda, classificando em ausente, discreto, moderado e grave (Malmberg e Yaksh, 1994).

Avaliação da capacidade motora

A avaliação da capacidade motora foi realizada 24 horas antes da intervenção cirúrgica e diariamente, após a cirurgia, adotando-se a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (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 dos animais, atribuindo um escore que variava de zero a 21 (Anexo 2).

Coleta de amostra do líquido cerebrospinal

Após 48 horas do trauma, os animais foram medicados com cloridrato de xilazina¹⁸ (8mg/kg, IP) e submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico¹⁹ (100mg/kg, IP). Em seguida, posicionou-se a cabeça flexionada ventralmente para facilitar a punção do espaço atlanto-occipital e a coleta de 50 a 80 μ L de líquido cerebrospinal. Para dosar o glutamato, realizou-se o ensaio enzimático, onde o neurotransmissor liberado pelas células sofre oxidação pela enzima glutamato desidrogenase (GDH). O nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP+) é o aceptor do elétron desprendido que ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360nm, emite luz no comprimento de onda de 450nm, detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro²⁰. Dessa maneira, pode-se quantificar o neurotransmissor excitatório liberado (Nicholls et al., 1987; Romano-Silva et al., 1993).

Para o ensaio, foram adicionados 1,8mL de solução de incubação KRH (*Krebs Ringer Hepes*) sem cálcio (124mM NaCl; 4mM KCl; 1,2mM MgSO₄; 10mM HEPES)²¹, 5 μ L de NADP (1mM), 22 μ L de GDH, 5 μ L da amostra e 5 μ L de glutamato padrão. As

¹⁷Modelo 701LT – Hamilton Company, Reno, NV, USA.

¹⁸Virbaxyl® 2%, Virbac – Saúde Animal. São Paulo, SP, Brasil.

¹⁹Cobas Mira® – Roche. Jacarepaguá, RJ, Brasil.

²⁰Spectrofluorophotometer (RF-5301 PC) – Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão.

²¹Sigma MO, USA.

adições dos reagentes foram realizadas, respectivamente, nos tempos 0s, 0s, 70s, 170s, 500s, finalizando o procedimento com 600s.

Determinação da viabilidade celular

Dois métodos de avaliação da viabilidade celular foram utilizados e estão descritos a seguir. Após a eutanásia, coletou-se fragmento da ME no epicentro da lesão, em torno de 6mm, que foi subdividido em cranial para avaliação da viabilidade mitocondrial e caudal para morte celular.

-Viabilidade mitocondrial

No método bioquímico de viabilidade celular empregado foi utilizado o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) como marcador da atividade mitocondrial. A redução desse composto resulta na formação do formazan trifenílico insolúvel, dependente da atividade respiratória mitocondrial, o qual se deposita nas células com mitocôndrias ativas e propicia análises quantitativas das células viáveis (Straus et al., 1948; Glenner, 1969 citado por Watson et al., 1994). O segmento medular coletado foi imerso em fluido cerebrospinal artificial resfriado por cinco minutos e submetido a cortes de 400µm com auxílio de cortador de tecido²². As fatias foram incubadas em 1,5ml de solução de TTC a 2%, por 90 minutos a 37°C. Em seguida, o TTC foi removido, o tecido lavado com solução NaCl 0,9% e, então transferido para solução de etanol e dimetilsulfóxido²³ (DMSO) na proporção 1:1, durante 48 horas a temperatura ambiente com proteção a luz, para solubilização do formazan. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda de 485nm e os resultados normalizados pelo peso do tecido.

²²McIlwain Tissue Chopper – Brinkman Instruments Inc., UK.

²³Sigma MO, USA.

-Morte celular

Como outra via de avaliação da viabilidade celular, utilizou-se a marcação com 2mM de etídeo homodímero-1²⁴. Esse composto é um fluorocromo impermeável que ao passar apenas pelas membranas não funcionais, emite uma fluorescência vermelha detectada na microscopia de fluorescência, determinando a morte celular.

As fatias de 400µm foram coradas com 3µL de etídeo homodímero-1 (concentração 6µM) diluídos em 1mL de meio de incubação aerado previamente com mistura carbogênica, mantidas por 30 minutos, a temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, foram lavadas com 2mL de meio de incubação aerado por 15 minutos. Ao término da lavagem, analisou-se as fatias utilizando o microscópio Axiovert Zeiss 200M acoplado ao sistema APOTOME.

No microscópio foram adquiridas imagens de secções ópticas consecutivas ao longo do eixo Z, espessura de 10µm, com comprimento de onda de excitação de 568nm para o etídeo homodímero e emissão em 598/40nm. As imagens foram adquiridas com saturação da fluorescência, com a objetiva de 20 vezes. Foi utilizada lâmpada de mercúrio HBO. Foram observados dois campos da região do funículo lateral da substância cinzenta. Todos parâmetros foram mantidos nos experimentos.

Para a realização da análise quantitativa, utilizou-se o programa de imagens ImageJ²⁵, as quais foram processadas através de um filtro de ajuste de pixels pela mediana, com o intuito de reduzir possíveis interferências de ruído e obter os histogramas das respectivas imagens. Com

²⁴Live/dead – Viability/cytotoxicity Kit L-3224 – Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

²⁵Image Processing and analysis in JAVA – National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

o histograma foi determinado o valor do limiar basal da fluorescência. Após esse processamento da imagem, a região medular foi selecionada com uma área pré-determinada e, assim, realizada a quantificação do número de células mortas presentes.

Determinação das espécies reativas de oxigênio

Os níveis de diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA) foram determinados como um indicador da produção de peróxido dos componentes celulares. Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCF-DA e a sua oxidação subsequente por ERO, gerando um composto altamente fluorescente (Jakubowski e Bartosz, 2000). O segmento caudal ao epicentro, em torno de 3mm, foi coletado e imediatamente refrigerado a -20°C em solução tampão TRIS-HCl (10mM; pH7,4). Após homogeneização, foi submetido à centrifugação (10000g, 5°C, 10min) e uma alíquota de 20µL desse sobrenadante foi adicionada a 80µL DCF-DA 125µM. A placa em triplicata foi incubada no escuro durante 1h a 37°C até o momento da mensuração da fluorescência (488/525nm) no aparelho Victor X4²⁶. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Determinação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi determinada pela quantificação do conteúdo de malondialdeído (MDA) presente no sobrenadante do homogenato, por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico (TBA) em altas temperaturas. Este método consiste na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea que é quantificado no espectrofotômetro. O

ensaio para avaliar a lipoperoxidação foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979).

O segmento caudal ao epicentro foi coletado e imediatamente imerso em solução tampão TRIS-HCl ²⁷ (10mM; pH7,4) na proporção de 1:10. Após manutenção em freezer a -20°C, a amostra foi homogeneizada no sonicador ²⁸ (três ciclos de 4s cada) e o homogenato centrifugado a 2500g, 4°C por 10min. Pipetou-se inicialmente 134µL do TBA 0,8%, 134µL de tampão ácido acético (125ml H₂O; 18,84ml de ácido acético glacial; 5,63ml de HCl 12N P.A.; pH3,4) e 54µL H₂O. No momento da incubação, adicionou-se 54µL da amostra e 54µL SDS 8,1% (dodecil sulfato de sódio), deixando-os por 90min a 95°C. O conteúdo de MDA foi medido no comprimento de onda de 532nm e os resultados normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificação de proteína pelo método de Bradford

Realizou-se a dosagem de proteína pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado na complexação de proteínas com Azul G Brillante. Um volume de 2µL de sobrenadante, obtidos da ressuspensão do *pellet* do segmento medular caudal, foi utilizado para a quantificação. Amostras em triplicatas foram colocadas em tubos para microcentrífuga, adicionando-se 500µL de NaCl 0,15M e 500µL do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi incubada por 5 minutos, sob agitação, e então, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de

²⁶Perkin-Elmer.

²⁷ Sigma MO, USA.

²⁸Branson modelo Sonifier 250 – St. Louis – MO, USA.

diluição padrão de BSA a 1mg/mL com 1, 3, 5, 7 e 10µg.

Avaliação da expressão gênica relativa do Bax, Bcl-xl, caspase-3, caspase-8, caspase-9, caspase-12 e nNOS por RT-PCR em tempo real

Com a determinação da melhor via, dose e momento de aplicação, coletou-se um

segmento da ME cranial ao epicentro da lesão, em torno de 3mm, de seis animais de cada grupo (SHAM, PLA e 10µM IT 4h). Foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase transcriptase-reversa (RT-PCR) em tempo real para avaliação da expressão gênica de fatores associados a apoptose Bax, Bcl-xl, caspase-3, caspase-8, caspase-9, caspase-12 e nNOS (Tab. 1).

Tabela 1 - Genes e sequência de nucleotídeos dos primers iniciadores para RT-PCR em tempo real

Gene	Sequência de nucleotídeos	Nº acesso
Bax	F: CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC R: AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA	NM_017059.1
Bcl-xl	F: CCCCAGAAGAACTGAACCA R: AGTTTACCCCATCCCGAAAG	NM_001033670.1
Caspase-3	F: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA R: CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT	NM_012922.2
Caspase-8	F: TAAGACCTTTAAGGAGCTTCATTTTGA R: AGGATACTAGAACCTCATGGATTGAC	NM_022277.1
Caspase-9	F: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA R: CCACAGCTCCGCGACTTGCA	NM_031632.1
Caspase-12	F: AGGGATAGCCACTGCTGATACAGA R: CTGTCTCCACATGGGCCTTTGTT	NM_130422.1
nNOS	F: TCCCTCTAGCCAAAGAATTTCTCG R: GGTAGGTGCTGGTGCTTTCAA	NM_052799
Beta-actina	F: GCGTCCACCCGCGAGTACAA R: ACATGCCGAGCCGTTGTCG	NM_031144.2

Inicialmente, extraiu-se o RNA utilizando-se 1ml do reagente Trizol²⁹ em cada criotubo e, em seguida, realizou-se a maceração da amostra com pistilo de plástico estéril livre de RNAses e DNAses. Após cinco minutos no gelo, foi adicionado 0,2mL de clorofórmio com agitação manual por 15 segundos e incubação por mais dois minutos sob resfriamento. As amostras

foram centrifugadas a 11400g durante 15 minutos e para formação de três fases distintas. A fase aquosa (transparente), contendo o RNA, foi transferida cuidadosamente para um novo tubo ao qual foi adicionado 0,5mL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. Após congelamento das amostras a -80°C durante 30 minutos, elas foram descongeladas e centrifugadas a 11400g, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido

²⁹Trizol, Invitrogen, Life Technologies, CA, USA.

para outro tubo, centrifugado mais uma vez a 11400g, a 4°C, por 10 minutos, sendo então descartado.

Os tubos contendo os *pellets* com o RNA, proveniente das duas centrifugações receberam 1,0mL de etanol 75% cada. Os tubos foram novamente centrifugados, o etanol descartado e colocados para secar em temperatura ambiente, por aproximadamente cinco minutos. Após a secagem, o RNA foi homogeneizado adicionando-se 20µL de água ultrapura DPEC³⁰ seguido de incubação por 10 minutos a 55°C. Desse RNA, retirou-se uma amostra para quantificação e o restante foi congelado a -80°C para posterior confecção do DNA complementar (cDNA).

Para quantificação do RNA, 2,0µL de cada amostra foi adicionado a 98µL de água ultrapura. A mensuração foi realizada em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias 260/280nm.

A confecção do cDNA foi realizada com a utilização de kit comercial³¹ de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram estimados para utilização com 1,0µg de RNA, calculado pelo grau de pureza da amostra. Foi feito um mix para cada amostra com 10µL de 2xRT, 2µL de RT (transcriptase reversa) e água (até completar 8µL com o RNA), em um volume final de 20µL. As amostras foram colocadas no termociclador a 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. Após a adição de 1µL de RNase H, as amostras foram incubadas no termociclador a 37°C durante 20 minutos e, posteriormente, congeladas a -20°C para realização do RT-PCR em tempo real.

³⁰Ultra-pure® DEPC-treated water, Gibco, Invitrogen, CA, USA.

³¹SuperScript® III Platinum Two-Step qRT-PCR with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA.

Para realização da PCR em tempo real, preparou-se para cada amostra uma mistura contendo 12,5µL de SYBR Green e 1µL de Rox presentes no kit, bem como 7µL de água ultrapura, 1µL do primer *forward* e 1µL do *reverse* do gene estudado. Posteriormente, foram adicionados 2,5µL do cDNA, perfazendo volume final de 25µL. Incluiu-se em todas as reações o controle negativo, com substituição do cDNA por igual volume de água ultrapura. As reações de amplificação do cDNA dos genes foram realizadas na plataforma de instrumentação *ABI Prism 7900*, adotando-se 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação da fita dupla, um minuto a 60°C para anelamento, um minuto a 75°C para extensão dos amplicons e mais 10 minutos a 75°C para término da reação.

O *Software 7500 v.2.0.1 Applied Biosystems* apresentou os resultados em gráfico de fluorescência em relação ao número de ciclos, sendo o ciclo limiar, ou *threshold* (CT), o ciclo em que foi detectada fluorescência acima do limite basal estabelecido. A expressão gênica relativa ou *fold change* (FC) de cada gene foi calculada utilizando-se o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$. Assim, o delta CT (ΔCT) foi determinado pela subtração do CT do gene pesquisado pelo CT do gene normalizador beta actina. O delta delta CT ($\Delta\Delta CT$) foi encontrado pela diferença entre o ΔCT e a média do ΔCT do grupo controle. E a expressão gênica relativa foi dada pela fórmula: $FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Análise estatística

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados analisados pelo pacote estatístico *GraphPad Prism 5 for Windows* (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA) e adotado nível de significância de 95%. Para determinar se os dados eram paramétricos (concentração de glutamato no líquido cerebrospinal, viabilidade mitocondrial, morte celular, ERO, PL e

expressão gênica), empregou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que não atenderam a essas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [$x = \text{Log}(y+1)$]. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação das médias de Student-Newman-Keuls (SNK) quando analisado três grupos ou mais. Na avaliação do RT-PCR, as variáveis que seguiam a normalidade, foram comparadas pelo teste *t* não pareado e as que não seguiram pelo teste de Mann-Whitney. Para avaliação da capacidade motora, expressa em escores, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn.

RESULTADOS

Os animais e o trauma medular

Não foram observados distúrbios comportamentais como alteração do apetite ou diminuição na ingestão de água, sinais que seriam condizentes com dor. Além disso, alterações decorrentes da cirurgia como infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica não foram constatadas.

O modelo de lesão medular aguda experimental possibilitou a reprodução de

trauma de fácil execução, baixo custo e padronizado. A utilização do peso de 40,5g diretamente sobre a duramáter na região vertebral de T12, por cinco minutos, causou trauma com intensidade moderada a grave, observado pela avaliação da capacidade motora apresentada a seguir.

Etapa 1 – Determinação de doses e vias de aplicação

A aplicação da MVIIA e seus efeitos colaterais

Os animais tratados com 10 μ M e 20 μ M MVIIA via IL apresentaram tremor generalizado, espasticidade e tremores de cauda, respectivamente, em 80% (4/5) e 100% (5/5) dos casos com intensidade moderada a grave e grave. Porém, pela via IT, o grupo 10 μ M não apresentou efeitos adversos, sendo que apenas o grupo 20 μ M MVIIA mostrou alterações com intensidade moderada (33,33%) a grave (66,67%) (Tab. 2). Os efeitos iniciaram entre 40 a 90 minutos e permaneceram por até 24 horas na concentração de 20 μ M MVIIA em ambas as vias. Testou-se a dose de 40 μ M MVIIA via IT, entretanto, os efeitos foram extremamente graves e duraram por mais de 24 horas em todos os animais (4/4), o que determinou a retirada dessa concentração do experimento.

Tabela 2 – Relação dos animais que apresentaram efeitos colaterais em diferentes doses e vias de aplicação da MVIIA após o trauma medular agudo em ratos.

Tratamentos	Efeitos colaterais n ^o (%)	
	Intralesional	Intratecal
2,5 μ M	N/A	0/7 (0)
5 μ M	0/5 (0)	0/7 (0)
10 μ M	4/5 (80)	0/7 (0)
20 μ M	5/5 (100)	7/7 (100)
40 μ M	N/A	4/4 (100)*

*Efeitos colaterais extremamente graves e persistentes o que justificou a retirada da concentração 40 μ M do experimento. (N/A: não avaliado).

Complicações do trauma medular – retenção urinária

Observam-se, na tabela 3, os valores de retenção urinária associada ou não a hematúria dos animais tratados pela via IL e

IT, sendo que o grupo tratado com MVIIA a 10µM mostrou menor incidência (42,86%). A massagem vesical foi essencial para prevenir maiores complicações e prover bem-estar animal.

Tabela 3 – Porcentagem de ratos com retenção urinária após trauma medular e tratamento com diferentes doses da MVIIA por via intralesional e intratecal.

Tratamentos	Retenção urinária (%)	
	Intralesional	Intratecal
Placebo	75	90,9
2,5µM	N/A	100
5µM	100	75
10µM	75	42,86
20µM	50	60

Avaliação da capacidade motora

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade, o que foi representado pelo escore 21 na escala BBB (Basso et al., 1996). Vinte e quatro horas após a cirurgia, não houve diferença entre os grupos submetidos ao trauma tratados tanto por via IL (PLA, $4 \pm 4,5$; 5µM, $2 \pm 4,2$; 10µM, $3 \pm 4,2$; 20µM, $7,6 \pm 3,58$) (Fig. 2A) quanto IT (PLA, $1,22 \pm 0,67$; 2,5µM, $1,22 \pm 0,67$; 5µM, $1,25 \pm 0,5$; 10µM, $2,25 \pm 1,28$; 20µM, $3,8 \pm 2,05$) o que mostra a padronização da lesão para avaliação dos

tratamentos (Fig. 2B). Considerou-se a lesão como grau moderado a grave categorizado pela movimentação discreta de uma ou duas articulações (escore 1) ou ampla de uma articulação (escore 2). Além disso, os animais do grupo SHAM mantiveram o escore máximo no teste após procedimento cirúrgico, indicando que a laminectomia não causou lesão ao tecido medular.

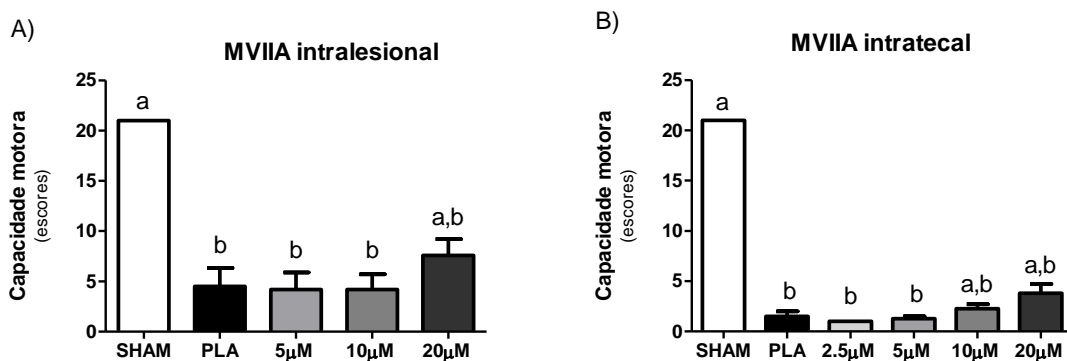


Figura 2 – Avaliação da capacidade motora após trauma medular em ratos. Gráfico do escore na escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (média \pm desvio padrão médio) de deambulação em campo aberto, 24 horas após o procedimento cirúrgico, de ratos submetidos à laminectomia como controle negativo (SHAM) e ao trauma medular espinal. A) Animais tratados via intralesional com diferentes doses de MVIIA (5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA) ($p < 0,01$). B) Animais tratados via intratecal com diferentes doses de MVIIA (2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA) ($p < 0,001$). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste de Kruskal-Wallis).

Efeito da MVIIA sobre a liberação de glutamato após o trauma medular

Os valores médios (\pm desvio padrão) da concentração de glutamato no líquido cerebrospinal, em relação ao placebo (100), via IL foram: 124,14% \pm 22,46 (SHAM; n=5), 100,1% \pm 58,21 (5µM MVIIA; n=5), 95,92% \pm 89,75 (10µM MVIIA; n=5), 52,02% \pm 35,25 (20µM

MVIIA; n=5) (Fig. 3A); e via IT: 52,6% \pm 14,81 (SHAM; n=5), 117,61% \pm 76,88 (2,5µM MVIIA; n=4), 91,92% \pm 49,71 (5µM MVIIA; n=5), 122,5% \pm 44,11 (10µM MVIIA; n=7) e 150,30% \pm 66,1 (20µM MVIIA; n=5) (Fig. 3B). Tantos os grupos tratados via IL quanto IT não apresentaram diferenças na redução do glutamato 48 horas após o procedimento cirúrgico.

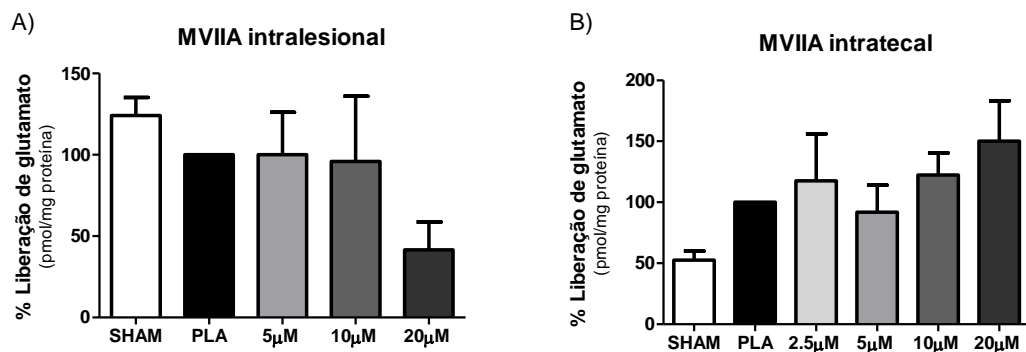


Figura 3 – Avaliação da MVIIA sobre a liberação do glutamato 48 horas após trauma medular em ratos. Concentração de glutamato no líquido cerebrospinal (média \pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal. A) Animais tratados via intralesional com diferentes doses de MVIIA (5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA). B) Animais tratados via intratecal com diferentes doses de MVIIA (2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA (teste de Student-Newman-Keuls; $p > 0,05$).

Avaliação da MVIIA sobre a viabilidade celular após o trauma medular

A) Avaliação da viabilidade mitocondrial

Nenhuma concentração testada via IL mostrou preservação celular e, os grupos diferiram-se apenas do SHAM (226,33% \pm 61,89). Os resultados do ensaio IL foram 151,69% \pm 80,75 (5µM MVIIA), 161,5% \pm 87,26 (10µM MVIIA) e 150,77% \pm 67,58 (20µM MVIIA) (Fig. 4).

A MVIIA apresentou preservação celular 1,8 vezes maior apenas nas doses de 5µM (183,86% \pm 59,13) e 10µM (180,70% \pm 68,20) via IT quando comparado ao PLA (100) ($p < 0,05$). As outras doses injetadas por essa via não mostraram preservação com os valores médios (\pm desvio padrão) de 84,97% \pm 41,50 e 157,08% \pm 87,87 para os grupos 2,5 e 20µM MVIIA. Além do PLA ($p < 0,01$), o grupo 2,5µM MVIIA também diferiu do SHAM (223,61% \pm 28,24; $p < 0,01$) (Fig. 4).

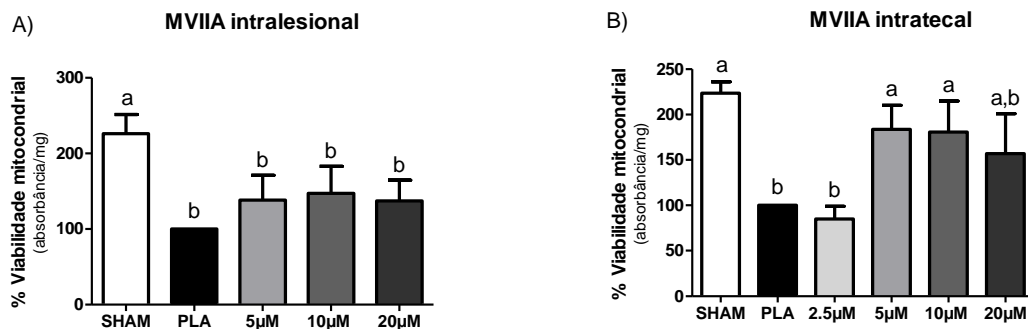


Figura 4 – Avaliação da MVIIA sobre a viabilidade mitocondrial 48 horas após trauma medular em ratos. Média da viabilidade mitocondrial (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal. A) Animais tratados via intralesional com diferentes doses de MVIIA (5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA). B) Animais tratados via intratecal com diferentes doses de MVIIA (2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

B) Avaliação da morte celular

Frente aos resultados da via IT no teste de viabilidade celular, realizou-se a avaliação de morte celular nesses grupos. Na comparação das médias, houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao trauma e o controle negativo (SHAM; $29,46\% \pm 2,99$) ($p < 0,01$). Entre as doses

testadas, a 10µM foi capaz de reduzir a morte celular em $22,57\% \pm 3,62$ quando comparado ao placebo (100) ($p < 0,05$). Os seguintes valores foram obtidos nesse ensaio (média \pm desvio padrão): $85,81\% \pm 15,62$ (2,5µM MVIIA), $93,96\% \pm 14,99$ (5µM MVIIA), $77,43\% \pm 3,62$ (10µM MVIIA) e $84,97\% \pm 13,47$ (20µM MVIIA) (Fig. 5).

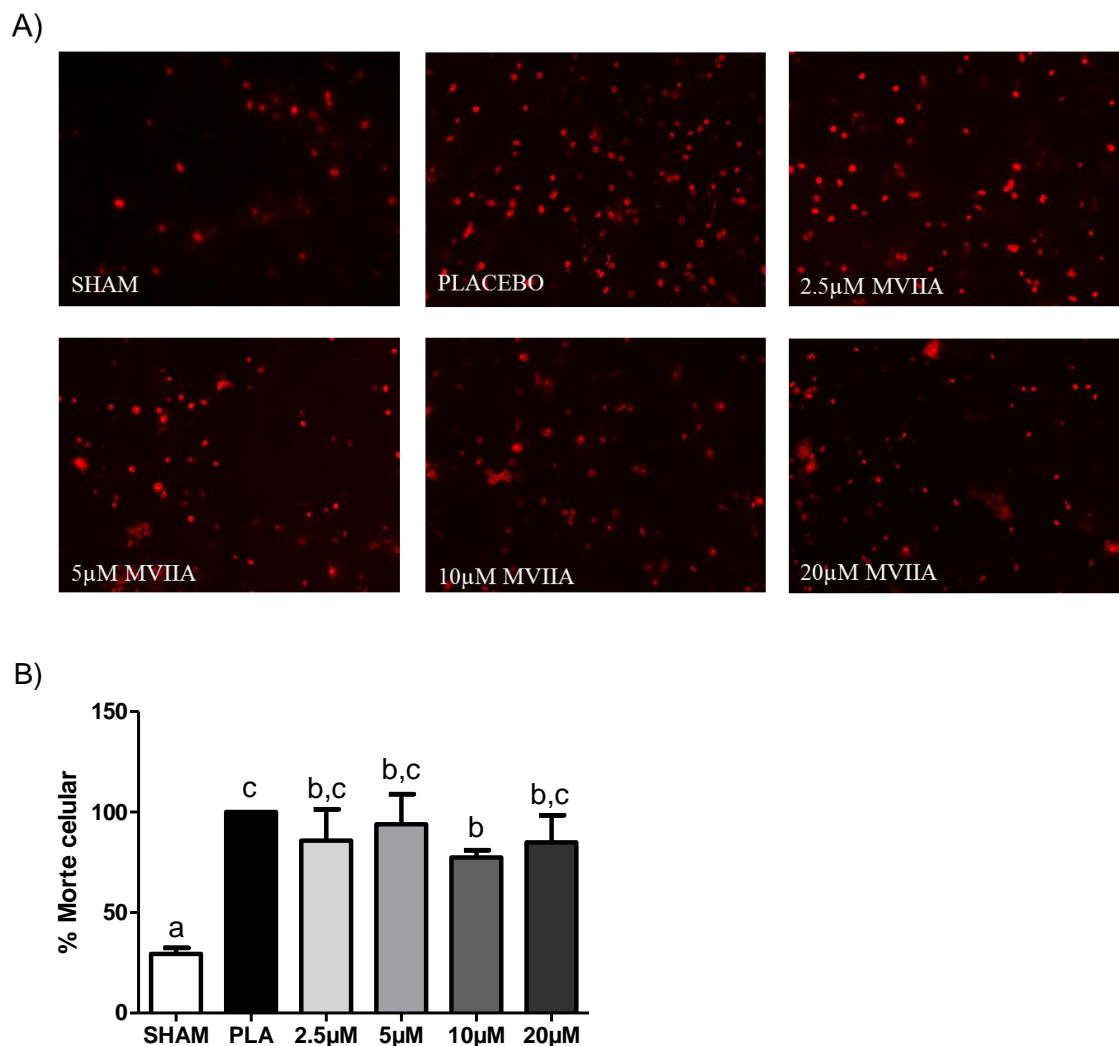


Figura 5 – Efeito da MVIIA sobre a morte celular 48 horas após trauma medular em ratos. A) Imagens representativas do funículo lateral de fatias medulares, coradas com o marcador etídeo homodímero, de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, tratados via intratecal com diferentes doses de MVIIA (2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo. B) Curva dose resposta da morte celular nas fatias medulares dos grupos SHAM, PLA, 2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM MVIIA. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Efeito da MVIIA sobre as espécies reativas de oxigênio após o trauma medular

Quando se compara os grupos tratados com MVIIA, via IL, nas concentrações 5µM MVIIA ($82,17\% \pm 32,44$), 10µM MVIIA ($60,05\% \pm 36,08$) e 20µM MVIIA ($69,85\%$

$\pm 37,27$), verifica-se que nenhuma dose foi capaz de reduzir a produção de ERO em relação ao PLA (100). Entretanto, observa-se que o trauma determinou aumento da produção de ERO como mostrado pela diferença entre PLA e SHAM ($43,99\% \pm 12,25$; $p < 0,05$) (Fig. 6A).

Os grupos tratados por via IT nas concentrações 5 μ M (16,43% \pm 5,75; $p < 0,01$), 10 μ M (22,34% \pm 9,8; $p < 0,01$) e 20 μ M (48,29% \pm 39,58; $p < 0,05$) foram capazes de reduzir a formação das ERO aos

níveis observados no SHAM (59,05% \pm 27,9). Além disso, todos os grupos diferiram do PLA (100) e 2,5 μ M MVIIA (93,59% \pm 34,96) (Fig. 6B).

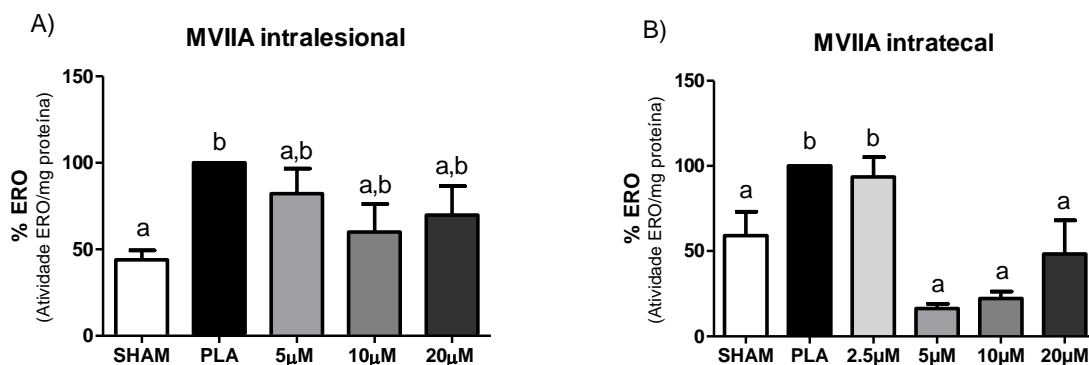


Figura 6 – Efeito da MVIIA sobre produção de espécies reativas de oxigênio 48 horas após trauma medular em ratos. Média da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinhal. A) Animais tratados via intratecal com diferentes doses de MVIIA (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) ou PBS como controle positivo (PLA). B) Animais tratados via intratecal com diferentes doses de MVIIA (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Efeito da MVIIA sobre a lipoperoxidação após o trauma medular

Observou-se que nenhum dos tratamentos pela via IL foi eficaz na redução da PL após o trauma medular, havendo diferença apenas entre SHAM (32,17% \pm 10,84) e PLA (100) ($p < 0,05$). As médias de MDA foram: 73,51% \pm 23,62; 54,09% \pm 20,97 e 85,48% \pm 75,31 para os grupos 5 μ M MVIIA, 10 μ M MVIIA e 20 μ M MVIIA quando comparados ao PLA (100) (Fig. 7A).

Entretanto, a figura 7B mostra que a dose de 10 μ M MVIIA pela via IT foi capaz de reduzir a lipoperoxidação 2,34 vezes (42,69% \pm 12,38) quando comparado ao placebo (100) ($p < 0,01$), igualando-se ao grupo SHAM. Os resultados desse ensaio foram (média \pm desvio padrão): 33,59% \pm 9,14 (SHAM), 90,54% \pm 33,93 (2,5 μ M MVIIA), 59,52% \pm 14,97 (5 μ M MVIIA) e 80,72% \pm 49,42 (20 μ M MVIIA).

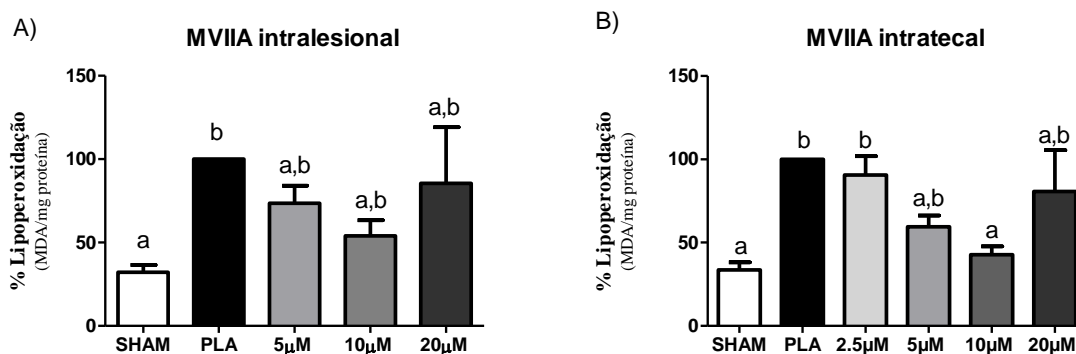


Figura 7 – Avaliação da MVIIA sobre a lipoperoxidação 48 horas após trauma medular em ratos. Média da lipoperoxidação (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinhal. A) Animais tratados via intralesional com diferentes doses de MVIIA (5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA). B) Animais tratados via intratecal com diferentes doses de MVIIA (2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM) ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Etapa 2 – Determinação do momento de aplicação

Na etapa 1, diferentes avaliações mostraram que a concentração de 10µM pela via IT foi o melhor método de aplicação da MVIIA após o TMA, com efeito neuroprotetor. Dessa maneira, optou-se pela comparação dos tempos de aplicação de uma e quatro horas após a lesão na dose de 10µM pela via IT.

A aplicação da MVIIA e seus efeitos colaterais

Os animais com aplicação via IT, 4 horas após o trauma medular, não apresentaram efeitos colaterais. Entretanto, na aplicação de 1 hora, um animal (16,7%) apresentou tremores de cauda de intensidade moderada, reversível em 24 horas.

Complicações do trauma medular – retenção urinária

Dos grupos submetidos ao trauma medular, 100%, 66,66% e 42,86% dos animais

tratados com PLA, 10µM 1h e 10µM 4h, respectivamente, apresentaram retenção urinária. Sendo que apenas os grupos PLA e 10µM 1h apresentaram esse quadro clínico associado à hematúria (60% e 33,33%, respectivamente).

Avaliação da capacidade motora

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade, representado pelo escore 21 na escala BBB. Vinte e quatro horas após a cirurgia observou-se a padronização do trauma medular mostrado pela semelhança entre os grupos submetidos ao trauma (PLA, $1,33 \pm 0,82$; MVIIA 1h, $1,67 \pm 1,21$; MVIIA 4h, $2 \pm 2,5$) (Fig. 8). Classificou-se a lesão como grau moderado a grave categorizado pela movimentação discreta de uma ou duas articulações (escore 1) ou ampla de uma articulação (escore 2). Além disso, os animais do grupo SHAM mantiveram o escore máximo no teste após procedimento cirúrgico, indicando que a laminectomia não causou lesão ao tecido medular.

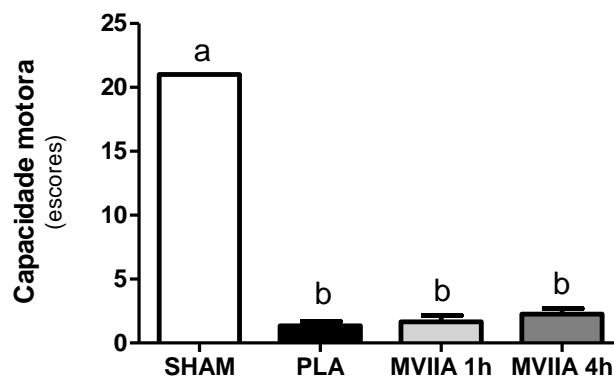


Figura 8 – Avaliação da capacidade motora após trauma medular em ratos. Gráfico do escore BBB (média \pm desvio padrão médio) de deambulação em campo aberto, 24 horas após o procedimento cirúrgico, de ratos submetidos à laminectomia (SHAM) e ao trauma medular espinal, tratados via intratecal com 10 μ M de MVIIA com 1 e 4 horas após o trauma ou PBS como controle positivo (PLA) (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$).

Efeito da MVIIA na liberação de glutamato após o trauma medular

Não foram observadas diferenças significativas na redução do glutamato 48 horas após o procedimento cirúrgico. Os

valores médios (\pm desvio padrão) da concentração de glutamato no líquido cerebrospinal, em relação ao PLA (100), foram: 52,6% \pm 14,81 (SHAM), 96,75% \pm 96,55 (MVIIA 1h) e 75,24% \pm 24,89 (MVIIA 4h) (Fig. 9).

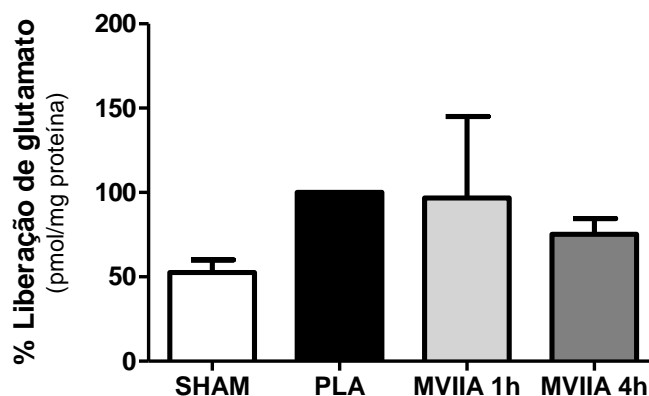


Figura 9 – Efeito da MVIIA sobre a liberação do glutamato 48 horas após trauma medular em ratos. Concentração de glutamato no líquido cerebrospinal (média \pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, tratados via intratecal com 10 μ M de MVIIA com 1 e 4 horas após o trauma ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA (teste de Student-Newman-Keuls; $p > 0,05$).

Avaliação da MVIIA sobre a viabilidade celular após o trauma medular

A) Avaliação da viabilidade mitocondrial

A MVIIA aplicada com 4h apresentou preservação celular significativa 1,8 vezes

maior ($180,70\% \pm 68,20$) quando comparado ao PLA (100). Ao passo que sua aplicação com 1h ($144,63\% \pm 56,30$) mostrou diferença relativa apenas ao SHAM ($223,61\% \pm 28,24$) ($p < 0,05$).

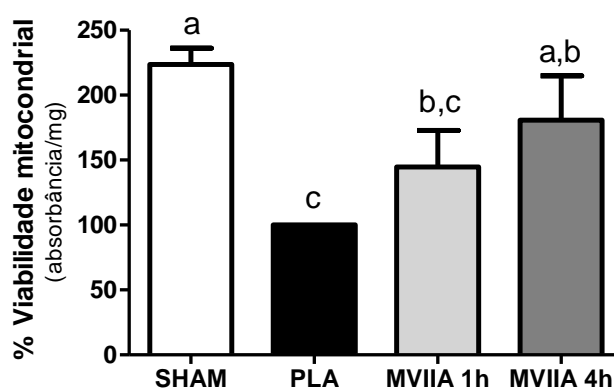


Figura 10 – Efeito da MVIIA sobre a viabilidade celular 48 horas após trauma medular em ratos. Média da viabilidade mitocondrial (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinhal, tratados via intratecal com $10\mu\text{M}$ de MVIIA com 1 e 4 horas após o trauma ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

B) Avaliação da morte celular

Na comparação das médias de morte celular, houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao trauma e o controle negativo (SHAM; $29,46\% \pm 2,99$) ($p < 0,01$) (Fig. 11). Entre os tempos

avaliados, a MVIIA 4h foi capaz de reduzir a morte celular em $22,59\% \pm 3,62$ quando comparado ao placebo (100) ($p < 0,01$). Já a aplicação com 1 hora ($97,42\% \pm 12,09$) se manteve semelhante ao PLA (Fig. 11).

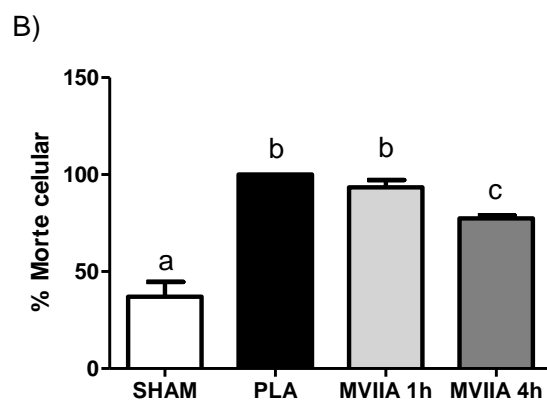
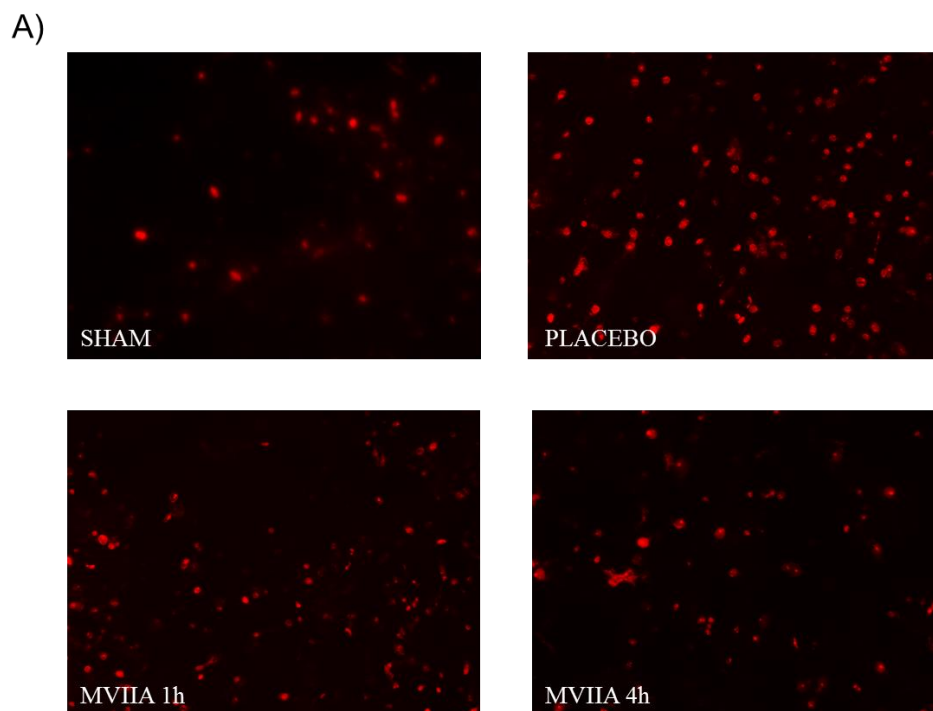


Figura 11 – Efeito da MVIIA sobre a morte celular 48 horas após trauma medular em ratos. A) Imagens representativas do funículo lateral de fatias medulares, coradas com o marcador etídeo homodímero, de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, tratados via intratecal com 10 μ M de MVIIA nos tempos 1 e 4 horas após o trauma ou com PBS como controle positivo. B) Média da morte celular (\pm desvio padrão médio) nas fatias medulares dos grupos SHAM, PLA, MVIIA 1h e MVIIA 4h. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Efeito da MVIIA sobre as espécies reativas de oxigênio após o trauma medular

Quando se compara a MVIIA aplicada com 1 hora (50,32% \pm 7,36) e 4 horas (22,34% \pm

9,8), verifica-se que os dois momentos foram capazes de reduzir a produção de ERO em relação ao PLA (100) ($p < 0,001$). Todavia, o grupo MVIIA 4h levou a diminuição de ERO ainda maior, com

níveis inferiores ao SHAM ($64,34\% \pm 26,9$; $p < 0,001$) (Fig. 12).

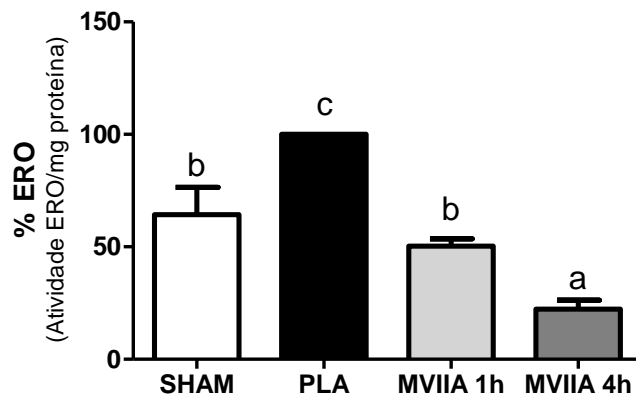


Figura 12 – Efeito da MVIIA sobre produção de espécies reativas de oxigênio 48 horas após trauma medular em ratos. Média da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, tratados via intratecal com $10\mu\text{M}$ de MVIIA com 1 e 4 horas após o trauma ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$).

Efeito da MVIIA sobre a lipoperoxidação após o trauma medular

A dose de $10\mu\text{M}$ MVIIA, aplicada 4 horas após o trauma, foi capaz de reduzir a

lipoperoxidação em 2,34 vezes ($42,69\% \pm 12,38$) quando comparado ao placebo (100) ($p < 0,001$), entretanto quando aplicada apenas 1 hora ($94,95\% \pm 35,75$) após a lesão, não levou a resultados significativos.

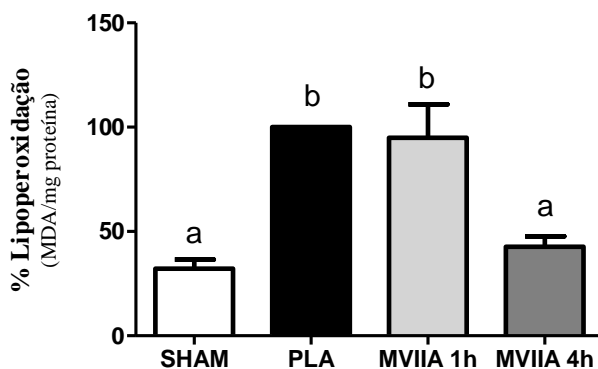


Figura 13 – Efeito da MVIIA sobre a lipoperoxidação 48 horas após trauma medular em ratos. Média da lipoperoxidação (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, tratados via intratecal com $10\mu\text{M}$ de MVIIA com 1 e 4 horas após o trauma ou PBS como controle positivo (PLA). Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,001$).

Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica de fatores relacionados a apoptose

Nas duas etapas anteriores, diferentes avaliações mostraram que a concentração de 10 μ M pela via IT aplicada quatro horas após o trauma medular apresentou efeito neuroprotetor. Dessa maneira, investigou-se o efeito de 10 μ M MVIIA, IT, 4h sobre a expressão gênica relativa de fatores indicadores de apoptose como Bax, Bcl-xl, caspase-3, caspase-8, caspase-9, caspase-12 e nNOS.

A expressão da proteína anti-apoptótica, Bcl-xl, foi maior no grupo tratado com MVIIA ($0,72 \pm 0,21$) em relação ao PLA ($0,37 \pm 0,25$) ($p < 0,05$) (Fig. 14). Ao mesmo tempo, na figura 15, observou-se redução na expressão do Bax, proteína pró-apoptótica, no grupo MVIIA ($0,64 \pm 0,18$) quando comparado ao PLA ($1,41 \pm 0,64$) ($p < 0,05$) (Fig. 15).

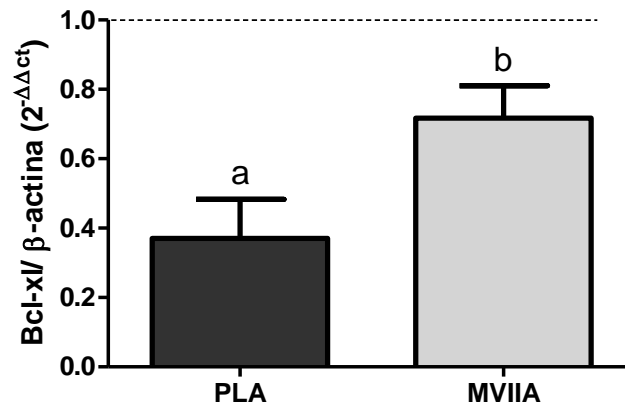


Figura 14 - Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa de Bcl-xl 48 horas após trauma medular em ratos. Média da expressão gênica relativa de Bcl-xl (\pm desvio padrão médio) em ratos submetidos ao trauma medular espinhal associado ao tratamento via intratecal com placebo (PLA) e 10 μ M de MVIIA 4 horas após o trauma. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste t não pareado; $p < 0,05$).

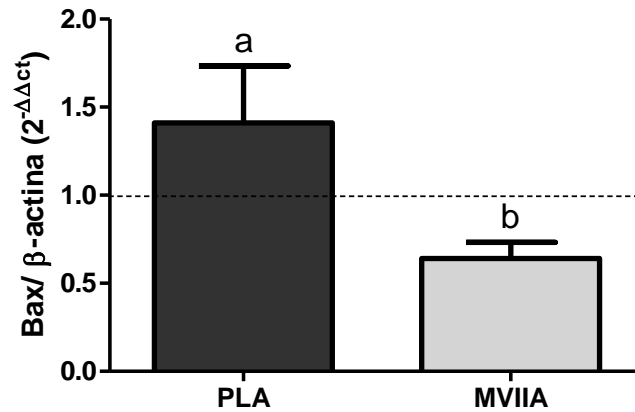


Figura 15 - Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa de Bax 48 horas após trauma medular em ratos. Média da expressão gênica relativa de Bax (\pm desvio padrão médio) em ratos submetidos ao trauma medular espinal associado ao tratamento via intratecal com placebo (PLA) e 10 μ M de MVIIA 4 horas após o trauma. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Mann-Whitney; $p < 0,05$).

Em relação à caspase-9, observou-se expressão relativa de $1,47 \pm 2,21$ e $0,71 \pm 0,76$ para os grupos PLA e MVIIA, respectivamente (Fig. 16). Já na caspase-12, encontrou-se expressão relativa de $0,89 \pm$

$0,94$ e $0,61 \pm 0,62$ para os grupos PLA e MVIIA (Fig. 17). Em ambas caspases, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos.

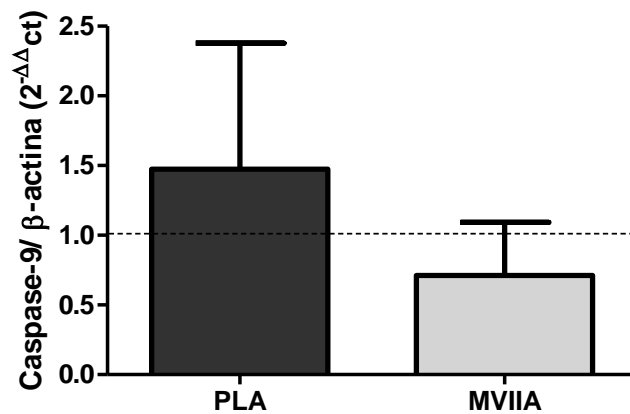


Figura 16 - Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-9 48 horas após trauma medular em ratos. Média da expressão gênica relativa de caspase-9 (\pm desvio padrão médio) em ratos submetidos ao trauma medular espinal associado ao tratamento via intratecal com placebo (PLA) e 10 μ M de MVIIA 4 horas após o trauma (teste Mann-Whitney; $p > 0,05$).

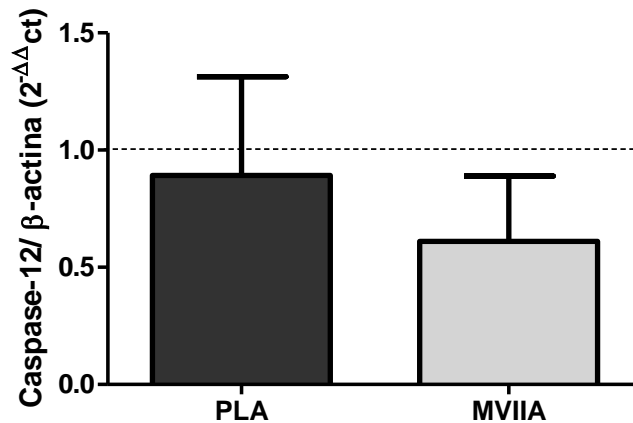


Figura 17 - Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-12 48 horas após trauma medular em ratos. Média da expressão gênica relativa de caspase-12 (\pm desvio padrão médio) em ratos submetidos ao trauma medular espinhal associado ao tratamento via intratecal com placebo (PLA) e 10 μ M de MVIIA 4 horas após o trauma (teste t não pareado; $p > 0,05$).

Quando se compara a expressão relativa da nNOS, observa-se que a MVIIA (1,22 \pm 1,14) foi capaz de reduzir a expressão em

relação ao PLA (4,51 \pm 2,77) ($p < 0,05$) (Fig. 18).

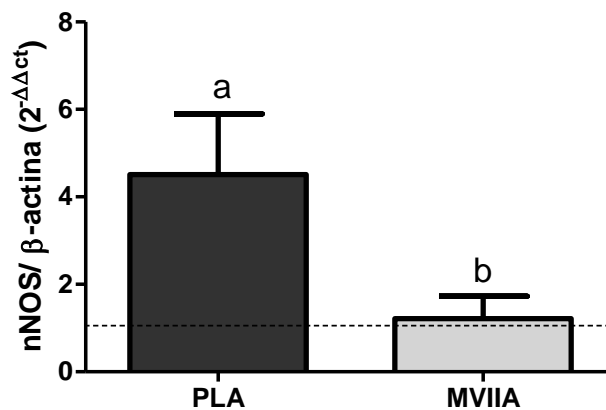


Figura 18 - Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da nNOS 48 horas após trauma medular em ratos. Média da expressão gênica relativa da nNOS (\pm desvio padrão médio) em ratos submetidos ao trauma medular espinhal associado ao tratamento via intratecal com placebo (PLA) e 10 μ M de MVIIA 4 horas após o trauma. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste t não pareado; $p < 0,05$).

No que se refere às expressões da caspase-8, verificou-se redução no grupo tratado com MVIIA (0,17 \pm 0,13) quando

comparado ao PLA (0,47 \pm 0,13) ($p < 0,05$) (Fig. 19). Além disso, o grupo MVIIA (0,60 \pm 0,39) também mostrou menor expressão

da caspase-3 em relação ao PLA ($1,96 \pm 0,55$) ($p < 0,05$) (Fig. 20).

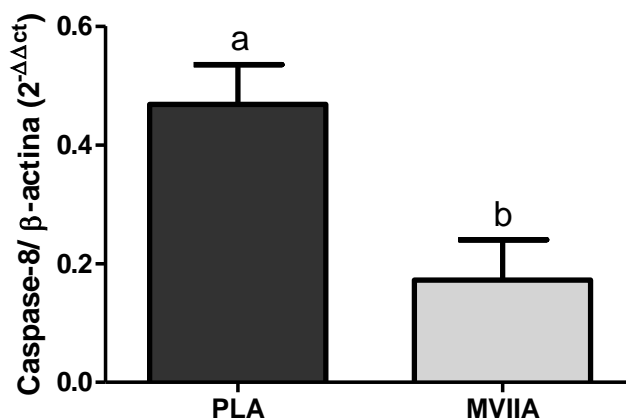


Figura 19 - Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-8 48 horas após trauma medular em ratos. Média da expressão gênica relativa da caspase-8 (\pm desvio padrão médio) em ratos submetidos ao trauma medular espinhal associado ao tratamento via intratecal com placebo (PLA) e $10\mu\text{M}$ de MVIIA 4 horas após o trauma. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Mann-Whitney; $p < 0,05$).

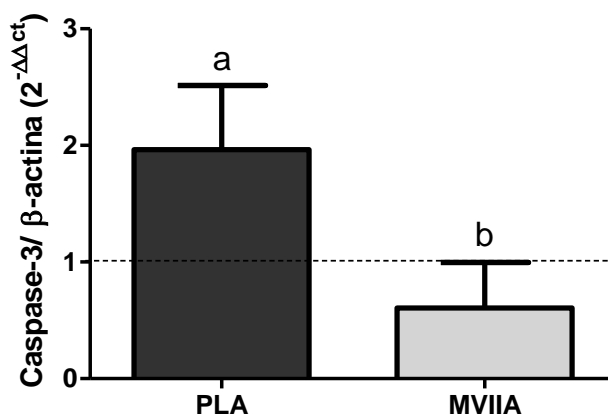


Figura 20 - Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica relativa da caspase-3 48 horas após trauma medular em ratos. Média da expressão gênica relativa da caspase-3 (\pm desvio padrão médio) em ratos submetidos ao trauma medular espinhal associado ao tratamento via intratecal com placebo (PLA) e $10\mu\text{M}$ de MVIIA 4 horas após o trauma. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste t não pareado; $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O trauma medular

O modelo de lesão medular aguda experimental aplicado é um método já

estabelecido (Silva et al., 2008; Costa, 2010; Drummond, 2010; Torres et al., 2010; Caldeira, 2011; Martins, 2012; Oliveira et al., 2014; Rosado et al., 2014) que possibilitou, de forma eficiente, a reprodução de trauma moderado a grave,

como observado na deambulação pós-cirúrgica pela movimentação discreta de uma ou duas articulações.

Com o intuito de avaliar o efeito da conotoxina no trauma medular, o peso de 40,5g foi escolhido, visto que lesões extremamente graves limitam a avaliação funcional e não promovem condições adequadas para avaliação do efeito farmacológico ao provocar maiores índices de morte celular por necrose ao invés de apoptose (Onifer et al., 2007). Além disso, a lesão compressiva por cinco minutos utilizada gera retenção urinária e mimetiza quadros similares daqueles vistos frequentemente (Lu et al., 2000). Nesse caso, a massagem da bexiga foi essencial para prevenção de complicações secundárias como infecções do trato urinário (Hung, 2007; Olby et al., 2010; Oliveira et al., 2014). A retenção urinária foi observada em menor frequência no grupo tratado com a dose de 10 μ M, via intratecal, quatro horas após o TME. O trauma medular causa, além das alterações motoras, déficits funcionais da bexiga pela interrupção de tratos ascendentes e/ou descendentes (Houlsebosch, 2002). Esses pacientes podem exibir ulceração e irritação da mucosa, com conseqüente 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, os resultados encontrados reafirmam a participação de circuitos neurais localizados na medula com projeções aferentes no corno dorsal para bexiga, inervados por vias descendentes oriundas do tronco cerebral. Dessa maneira, lesões na medula espinhal danificam essas vias e prejudicam a função

do trato urinário inferior (Mitsui et al., 2005).

A ω -conotoxina MVIIA

Escolheu-se o uso da MVIIA, no tratamento do trauma medular, por ser bloqueadora específica e reversível de CCVD do tipo N (Olivera et al., 1985). As toxinas bloqueadores de canais para cálcio mostram-se especialmente promissoras na redução de injúrias cerebrais e medulares, por sua estabilidade estrutural, facilidade de síntese, alta especificidade, impedindo o influxo exacerbado do cálcio e prevenindo a progressão da lesão (Choi, 1992; Lanz et al., 2000). Além disso, sabe-se que na ME, os CCVD tipo N, expressos em altas concentrações nas lâminas dorsais (Gohil et al., 1994; Westenbroek et al., 1998), possuem papel fundamental na regulação do fluxo de cálcio (Smith e Augustine, 1988).

-Escolha das vias de aplicação

Nesse experimento, optou-se pelos métodos de aplicação IL e IT da MVIIA no SNC. Devido à natureza peptídica da MVIIA, ela não está disponível na forma oral e recomenda-se a aplicação diretamente no órgão alvo (Snutch, 2005). Na investigação terapêutica de substâncias no TMA, diversas vias têm sido utilizadas incluindo injeções IL, IT e/ou IV, mostrando maior efetividade nesta ordem, em estudos com células tronco. Isso ocorre, possivelmente, porque a via IL possibilita a localização exata do tratamento, diferente das vias IT e IV que há dispersão no espaço subaracnóide ou sistemicamente (Takahashi et al., 2011). Assim, do ponto de vista de ensaios experimentais/clínicos, é essencial determinar a melhor via de aplicação da toxina no trauma medular.

As vias IL e IT quando comparadas à IV, necessitam de uma menor quantidade de toxina o que implica em viabilidade econômica, visto o alto custo da MVIIA, além de segurança com menor efeito colateral e atingir melhores níveis no local. A via IL, apesar de não ser a mais viável clinicamente, é um método fácil, seguro e não causa alterações motoras pela aplicação (Cloutier et al., 2006; Tom e Houlé, 2008; Silva, 2013; Oliveira et al., 2014). O volume de diluição utilizado (2 μ L) por essa via não apresentou quaisquer complicações, corroborando com os dados mostrados por Takahashi et al. (2011) e Oliveira (2012), sendo aplicado 60% do volume total usado rotineiramente em experimentos intralésionais (Hofstetter et al., 2002; Tewarie et al., 2009; Silva, 2013).

A administração IT direta lombar, entre as vértebras L5-L6, como descrito por Mestre et al. (1994), permitiu uma aplicação rápida, inócua, confiável e reprodutível sem necessidade de anestesia. Além disso, o volume de diluição (10 μ L) foi suficiente para promover a difusão adequada no líquido cerebrospinal (LCE) (Mestre et al., 1994; Burns et al., 1999; Souza et al., 2011), representando menos de 10% do seu volume total (250 μ L), o qual é o limite para evitar alterações hemodinâmicas (Rieselbach et al., 1962). A principal vantagem da realização da via IT em comparação à IL foi a administração dos tratamentos sem emprego de anestesia ou procedimentos cirúrgicos intensos que poderiam determinar estresse, reação inflamatória e riscos ao paciente (Ferrari et al., 2007).

-Escolha das doses da MVIIA

Com a escassez de dados na literatura sobre ação neuroprotetora da MVIIA no TMA, a escolha das doses foi baseada na eficácia em bloquear os CCVD em estudos antinociceptivos (Souza et al., 2008, 2011, 2013). Além disso, os efeitos colaterais

foram outro fator limítrofe já que a utilização clínica dessa toxina é limitada a baixas doses, devido às possíveis reações adversas, incluindo tremor, ataxia e hiperreatividade em ratos (Horvath et al., 2002; Scott et al., 2002; Wermeling et al., 2003; Skov et al., 2007). Contudo, são necessárias doses picomolares da MVIIA para que se obtenha o efeito de inibição dos canais para cálcio do tipo N (Souza et al., 2008, 2011, 2013).

Optou-se pelo emprego das concentrações de 2,5 a 20 μ M de MVIIA em decorrência da variabilidade de doses citadas na literatura, em sua maioria estudos antinociceptivos, onde concentrações de 3 a 200 μ M mostraram eficácia em bloquear os CCVD do tipo N (Souza et al., 2008; Hama e Sagen, 2009; Souza et al., 2011, 2013). Souza et al. (2013) sugeriram que a concentração de 10 μ M realiza o bloqueio efetivo de CCVD, mas MVIIA já possui efeito na dose de 5 μ M. Assim, a curva de dose, nesse experimento, foi sendo ajustada para doses menores ou maiores dependendo do resultado nos ensaios.

Na via IL, a dose de 5 μ M apresentou resultados semelhantes ao placebo, o que justificava testar apenas doses superiores (10 e 20 μ M) até a presença de efeitos colaterais graves. Já pela via IT, observou-se que a concentração de 5 μ M possuía resultados favoráveis, sendo necessária a avaliação de dose inferior (2,5 μ M) a fim de obter uma melhor relação de custo/benefício. Além disso, doses superiores (10, 20 e 40 μ M) foram avaliadas pela via IT e também encontraram como fator limitante intensos efeitos colaterais na concentração máxima utilizada, o que determinou a retirada do grupo 40 μ M das análises posteriores.

-Escolha dos momentos de aplicação

O tratamento precoce do TMA é mais efetivo quando realizado dentro das

primeiras horas, impedindo o desenvolvimento de lesões secundárias (Bracken et al., 1990). No método da MVIIA via IL, optou-se pela aplicação aos cinco minutos após o trauma com objetivo de bloquear precocemente os CCVD tipo N e diminuir as lesões decorrentes do influxo exacerbado do cálcio e seus efeitos deletérios (Isaac e Pejic, 1995; Amar e Levy, 1999; Carlson e Gorden, 2002; Hall e Springer, 2004; Oliveira et al., 2014).

Sabe-se que a depleção do cálcio do meio extracelular em direção ao intracelular se inicia minutos após o insulto mecânico (Young et al., 1982; Stokes et al., 1983; Gelderd e Sampson, 1990), com o primeiro aumento aos 45 minutos (Happel et al., 1981), concentração máxima em oito horas (Happel et al., 1981) e elevada manutenção por 24 a 48 horas (Fineman et al., 1993). Em vista do rápido início de ação da toxina, de aproximadamente 22 minutos (Bowersox e Luther, 1998), acreditou-se que esse momento de aplicação cinco minutos inibiria o primeiro aumento do cálcio e sua elevação posterior. Além disso, esse tempo foi essencial para utilização da via IL, aproveitando-se do mesmo procedimento cirúrgico do trauma medular, o que evitou outra cirurgia, maior trauma tecidual, reação inflamatória e estresse animal.

A escolha dos tempos para o modelo IT foi baseada em estudos de isquemia cerebral (Valentino et al., 1993; Buchan et al., 1994; Bowersox et al., 1997) e medular (Burns et al., 1999) e lesão traumática cerebral (Verweij et al., 2000), visto que não há trabalhos sobre a MVIIA no trauma medular. As aplicações da MVIIA têm sido relatadas com potencial neuroprotetor quando aplicadas IV desde 15 minutos (Verweij et al., 2000) até 24h (Valentino et al., 1993; Buchan et al., 1994; Bowersox et al., 1997) após insulto isquêmico cerebral global em ratos (Valentino et al., 1993), insulto isquêmico cerebral focal em ratos

(Buchan et al., 1994), isquemia cerebral transitória em ratos (Colbourne et al., 1999) e lesão traumática cerebral em ratos (Verweij et al., 2000). Nesse experimento, optou-se inicialmente pela aplicação IT com quatro horas após o trauma medular já que a aplicação precoce, como 15 minutos (Verweij et al., 2000) ou uma hora (Valentino et al., 1993), mostrou danos consideravelmente maiores do que as tardias, além de ter sido observado por Verweij et al. (2000) maior preservação mitocondrial com aplicação da MVIIA 4 horas após a lesão cerebral traumática.

Frente aos resultados favoráveis encontrados na via IT, avaliou-se outro momento de aplicação (uma hora) para investigação da janela terapêutica da MVIIA, já que o tratamento precoce no TMA mostra resultados mais promissores (Bracken et al., 1990). E, corroborando com os dados de Verweij et al. (2000), a aplicação com quatro horas apresentou melhor preservação celular, sendo desconhecido o mecanismo. Sugere-se ainda que a intensa ativação de proteases, após o trauma medular, possa reduzir a meia vida da toxina quando aplicada precocemente como correlacionado a distribuição de medicamento via intratecal (Soderquist et al., 2009). A eficácia em tratamentos tardios para terapia neuroprotetora é um fator chave considerando a demora do encaminhamento do paciente.

A MVIIA e seus efeitos colaterais

Os tremores iniciaram, em média, aos 40 e 90 minutos após a aplicação via IT e IL, respectivamente, semelhante aos 30 a 60 minutos relatados em estudos com aplicação IT (Scott et al., 2002; Hama e Sagen, 2009). Em concordância com Hama e Sagen (2009), a menor dose utilizada (5µM) não apresentou complicações por ambas as vias. Mas, concentrações superiores na via IL mostraram alterações

dose dependente sendo visualizado tremor do corpo e cauda de maneira moderada e grave com as doses, respectivas, de 10 e 20 μ M.

Na via IT, diferentemente dos tremores e movimentos de cauda relatados por Malmberg e Yaksh (1994) e Souza et al. (2008), a dose de 10 μ M apresentou alterações apenas em um animal quando aplicada uma hora após o trauma, corroborando com os dados de Souza et al. (2011), sendo visto com maior frequência e intensidade em doses superiores (20 e 40 μ M).

Os efeitos colaterais foram reversíveis em até 8 horas, à exceção do grupo 20 μ M MVIIA IT e IL onde alguns animais apresentavam tremores discretos de cauda em até 24 horas após a aplicação conforme Malmberg e Yaksh (1994) e Scott et al. (2002), e o grupo 40 μ M que persistia por mais de 24 horas. Esse último grupo foi retirado do experimento pela intensidade e persistência dos efeitos colaterais, sendo submetidos a eutanásia antecipadamente. Ressalta-se, nesse estudo, que na via IL os efeitos colaterais além de mais intensos, foram observados em concentrações menores aos aplicados pela via IT, o que impossibilitou testar doses mais elevadas nesse modelo de aplicação. Isso ocorreu provavelmente porque a dispersão do medicamento na IL é mínima quando comparado a IT, o que predispõe a ocorrência dos efeitos colaterais mais facilmente, limitando a utilização dessa via.

Efeito da MVIIA sobre os eventos secundários ao trauma medular

A escolha do tempo de eutanásia para avaliação da neuroproteção foi de 48 horas após o trauma, já que eventos como liberação excessiva do glutamato, aumento exacerbado do cálcio intracelular com consequente disfunção mitocondrial, formação de ERO, PL, picos de apoptose e

morte celular (Li et al., 1996; Lu et al., 2000; Hall e Springer, 2004) ocorrem ou são ativados, em sua maioria, em até 48 horas após a lesão (Li et al., 1996; Dong et al., 2000; Lu et al., 2000; Hwan et al., 2006; Oyinbo, 2011; Yip e Malaspina, 2012), mostrando altos índices de expressão ou produção proteica dos fatores nesse momento (Hwan et al., 2006).

-Efeito da MVIIA sobre o glutamato após o trauma medular

A observação dos níveis de glutamato foi uma ferramenta importante já que sua redução é considerada uma estratégia de neuroproteção (Kunihara et al., 2004; Gensel et al., 2012). Dentro dos primeiros minutos após o trauma medular, o glutamato atinge níveis tóxicos como resultado da lise celular pela lesão mecânica, excitose e/ou inibição da receptação nas fendas sinápticas (McAdoo et al., 2000; Hausman, 2003; Kwon et al., 2004), o que induz a entrada ainda maior de cálcio nas células, levando a excitotoxicidade e morte celular (Nakamura et al., 1994; Liu et al., 1999b; Brouns et al., 2009). Assim, decidiu-se avaliar o efeito da MVIIA na concentração do glutamato com 48 horas, embora seja relatado que o pico do glutamato no líquido cerebrospinal ocorre entre 15 (Mills et al., 2001) a 40 minutos (Xu et al., 2004), com redução em uma hora (Liu et al., 2013) e retorno aos níveis basais com três (Liu et al., 1991; Liu e McAdoo, 1993; Xu et al., 2004) a quatro horas após o trauma medular (Ishikawa e Marsala, 1996; Yamamoto e Sakashita, 1998). As proteínas responsáveis por sua receptação estão reduzidas tanto no epicentro como regiões adjacentes, locais onde houve perdas teciduais e apoptose (Kim et al., 2011; Lepore et al., 2011). Essas proteínas atingem pico com seis horas depois do TME (Vera-Portocarreto et al., 2002), o que justifica a alta redução do glutamato.

A avaliação do glutamato no momento de 48 horas após o trauma medular é um dado inexistente na literatura e pensou-se na possibilidade de outros picos como ocorrem nos processos oxidativos, disfunção mitocondrial e apoptose/morte celular que podem perdurar por dias. Kunihara et al. (2004) mostram a persistência de altos níveis de glutamato até 72 horas em evento de isquemia medular em humanos e outro estudo relata a persistência em homogenato medular por semanas dependendo da intensidade da lesão (Panter et al., 1990 citado por Lepore et al., 2011). Além disso, as proteínas transportadoras do glutamato também foram detectadas em altos índices por semanas no tecido medular adjacente ao epicentro, na tentativa de reestabelecer a homeostasia (Kim et al., 2011).

Em ambos os modelos e horários de aplicação da MVIIA, as concentrações de glutamato no líquido cerebrospinal não diferiram entre si, 48 horas após o TMA, atingindo o nível do SHAM. Frente a esses dados, em experimento paralelo com aplicação da MVIIA IT 4 horas, realizou-se a eutanásia dos animais às seis horas após o TMA, e também não foram constatadas diferenças nos níveis de glutamato (dados não mostrados). A coleta foi realizada apenas na eutanásia, pois o volume necessário era incompatível com a sobrevivência do animal. Apesar da observação da MVIIA na redução do glutamato em tempos precoces (Souza et al., 2008; Gonçalves et al., 2011), alguns autores ressaltaram que essa via não seja a única implicada na neuroproteção da toxina (Valentino et al., 1993; Newcomb e Palma, 1994), já que altas doses seriam necessárias para regulação da liberação desse neurotransmissor em níveis menores que 50% quando comparado aos efetivos inibidores (Bowersox et al., dados não publicados, 1999 citado por Wang e Bowersox, 2000). Assim, foram necessários outros testes para avaliação da neuroproteção da MVIIA.

-Efeito da MVIIA sobre a viabilidade celular após o trauma medular

O aumento do cálcio dentro da célula no TMA contribui diretamente para disfunção mitocondrial, já que essa organela ativa a entrada do íon para seu interior com objetivo de realizar a homeostase intracelular (Santo-Domingo e Demaurex, 2010). Considerando que a MVIIA, em lesão cerebral traumática, melhora a viabilidade mitocondrial quando aplicada por via IV, pelo bloqueio dos CCVD tipo N (Xiong et al., 1998; Verweij et al., 2000), decidiu-se estudar seu efeito sobre a preservação dessa organela após o TMA.

As concentrações de 5 e 10 μ M MVIIA IT com quatro horas promoveram maior viabilidade mitocondrial, atingindo os níveis do SHAM, distintamente dos modelos com aplicação IL cinco minutos e IT uma hora que não apresentaram diferença. De modo interessante, Valentino et al. (1993), no modelo de isquemia cerebral, e Verweij et al. (2000), no modelo de lesão traumática cerebral, observaram que a MVIIA fornecida 15 minutos antes ou até uma hora após a lesão não preservou tanto a mitocôndria quanto aplicada tardiamente com quatro ou seis horas após isquemia cerebral (Valentino et al., 1993; Verweij et al., 2000).

A razão para o efeito tardio da MVIIA ainda permanece desconhecida. Verweij et al. (2000) sugerem que a MVIIA seja mais eficiente em períodos críticos do cálcio. Como o primeiro pico desse íon ocorre oito horas após o trauma medular (Happel et al., 1981) e se a MVIIA é fornecida quatro horas após a lesão, ela atingiria seu efeito máximo com três (Souza et al., 2011) a quatro horas (Souza et al., 2013) da aplicação IT e coincidiria com a elevação exacerbada do cálcio intracelular. Como a mitocôndria libera fatores ativadores da cascata de apoptose e aumenta ainda mais as lesões secundárias ao TMA, como danos

oxidativos, produção de ERO, interrupção de sinapses e morte celular (Azbill et al., 1997; Sullivan et al., 2007; Patel et al., 2010), sugere-se que a MVIIA aplicada com quatro horas promova uma redução desses danos e mantenha a integridade celular.

Além disso, os resultados mostraram elevada disfunção mitocondrial 48 horas após o trauma medular. A disfunção mitocondrial se inicia nas primeiras horas após a lesão (Azbill et al., 1997; Wingrave et al., 2003), com pico em 12 horas (Singh et al., 2006) e permanece alterada por 24 horas (Azbill et al., 1997; Sullivan et al., 2007) ou às 72 horas (Wu et al., 2009), momento máximo avaliado em trauma medular. Com esse resultado, podemos sugerir que a disfunção mitocondrial permanece alterada no momento de 48 horas após o TMA.

Outros ensaios de viabilidade celular são utilizados, entre eles a marcação com etídeo homodímero. É um método relativamente simples e rápido para avaliar a viabilidade neuronal (Monette et al., 1998), distinguindo facilmente a célula intacta da danificada por se tornar permeável e corar o DNA (Johnson e Rabinovitch, 2012). O uso da marcação com o etídeo homodímero permitiu a quantificação das células mortas sem a utilização de análises microscópicas convencionais, as quais se baseiam na visualização morfológica de células após diversas etapas de preparação tecidual e contagem extremamente trabalhosa. Dessa forma, o emprego dessa marcação foi o teste de escolha que associado ao anterior, de viabilidade mitocondrial, proveu indicativos positivos e negativos da viabilidade celular e permitiu analisar dados de mortalidade celular no TMA, como também o controle da viabilidade tecidual (Johnson e Rabinovitch, 2012).

Esses resultados sugerem o efeito neuroprotetor da MVIIA, no modelo IT

quatro horas, com a dose de 10 μ M, o que foi confirmado pela avaliação da viabilidade mitocondrial. Os dados são consistentes com os relatados sobre MVIIA, a qual promoveu significativa proteção nas isquemias (Valentino et al., 1993; Buchan et al., 1994) e lesões traumáticas cerebrais quando fornecida por até 24 horas (Berman et al., 2000; Verweij et al., 2000). Nesse estudo, a MVIIA proporciona um aumento de 80% da viabilidade mitocondrial e, em contrapartida, 23% de redução da morte celular. Sugere-se que essa observação seja decorrente da diferença de segmento medular avaliado, para redução do número de animais utilizados no estudo. O mecanismo de proteção da MVIIA tem sido relacionado ao bloqueio de CCVD tipo N (Nadasdi, 1995; Lewis et al., 2000) com melhora da função respiratória mitocondrial (Berman et al., 2000) e inibição de neurotransmissores excitatórios em modelos antinociceptivos (Souza et al., 2008; Gonçalves et al., 2011). Todavia, além da inibição do glutamato ser baixa como mostrado em lesões cerebrais traumáticas tratadas com MVIIA (Valentino et al., 1993), ela oferece neuroproteção mesmo se aplicada horas após a lesão, ou seja, após a normalização desse neurotransmissor (Berman et al., 2000). Portanto, sugere-se que possa haver outros mecanismos envolvidos ainda desconhecidos.

-Efeito da MVIIA sobre o estresse oxidativo após o trauma medular

A possibilidade de mecanismos envolvidos na neuroproteção foi determinante na investigação do efeito da MVIIA em outra via, como o estresse oxidativo. Esse é um mecanismo patológico envolvido em doenças neurológicas graves que sob inibição leva a redução da morte neuronal (Lee et al., 2009; Liu et al., 2013).

Efeitos antioxidantes têm sido relatados em peptídeos marinhos (Jung et al., 2005; Liu

et al., 2008), mas ainda não há dados com a MVIIA. Nesse estudo, a MVIIA foi capaz de inibir a produção das ERO quando aplicada pela via IT com uma ou quatro horas após o trauma, sendo que o tratamento tardio foi melhor. O modelo IL não apresentou resultados favoráveis. Sabe-se que, após TMA, há aumento dos níveis tóxicos das ERO (Liu et al., 1998; Luo et al., 2002; Liu et al., 2004; Wu et al., 2009), o que pode levar a danos neuronais, das células da glia e elementos microvasculares com consequente apoptose (Juurlink e Paterson, 1998; Bao e Liu, 2004; Luo e Shi, 2004; Xu et al., 2005). Além do aumento de cálcio intracelular ativar vias de produção de radicais livres, a mitocôndria é uma das maiores fontes proveniente da formação do radical O_2^- da reação respiratória. Em excesso, essa molécula com elétron não pareado sobrecarrega as defesas antioxidantes, desestabiliza a homeostase mitocondrial e leva a formação de mais ERO, tornando-se um ciclo vicioso de geração de radicais livres (Lander, 1997; Liu et al., 1998; Wu et al., 2009; Bains e Hall, 2012). Os trabalhos têm mostrado que a inibição do aumento de ERO, em lesões do SNC, possui ação neuroprotetora (Lee et al., 2009) e leva a melhora na recuperação funcional (Hall et al., 1992; Mu et al., 2000; Hachmeister et al., 2006; Liu et al., 2013).

Portanto, o estresse oxidativo possui papel central na lesão secundária ao TMA e sua inibição é uma intervenção em potencial (Hillard et al., 2004; Luo e Shi, 2004). Liu et al. (1998), Liu et al. (1999) e Liu et al. (2013) relatam o aumento rápido de ERO após o TMA (Xu et al., 2005), com elevação até o período de 11 horas e retorno aos níveis basais com 12 horas após a lesão. Ainda, Varizi et al. (2004) acrescenta que há aumento dos níveis das ERO com um (Azbill et al., 1997) e 14 dias após a lesão medular, momentos avaliados pelo autor. Nessa avaliação o grupo SHAM diferiu-se dos demais com 48 horas após o TMA, corroborando com os dados de Lavor

(2013). Mais uma vez, a MVIIA aplicada tardiamente mostrou potencial neuroprotetor, sendo esses dados consistentes com a preservação mitocondrial e consequente menor morte celular. E, apesar da MVIIA 1h IT diminuir a ERO, essa diminuição não foi suficiente para ocasionar a preservação celular.

Dentre essas ERO, a decomposição do íon peroxinitrito forma espécies de radicais livres altamente citotóxicas que levam a PL (Bains e Hall, 2012; Dasuri et al., 2013). A PL é um dos mecanismos mais prejudiciais desenvolvidos após o TMA (Bains e Hall, 2012), pois resulta no rompimento da membrana celular e em fatores neurotóxicos, como o MDA (Seligman et al., 1977), o qual foi quantificado no experimento. Ao observar que peptídeos marinhos, no caso ostras, possuíam alta atividade protetora contra a lipoperoxidação (Qian et al., 2008), decidiu-se avaliar o efeito da MVIIA nessa via após o trauma medular. Nesse estudo, apenas a dose de $10\mu\text{M}$ IT 4 horas após o trauma propiciou a redução da PL, reforçando mais uma vez os dados anteriores. A atenuação da produção de ERO está diretamente relacionada com o decréscimo da PL. Isso não foi visto com o grupo uma hora, provavelmente porque a inibição de ERO não tenha sido suficiente. Com base nesses resultados, sugere-se que a dose de $10\mu\text{M}$ da MVIIA IT fornecida 4 horas após o trauma medular foi capaz de reduzir a lesão gerada pelo estresse oxidativo, mostrando o potencial neuroprotetor como relatado por outras substâncias (Koç et al., 1995; Song et al., 2013).

-Efeito da MVIIA sobre a expressão gênica de fatores relacionados a apoptose

Frente aos resultados favoráveis à viabilidade celular, decidiu-se investigar a cascata de apoptose para esclarecimento dos possíveis mecanismos de ação da MVIIA. Observou-se que no grupo tratado

com a conotoxina houve aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xl, diminuição da pro-apoptótica Bax, enzima nNOS, caspase-8 e caspase-3. Esses dados corroboram com os de Fang et al. (2011), nos quais a MVIIA, em experimento *in vitro* em camundongo, possibilitou a redução da expressão de Bax, caspase-3, além do aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

A apoptose é a morte celular programada que ocorre normalmente como resposta fisiológica do organismo, mas em excesso contribui para danos celulares (Liu et al., 1997). No trauma medular, a intensa formação de radicais livres (Siniscalco et al., 2007; Kubli et al., 2008), disfunção mitocondrial (Galluzzi et al., 2009) e do RE (Yu et al., 1999; Zhang et al., 2014) são indutores de altos índices de apoptose (Sugawara et al., 2004). Estratégias farmacológicas que inibam esses eventos, principalmente as caspases efetoras, podem ser úteis no tratamento no trauma medular (Li et al., 2000; Çolak et al., 2005; Zhang et al., 2012). Nesse estudo, a MVIIA reduziu a expressão da caspase-3, uma potente efetora da apoptose, capaz de clivar proteínas envolvidas no ciclo e estrutura celular e replicação do DNA (Soraloglu et al., 2005). Investigadores mostraram que agentes anti-apoptóticos limitam a morte celular programada, diminuem as lesões histológicas e proporcionam melhora neurológica (Çolak et al., 2005).

A apoptose é regulada por processos biológicos dentro de duas vias principais: a extrínseca de ligantes aos receptores de morte celular e a intrínseca mediada principalmente pela mitocôndria (Riedl e Shi, 2004). A família de proteínas Bcl-2 tem um papel central no controle da via mitocondrial, com proteínas pró (Bax, Bak) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl) (Pitkanen et al., 2005; Portt et al., 2011). Assim, o equilíbrio entre essas proteínas é essencial na morte ou sobrevivência da célula. A

MVIIA proporcionou aumento da expressão da Bcl-xl e diminuição de Bax após o trauma medular. A Bcl-xl preserva a membrana mitocondrial após insulto (Gottlieb et al., 2000), evitando a formação de mais ERO, como observado nos grupos tratados com a conotoxina. Ainda, Li et al. (2004) relatam que as ERO suprimem a expressão de Bcl-xl, aumentam de Bax (Siniscalco et al., 2007; Kubli et al., 2008) e agem diretamente na permeabilidade mitocondrial (Fleury et al., 2002). Diante disso, indica-se que a MVIIA ao reduzir a produção de ERO, possibilitou a alta expressão de Bcl-xl, diminuição de Bax e, com a preservação da mitocôndria, evitou a formação de mais ERO.

Na sequência da cascata de apoptose, apesar da baixa relação de Bax/Bcl-xl, não houve redução da caspase-9. Isso pode estar relacionado a outra via de ativação da cascata, a qual se dá pela caspase-2, de maneira direta como descrito por Samraj et al. (2007) ou via mitocondrial (Guo et al., 2002). Picos de expressão da caspase-9 são relatados na literatura nos momentos de seis (Montazeri et al., 2013), 24, 48 e 72 horas, ou ainda persistindo por cinco dias (Wu et al., 2007). Contudo, em experimentos diferentes, Wu et al. (2007) ora encontrou diferença no momento 48 horas, ora não. Ainda, Montazeri et al. (2013), ao avaliar a expressão da caspase-9 por região medular, encontrou aumento do nível da proteína ao longo dos dez dias avaliados, mas observou diferença apenas no décimo dia após injúria medular no segmento cranial à lesão e no primeiro dia no epicentro e região caudal. Portanto, sugere-se que possa não ter sido observado diferença na expressão da caspase-9, no grupo MVIIA, pelo momento e região avaliada, sendo necessários mais estudos.

Sabe-se ainda da importante contribuição do estresse no RE para via apoptótica mediado pela caspase-12 (Yu et al., 1999; Nakagawa et al., 2000; Zhang et al., 2014).

Nos grupos tratados com MVIIA não foi observado redução da expressão dessa proteína 48 horas após o TMA. Ademais, nesse estudo, a MVIIA foi capaz de reduzir a expressão da nNOS, mediadora da formação de NO. Há fortes evidências do importante papel do NO na morte neuronal com elevação do estresse oxidativo (Hamada et al., 1996; Wada et al., 1998; Chatzipanteli et al., 2002; Luo et al., 2014) e, este na indução da apoptose (Maulik et al., 1998; Galang et al., 2000; Xu et al., 2005). Assim, sugere-se que a MVIIA, ao bloquear os CCVD, foi capaz de reduzir a expressão da nNOS, a produção de ERO e lipoperoxidação. Faz-se necessária a investigação do seu potencial antioxidante já que enzimas antioxidantes foram correlacionadas a susceptibilidade de danos celulares ao NO (Bolaños et al., 1996) e a redução de apoptose (Maulik et al., 1998; Galang et al., 2000; Karalija et al., 2014).

Outro caminho para apoptose é a via extrínseca de ativação da caspase-3 pela caspase-8 acionada por ligantes, como TNF- α ou Fas L, a receptores de morte na membrana plasmática (Boldin et al., 1996; Portt et al., 2011). Relata-se que ERO possa aumentar a expressão desses receptores de morte celular, Fas L, colocando em ação a caspase-8 (Devadas et al., 2002; Wang et al., 2008). A MVIIA realizou a inibição efetiva das caspases-8 e -3, indicando o envolvimento dessa via em seu mecanismo de ação. Essa caspase iniciadora pode também clivar a proteína Bid, o que aumenta a permeabilidade mitocondrial, sendo um ponto de comunicação da via intrínseca e extrínseca (Pitkanen et al., 2005; Portt et al., 2011). Assim, sugere-se que a inibição da caspase-8 também esteja envolvida com a maior preservação mitocondrial observada no grupo MVIIA. Ainda, ao realizar a inibição da produção de ERO, possivelmente impediu o aumento da expressão de receptores FasL, como

relatado por Devadas et al. (2002) e Wang et al. (2008), e consequente ativação da caspase-8.

Em conjunto, os resultados demonstraram que a administração IT tardia da MVIIA, bloqueadora de canais para cálcio tipo-N, promoveu a proteção das células da ME em ratos submetidos ao trauma medular com preservação da viabilidade mitocondrial, redução do estresse oxidativo, da morte celular e da expressão de fatores apoptóticos. Pelo fato da MVIIA ser um potente analgésico já utilizado clinicamente pela via IT (Olivera et al., 1994; Greenberg, 1997; Bowersox e Luther, 1998; Bingham et al., 2010), o uso dessa toxina no trauma medular atingirá dois objetivos clínicos: manejo da dor e preservação celular.

CONCLUSÕES

- 1- A aplicação intratecal da MVIIA a 10 μ M apresentou efeito neuroprotetor quando fornecida quatro horas após o trauma medular em ratos, caracterizado pela inibição do estresse oxidativo, redução da morte celular, aumento da viabilidade mitocondrial, redução da expressão de fatores pró-apoptóticos (Bax, caspase-8, caspase-3, nNOS) e aumento dos anti-apoptóticos (Bcl-x1).
- 2- O modelo intralésional de aplicação da MVIIA, cinco minutos após o trauma medular em ratos, não promoveu resultados favoráveis a neuroproteção.
- 3- O tratamento com MVIIA pela via intratecal, uma hora após o trauma medular, reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio, mas não mostrou preservação celular.

CAPÍTULO 3

Efeito antioxidante da ω -conotoxina MVIIA no trauma medular agudo em ratos

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos antioxidantes da ω -conotoxina MVIIA (MVIIA) no trauma medular agudo. Vinte e um ratos Wistar foram aleatoriamente distribuídos em três grupos: controle negativo (SHAM), placebo (PLA – PBS estéril) e 10 μ M MVIIA quatro horas após o trauma, sendo os tratamentos específicos fornecidos via intratecal. A eutanásia foi realizada 48 horas após o trauma e o segmento medular caudal ao epicentro foi coletado. Foram realizados ensaios enzimáticos da atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e glutathione-S-transferase. O delineamento do estudo foi inteiramente casualizado e os dados submetidos ao ANOVA com comparação de médias pelo teste de SNK ($p < 0,05$). A aplicação intratecal de 10 μ M MVIIA foi capaz de modular positivamente a atividade das enzimas superóxido dismutase (188,41% \pm 72,05), glutathione peroxidase (199,96% \pm 68,65), glutathione redutase (215,01% \pm 58,54) e glutathione-S-transferase (175,93% \pm 68,92) no trauma medular. Sugere-se que a MVIIA tornou o sistema de detoxificação celular mais eficiente, sustentando a ideia de que possa ser usada como agente neuroprotetor no trauma medular.

Palavras chave: MVIIA, antioxidante, trauma medular, ratos.

INTRODUÇÃO

O trauma medular ainda é uma das principais causas de debilidade permanente em jovens, sendo estimada uma incidência de 12 a 36 casos em cada milhão de pessoas (Cripps et al., 2011; Jia et al., 2013; Lee et al., 2013). Os déficits neurológicos estão relacionados ao trauma inicial e, principalmente, às lesões secundárias neurodegenerativas. Entre elas, o excesso do cálcio intracelular é um dos eventos mais críticos, que leva a alterações iônicas e geram apoptose e necrose celular pelo aumento da ativação de enzimas celulares, danos mitocondriais, acidose e produção de radicais livres (Isaac e Pejic, 1995; Amar e Levy, 1999; Lu et al., 2000; Carlson e Gorden, 2002; Hall e Springer, 2004; Liu et al., 2011).

Os radicais livres fazem parte de um mecanismo fundamental nas doenças neurológicas, provocando as chamadas lesões oxidativas. Eles são constituídos por moléculas com elétron não pareado, o que os torna altamente reativos a estruturas macromoleculares e determina lesão celular com interrupção da homeostasia (Delanty e Dichter, 2000; Dasuri et al., 2013). Esses eventos são relatados como as primeiras alterações bioquímicas após o trauma medular, desempenhando papel central nos danos secundários à lesão traumática (Juurink e Paterson, 1998). Para minimizar essas disfunções, existem as defesas antioxidantes enzimáticas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (Azbill et al., 1997; Nagai et al., 2001; Masella et al., 2005), importantes na regulação do estresse oxidativo no trauma medular (Liu et al., 2004; Ozgiray et al., 2011). A terapia que aumentar as defesas antioxidantes ou reduzir a produção de pró-oxidantes pode ser eficaz em prevenir, melhorar ou retardar as alterações neurológicas e promover neuroproteção (Azbill et al., 1997; Bains e Hall, 2012; Priestley et al., 2012).

A MVIIA, bloqueadora de canais para cálcio tipo N, é uma toxina de caramujo marinho utilizada clinicamente, em humanos, pelas propriedades analgésicas e, tem mostrado grande potencial na redução de lesões cerebrais isquêmicas e traumáticas e medulares isquêmicas (Choi, 1992; Lanz et al., 2000). Em estudo prévio (Capítulo 2), a MVIIA mostrou efeito neuroprotetor no TMA, em ratos, relacionado à inibição de danos oxidativos com redução na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica (PL). Como os tecidos se protegem dos danos oxidativos com enzimas antioxidantes (Azbill et al., 1997; Nagai et al., 2001) e, ainda não há estudos que as relacione a MVIIA, determinou-se a atividade de superóxido dismutase, catalase e glutatona para avaliação inédita do efeito antioxidante da MVIIA após o trauma medular agudo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências físicas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária (EV) e no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Seguiram-se os princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (projeto aprovado sob protocolo 226/2012, anexo 1).

Animais

Vinte e um ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, com três meses de idade e peso médio de 285g (\pm 27,84), provenientes da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram mantidos na EV da 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 roedores³² e água *ad libitum* por todo o período. Além disso, antes do início do experimento, foram desverminados com tiabendazol³³ (100mg/kg, VO) e submetidos a 14 dias de aclimação.

A ω-conotoxina MVIIA

A MVIIA³⁴ foi reconstituída, de acordo com indicação comercial, em PBS estéril e centrifugada para dissolução completa. Posteriormente, foi alíquotada em tubos para microcentrífugas e armazenada a -20°C até o uso.

Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais receberam antibiótico de forma profilática, cefalotina sódica³⁵ (60mg/kg, SC) e sulfato de morfina³⁶ (2,5mg/kg, SC) como medicação pré-anestésica, 20 minutos antes da cirurgia. Em seguida, realizou-se a indução anestésica, em câmara com isoflurano³⁷, e manutenção do plano anestésico cirúrgico com mesmo agente, fornecido por máscara facial em sistema de não-reinalação.

Após a tricotomia da região dorsal, os ratos foram fixados em decúbito esternal em uma superfície de vidro e posicionados no aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFMG (Torres et al., 2010; Oliveira et al., 2014; Rosado et al., 2014). Esse aparelho consta de uma prancha de polietileno perfurada, com elevação em relação à superfície, aderida a um eixo, no qual se encaixa um suporte removível com

uma haste de aço inoxidável (0,5g) acoplada a um peso de 40g. Posteriormente à antissepsia com iodopovidona degermante³⁸ e solução de álcool iodado³⁹, foram realizadas incisões cutânea e subcutânea na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica a primeira lombar, e dos músculos epiaxiais, afastando-os lateralmente. Realizou-se a ostectomia do processo espinhoso da vértebra torácica número 12, com auxílio da pinça de Kocher, seguida da remoção da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico⁴⁰ e pinça hemostática de Halsted, sob irrigação intermitente com solução fisiológica⁴¹. O trauma mecânico foi obtido pela compressão da medula espinhal (ME) com peso de 40,5g mantido sobre a dura-máter exposta, durante cinco minutos (0,5g da haste somado ao peso de 40g). Após o tratamento, realizou-se a aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto empregando-se sutura padrão simples contínua com fio inabsorvível sintético, polipropileno 3-0⁴². A dermorrafia foi feita com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio.

Após a cirurgia, todos os animais receberam solução de NaCl 0,9%, na taxa de manutenção (15ml/kg), via subcutânea (SC). Os animais foram mantidos em caixas aquecidas, à temperatura de 37°C, com oxigenoterapia até completa recuperação anestésica. No pós-operatório, foi realizada analgesia com sulfato de morfina⁴³ (2,5mg/kg, SC, q4h) no dia da cirurgia e

³² Nuvilab CR-1® – Nuvital Nutrientes S/A. Colombo, PR, Brasil.

³³ Thiaben® – Uci-Farma. São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

³⁴ Conotoxin MVIIA (ω-)® – Latoxan. Valence, France.

³⁵ Keflin® – ABL, Antibióticos do Brasil Ltda. Cosmópolis, SP, Brasil.

³⁶ Tramadol – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

³⁷ Isoflurane – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

³⁸ Biotrat® – LMFarma. São José dos Campos, SP, Brasil.

³⁹ Riodene – Álcool Iodado Rioquímica indústria farmacêutica, São Paulo – SP, Brasil.

⁴⁰ With ECCOS® Aesculap – Laboratórios B. Braun S.A. São Gonçalo, RJ, Brasil.

⁴¹ Cloreto de sódio 0,9% – Laboratório Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG, Brasil.

⁴² Prolene® – Ethicon Endo Surgery. São Paulo, SP, Brasil.

⁴³ Morfina 10mg/mL – Produto genérico, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil.

cloridrato de tramadol⁴⁴ (5mg/kg, SC, q8h) nos dias subsequentes; antibioticoterapia com cefalexina⁴⁵ (60mg/kg, VO, q12h) e massagem abdominal para esvaziamento vesical, três vezes ao dia, até a eutanásia.

Tratamento

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de sete animais: controle negativo (SHAM), placebo (PLA – PBS estéril) e 10 μ M MVIIA. No SHAM foi realizado somente laminectomia. Os outros grupos, quatro horas após o trauma, receberam o tratamento específico por via IT: PBS estéril e 10 μ M MVIIA, respectivamente, no grupo PLA e MVIIA. Essa injeção foi realizada de acordo com metodologias previamente descritas (Mestre et al., 1994). Administrou-se o volume de 10 μ L com microseringa de Hamilton⁴⁶ de 10 μ L, enquanto os ratos eram gentilmente contidos com auxílio de compressa que ao recobri-lo, fornecia tranquilidade ao animal. O ligeiro movimento da cauda (“*flick*”) indicava a perfuração da duramater e o local exato da aplicação.

Após as 48 horas do trauma, os animais foram pré-medicados com cloridrato de xilazina⁴⁷ (8mg/kg, IP) e submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico⁴⁸ (100mg/kg, IP). Coletou-se o fragmento da ME caudal ao epicentro da lesão para avaliação do sistema antioxidante.

⁴⁴Tramadon® – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁴⁵Cefalexina suspensão® – Medley S.A. Indústria farmacêutica. Sumaré, SP, Brasil.

⁴⁶Modelo 701LT – Hamilton Company, Reno, NV, USA.

⁴⁷Virbaxyl® 2%, Virbac – Saúde Animal. São Paulo, SP, Brasil.

⁴⁸Cobas Mira® – Roche. Jacarepaguá, RJ, Brasil.

Ensaio para quantificar a atividade de superóxido dismutase

O ensaio para medir a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizado seguindo a metodologia proposta por Marklund e Marklund (1974). Em soluções aquosas, o pirogalol possui uma alta taxa de auto-oxidação, formando um composto de cor amarela que pode ser quantificado a 420nm. A SOD é capaz de inibir a auto-oxidação do pirogalol, e essa propriedade é usada para definir a atividade dessa enzima. Sendo assim, a inibição de 50% foi definida como uma unidade (U) de SOD. Após o processamento da ME, o sobrenadante foi incubado numa solução contendo 100mM de tampão de fosfato de potássio e 50mM de EDTA com pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 2mM de pirogalol⁴⁹. A oxidação do pirogalol foi medida no espectrofotômetro a 420nm durante 5 minutos, em intervalos de 30 segundos. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificar a atividade da catalase

A dosagem da atividade da catalase (CAT) foi realizada de acordo com o método proposto por Aebi (1984). Uma fração de 3 μ L da amostra foi adicionada a 20 μ L de H₂O₂ 10mM e 600 μ L de tampão fosfato (50mM; pH 7,0) contendo 0,002% de Tween e 1% de EDTA. A análise cinética foi iniciada após a adição do H₂O₂, sendo que a taxa de decomposição desse composto foi medida espectrofotometricamente a 240nm durante 150 segundos, em intervalos de 15 segundos. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

⁴⁹Sigma MO, USA.

Ensaio para quantificar a atividade da glutathiona peroxidase

A dosagem da atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi realizada de acordo com o método proposto por Paglia e Valentine (1967). Uma solução de reação foi preparada com os seguintes componentes: 3,12g de NADPH, 10 μ L de glutathiona redutase⁵⁰ (500U/mg proteína/mL), 250 μ L de NaN₃ 100mM; 7,68g de glutathiona reduzida em 20mL de tampão fosfato 100mM pH 7,0 com 5mM de EDTA. Na cubeta de acrílico foram pipetados 510 μ L da solução de reação, 30 μ L de água mili-Q e 30 μ L do homogenato. A reação enzimática começou pela adição de 60 μ L de H₂O₂ 4mM. A conversão do NADPH a NADP⁺ foi medida espectrofotometricamente a 340nm por 5 minutos. A unidade enzimática foi determinada pela oxidação de 1mol de NADPH por minuto e foi calculada com base na absorção do NADPH em 340nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificar a atividade da glutathiona redutase

A dosagem da atividade da glutathiona redutase (GR) foi realizada de acordo com o método proposto por Aebi (1984). Uma solução de reação foi preparada com 2,13mg de NADPH em 20mL de tampão fosfato 150mM, pH 7,0 com EDTA 1,5mM. Uma fração de 50 μ L da amostra foi adicionada a 750 μ L de reagente de trabalho, contendo NADPH 0,15mM e TKF 0,15M (pH 7,0) e 100 μ L de H₂O. A análise cinética foi então iniciada em espectrofotômetro a 340nm durante 120 segundos, em intervalos de 30 segundos. Em seguida, adicionou-se o substrato glutathiona oxidada 20mM e continuou a leitura por mais 120 segundos, com intervalos de 30 segundos. A unidade

enzimática foi determinada pela oxidação de 1mol de NADPH por minuto e foi calculada com base na absorção do NADPH em 340nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificar a atividade da glutathiona-S-transferase

A atividade da glutathiona-S-transferase (GT) foi medida de acordo com o método proposto por Habig et al. (1974). Uma fração de 30 μ L da amostra foi adicionada a 240 μ L de solução TKF (100ml tampão fosfato de potássio monobásico; 100ml de tampão fosfato dibásico; pH 7,5) e 318 μ L de água mili-Q. Após homogeneização, acrescentou-se 6 μ L de GSH 100mM e 6 μ L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDBN) 100mM. A análise cinética foi medida espectrofotometricamente a 340nm durante 120 segundos, em intervalos de 30 segundos. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o coeficiente de extinção do CDNB. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificação de proteína pelo método de Bradford

A dosagem de proteína foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado na complexação de proteínas com Azul G Brilhante. Um volume de 2 μ L de sobrenadante, obtidos da ressuspensão do *pellet* de ME foram utilizados para a quantificação. Amostras em triplicatas foram colocadas em tubos para microcentrífuga, adicionando-se 500 μ L de NaCl 0,15M e 500 μ L do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi incubada por 5 minutos, sob agitação, e então, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de diluição padrão de BSA a 1mg/mL com 1, 3, 5, 7 e 10 μ g.

⁵⁰Sigma MO, USA.

Análise estatística

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados analisados pelo pacote estatístico *GraphPad Prism 5 for Windows* (GraphPad Software. La Jolla, CA, USA) e adotado nível de significância de 95%. Para determinar se os dados eram paramétricos (SOD, CAT, GPx, GR e GT), empregou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação das médias de Student-Newman-Keuls (SNK).

RESULTADOS

Efeito da MVIIA sobre a atividade da superóxido dismutase após o trauma medular

A atividade da SOD nos animais tratados com MVIIA ($188,41\% \pm 72,05$) foi 1,8 vezes superior ao PLA (100) ($p < 0,05$). Observamos assim que a MVIIA foi capaz de aumentar a atividade da primeira enzima da via detoxificação celular, com valores semelhantes ao SHAM ($143,07 \pm 56,02$) (Fig. 1).

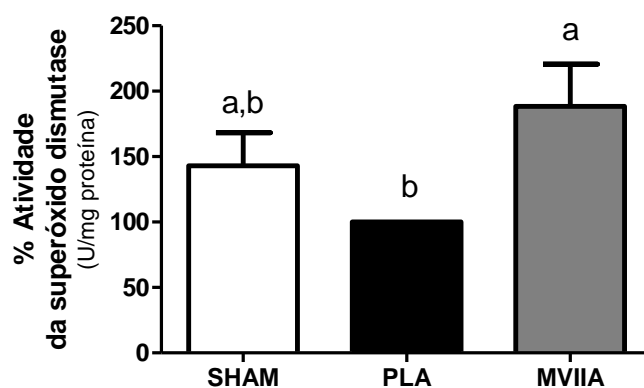


Figura 1 – Efeito da MVIIA sobre atividade da superóxido dismutase 48 horas após trauma medular em ratos. Representação gráfica dos grupos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA) e MVIIA. Dados normalizados em relação ao PLA (100). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Efeito da MVIIA sobre a atividade da catalase após o trauma medular

Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos. Os resultados

desse ensaio (valores médios \pm desvio padrão), em relação ao PLA (100), foram $107,40\% \pm 60,64$ e $95,42\% \pm 37,61$, respectivamente, para SHAM e MVIIA (Fig.2).

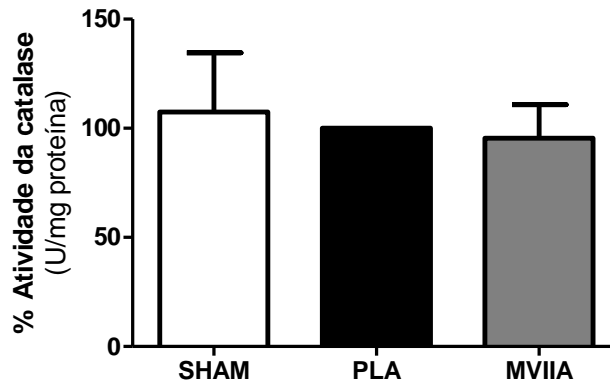


Figura 2 – Efeito da MVIIA sobre atividade da catalase 48 horas após trauma medular em ratos. Representação gráfica dos grupos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA) e MVIIA. Dados normalizados em relação ao PLA (100).

Efeito da MVIIA sobre a atividade da glutathiona peroxidase após o trauma medular

aumentar a atividade antioxidante celular em 1,9 vezes em relação ao PLA (100) ($p < 0,01$).

Como observado na figura 3, mais uma vez, a MVIIA ($199,96\% \pm 68,65$) foi capaz de

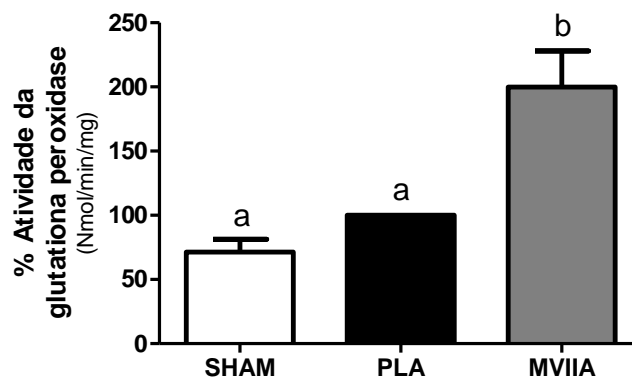


Figura 3 – Efeito da MVIIA sobre atividade da glutathiona peroxidase 48 horas após trauma medular em ratos. Representação gráfica dos grupos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA) e MVIIA. Dados normalizados em relação ao PLA (100). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,01$).

Efeito da MVIIA sobre a atividade da glutatona redutase após o trauma medular

A atividade da GR foi significativamente menor no grupo PLA do que no SHAM

(215,01% ± 58,54). Além disso, reforçando os resultados anteriores, a MVIIA (193,86% ± 59,39) eleva a atividade da GR 1,9 vezes em comparação ao grupo PLA (100) (p=0,002) (Fig. 4).

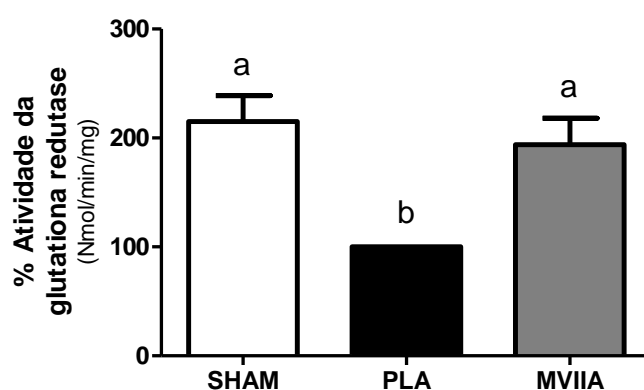


Figura 4 – Efeito da MVIIA sobre atividade da glutatona redutase 48 horas após trauma medular em ratos. Representação gráfica dos grupos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA) e MVIIA. Dados normalizados em relação ao PLA (100). Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; p<0,01).

Efeito da MVIIA sobre a atividade da glutathiona-S-transferase após o trauma medular

A MVIIA ($175,93\% \pm 68,92$) apresentou aumento da atividade da GT 1,7 vezes

maior em relação ao PLA (100) ($p=0,013$), diferindo também do SHAM ($119,12 \pm 8,46$) (Fig. 5).

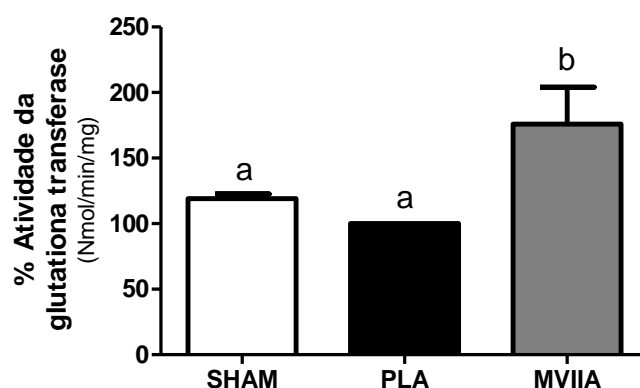


Figura 5 – Efeito da MVIIA sobre atividade da glutathiona-S-transferase 48 horas após trauma medular em ratos. Representação gráfica dos grupos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA) e MVIIA. Dados normalizados em relação ao PLA (teste Student-Newman-Keuls; $p<0,05$).

DISCUSSÃO

No presente estudo, testou-se, a eficácia protetora da MVIIA após lesão medular com resultados indicativos de propriedades antioxidantes. Tratamentos neuroprotetores têm sido relacionados ao potencial antioxidante de medicamentos (Taskiran et al., 2000; Erol et al., 2008; Serarslan et al., 2010) que levam a melhora neurológica em ratos (Cemil et al., 2010; Ba et al., 2013). Essa conotoxina de caramujos marinhos bloqueadora de canais para cálcio mostrou efeito neuroprotetor em lesões cerebrais isquêmicas (Valentino et al., 1993; Buchan et al., 1994; Bowersox et al., 1997; Perez-Pinzon et al., 1997; Berman et al., 2000) e traumáticas (Hovda et al., 1994; Verweij et al., 1997; Bowersox e Luther, 1998; Berman et al., 2000; Verweij et al., 2000), em isquemias (Burns et al., 1999) e trauma medular agudo (Capítulo 2), além de ser utilizada como potente analgésico em dores crônicas (Olivera et al., 1994; Greenberg,

1997; Bowersox e Luther, 1998; Souza et al., 2008; Hama e Sagen, 2009; Bingham et al., 2010; Souza et al., 2011, 2013). Assim, optou-se pela investigação das enzimas do sistema glutathiona, CAT e SOD por serem bons indicativos do *status* de defesa antioxidante do organismo, já que se encontram reduzidas após o trauma medular (Gariballa et al., 2002), na tentativa de neutralização da grande quantidade de radicais livres produzidos como ânion superóxido (Liu et al., 1998), peróxido de hidrogênio (Liu et al., 1999a), radical hidroxila (Liu et al., 2003) e peroxinitrito (Azbill et al., 1997; Liu et al., 2000; Ozdogan et al., 2006; Dasuri et al., 2013).

As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx participam da primeira linha de defesa celular contra superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), convertendo-os em compostos menos nocivos (Hayes e McLellan, 1999; Dasuri et al., 2013). Embora a maioria dos autores relate

redução significativa da atividade de SOD e GPx nos grupos controle positivo (PLA) com 24 horas (Kanter et al., 2006; Erol et al., 2008; Cemil et al., 2010; Aslan et al., 2012) ou até seis dias após o trauma medular em coelhos (Dong et al., 2000), foi constatado apenas uma diminuição não significativa de SOD no grupo PLA (100) quando comparado ao SHAM (143,07% ± 56,02) 48 horas após a lesão, em acordo com Ba et al. (2013).

O tratamento com MVIIA promoveu grande aumento da atividade da SOD e GPx em, respectivamente, 1,8 e 1,9 vezes superior ao PLA. No que se refere à CAT, não foram observadas diferenças possivelmente pela avaliação em 48 horas, concordando com Lavor (2013), e não em 24 horas como mostrado em alguns estudos tanto o aumento de sua atividade nos grupos submetidos ao trauma (Azbill et al., 1997; Aslan et al., 2012), como sua redução (Kanter et al., 2006; Cemil et al., 2010). Assim, sugere-se que a atividade antioxidante da MVIIA é parcialmente relacionada à regulação de SOD e GPx. A SOD é a primeira enzima da cascata de detoxificação, catalisando a conversão do radical O_2^- em H_2O_2 e molécula de oxigênio, enquanto a GPx realiza a redução do H_2O_2 e protege o tecido contra radicais hidroxilas (Hayes e McLellan, 1999).

Como as enzimas anteriores não neutralizam todas as ERO, esses ainda reagem com macromoléculas e geram produtos secundários a oxidação – GSSG - demandando detoxificação a fim de prevenir novos danos intracelulares e eventual morte celular (Hayes e McLellan, 1999). Assim, avaliou-se a segunda linha de defesa contra ERO realizada por enzimas além da GPx, a GR e GT. Corroborando os dados de Kamencic et al. (2001), observou-se diminuição da GR no grupo PLA e o tratamento com MVIIA possibilitou reestabelecer 90% da sua atividade em relação a esse grupo. A GR é responsável

pela regeneração do GSH através do GSSG formado na reação da redução de radicais livres da GPx e GT. Essa reciclagem se faz necessária já que o GSH é um importante antioxidante celular com função de limpar as ERO, radicais livres e metabólitos reativos (Gilbert et al., 1990; Valko et al., 2007), além de agir como substrato para antioxição e detoxificação da enzima GPx (Nogues et al., 2006). Estudos com terapias que promovam a síntese de GSH ou restaurem a atividade de enzimas GR após o trauma medular, têm mostrado preservação da função neurológica em ratos (Kamencic et al., 2001).

Além disso, a MVIIA foi capaz de aumentar em 70% a atividade de GT, uma das principais enzimas de defesa neuronal contra o peróxido de hidrogênio com capacidade peroxidase ao conjugar os peróxidos orgânicos a GSH e auxiliar a GPx dismutar o peróxido de hidrogênio, reduzindo dessa forma os danos gerados pelo estresse oxidativo (Hayes et al., 2005). Observando, assim, que a atividade antioxidante da MVIIA está relacionada, além da SOD e GPx, à regulação de GR e GT.

Sabe-se que quatro horas após a lesão, os níveis das ERO elevam em 48% na medula com lesão traumática. Entretanto, as moléculas de defesa são observadas apenas horas depois da formação de ERO (Azbill et al., 1997). A administração da MVIIA tornou o sistema de detoxificação celular mais eficiente, sugerindo que essa via possa ser uma das responsáveis pela redução de danos secundários e morte neuronal após o trauma medular observado no estudo anterior (Capítulo 2).

CONCLUSÃO

Os dados evidenciaram que a MVIIA foi capaz de modular positivamente a atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, glutathiona reductase e

glutathione-S-transferase quando aplicada via intratecal, em ratos, após o trauma medular. Esses resultados sustentam a hipótese de que a MVIIA possa ser usada como agente neuroprotetor no tratamento do trauma medular.

CAPÍTULO 4

Efeito da associação de bloqueadores de canais para cálcio, ω -conotoxina MVIIA e dantrolene, no trauma medular agudo

RESUMO

A concentração intracelular do cálcio é um importante mecanismo envolvido na cascata de eventos secundários ao trauma medular e pode estar transitoriamente elevada com influxo por canais permeáveis na membrana celular e pela mobilização de reservas intracelulares localizadas no retículo endoplasmático. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito da associação de bloqueadores de canais para cálcio por diferentes vias, a ω -conotoxina MVIIA e o dantrolene, na neuroproteção em ratos submetidos ao trauma medular agudo. Trinta e três ratos Wistar foram alocados aleatoriamente em cinco grupos: SHAM (n=6), PLA (n=7), MVIIA (10 μ M, via intratecal, n=7), dantrolene (10mg/kg, via intraperitoneal, n=7) e MVIIA associado ao dantrolene (n=6). Quarenta e oito horas após o trauma, coletaram-se o líquido cerebrospinal, para quantificação de glutamato, e o epicentro e região adjacente caudal da lesão para avaliar a morte celular, viabilidade mitocondrial, estresse oxidativo e atividade antioxidante. Os resultados mostraram que a MVIIA apresentou efeito neuroprotetor aplicada isoladamente, com redução da morte celular (22,57% \pm 3,62), do estresse oxidativo e aumento das propriedades antioxidantes. O dantrolene sozinho apenas diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (56,23% \pm 23,43), sendo insuficiente para melhorar a preservação celular. Na associação da MVIIA com dantrolene, não houve redução da morte neuronal significativa (82,70% \pm 17,02), apesar da diminuição das ERO (68,34% \pm 17,33) e aumento da atividade da glutatona redutase (229,18% \pm 116,58). Portanto, a associação MVIIA e dantrolene não apresentou efeito de adição farmacológica no tratamento do trauma medular agudo.

Palavras chave: MVIIA, dantrolene, associação, trauma medular, ratos.

INTRODUÇÃO

A fisiopatologia do trauma medular agudo (TMA) inclui danos primários e secundários. A lesão primária é causada pelo impacto mecânico e resulta rapidamente no estresse oxidativo. Já a lesão secundária ao trauma inicial constitui diversas alterações patológicas como edema, distúrbios eletrolíticos e do metabolismo energético, mudanças bioquímicas, no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular (Tator e Fehlings, 1991; Grill, 2005; Rowland et al., 2008).

O influxo de cálcio tem sido considerado um evento chave na patogênese de injúrias secundárias traumáticas e isquêmicas do sistema nervoso central, o qual pode levar a ativação de proteases (Li et al., 1999), danos mitocondriais (Agrawal e Fehlings, 1997) e elevação da produção de radicais livres (Patel et al., 2010). A concentração intracelular do cálcio pode ser transitoriamente elevada por dois mecanismos: o influxo do cálcio por canais permeáveis na membrana celular e pela mobilização de reservas intracelulares de cálcio, localizadas no retículo endoplasmático (RE) (Mattson et al., 2000; Yoo et al., 2000). Estudos mostraram que o bloqueio de canais para cálcio podem levar a neuroproteção pela redução do aumento do cálcio intracelular e, conseqüentemente, de seus efeitos deletérios (Lee et al., 2009; Vaishnav et al., 2010; Liu et al., 2013).

Dentre os bloqueadores de canais para cálcio, a MVIIA é uma toxina que atua reversivelmente nos canais para cálcio voltagem dependente (CCVD) tipo N, amplamente utilizada como analgésico em dores crônicas graves (Nadasdi, 1995; Lewis et al., 2000). Ela é capaz de inibir, em sinaptossomas, a liberação de diferentes neurotransmissores, como norepinefrina (Gaur et al., 1994; Bowersox et al., 1995; Ghosh e Greenberg, 1995; Igelmund et al., 1996) e glutamato (Gonçalves et al., 2011),

essenciais no desenvolvimento da lesão espinhal secundária (Olivera et al., 1994; Uchitel, 1997; Minami et al., 2001). Além disso, no estudo anterior com aplicação da MVIIA após o trauma medular, observou-se efeito neuroprotetor com redução do estresse oxidativo, morte neuronal (Capítulo 2) e aumento da atividade antioxidante (Capítulo 3).

Embora a MVIIA tenha apresentado neuroproteção significativa, sabe-se que o influxo do cálcio ocorre por outras vias além dos CCVD, como pela mobilização de reservas intracelulares. Um dos bloqueadores de reservas intracelulares de cálcio do receptor de rianodina, o qual também inibe o influxo de cálcio pelos canais N-metil-D-aspartato (NMDA), é o dantrolene (Makarewicz et al., 2003). Ele é usado clinicamente em hipertermia maligna, espasmos musculares (Inan e Wei, 2010) e tem mostrado resultados neuroprotetores após o trauma medular, com diminuição do estresse oxidativo (Aslan et al., 2009), preservação celular e melhora clínica (Costa, 2010; Torres et al., 2010; Lavor, 2013). Em estudos de isquemia cerebral, o dantrolene também foi capaz de reduzir a liberação excessiva do glutamato (Frandsen e Schousboe, 1991; Nakayama et al., 2002).

Devido à complexidade da fisiopatologia do trauma medular, o uso de tratamentos associados tem crescido visando melhores respostas neuroprotetoras (Lu et al., 2003; Nikulina et al., 2004; Pearse et al., 2004; Fouad et al., 2005; Arvanian et al., 2006). Assim, objetivou-se avaliar se a associação de dois potentes bloqueadores de canais para cálcio, a MVIIA e o dantrolene, auxiliaria no equilíbrio iônico do cálcio, proporcionando maior sobrevivência neuronal após o trauma medular agudo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências físicas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária (EV) e no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Seguiu-se os princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (projeto aprovado sob protocolo 226/2012, anexo 1).

Animais

Trinta e três ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, com três meses de idade e peso médio de 274g (\pm 16,02), provenientes da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram mantidos na Escola de Veterinária da 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 roedores⁵¹ e água *ad libitum* por todo o período. Além disso, antes do início do experimento, foram desverminados com tiabendazol⁵² (100mg/kg, VO) e submetidos a 14 dias de aclimação.

Medicamentos

A MVIIA⁵³ foi reconstituída, de acordo com indicação comercial, em PBS estéril e centrifugada para dissolução completa. Posteriormente, foi alíquotada em tubos para microcentrífugas e armazenada a -20°C até o uso.

⁵¹ Nuvilab CR-1® – Nuvital Nutrientes S/A. Colombo, PR, Brasil.

⁵² Thiaben® - Uci-Farma. São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

⁵³ Conotoxin MVIIA (ω-)® - Latoxan. Valence, France.

O dantrolene sódico⁵⁴ foi reconstituído de acordo com indicação comercial, adicionando 60ml do seu próprio diluente apenas no momento de aplicação.

Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais receberam antibiótico de forma profilática, cefalotina sódica⁵⁵ (60mg/kg, SC), e sulfato de morfina⁵⁶ (2,5mg/kg, SC) como medicação pré-anestésica, 20 minutos antes da cirurgia. Em seguida, realizou-se a indução anestésica em câmara com isoflurano⁵⁷, e manutenção do plano anestésico cirúrgico com mesmo agente, fornecido por meio de máscara facial em sistema de não-reinalação.

Após a tricotomia da região dorsal, os ratos foram fixados em decúbito esternal em uma superfície de vidro e posicionados no aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFMG (Torres et al., 2010; Oliveira et al., 2014; Rosado et al., 2014). Esse aparelho consta de uma prancha de polietileno perfurada, com elevação em relação à superfície, aderida a um eixo, no qual se encaixa um suporte removível com uma haste de aço inoxidável (0,5g) acoplada a um peso de 40g. Posteriormente à antisepsia com iodopovidona degermante⁵⁸ e solução de álcool iodado⁵⁹, foram realizadas incisões cutânea e subcutânea na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica a primeira lombar, e dos músculos epiaxiais, afastando-os lateralmente. Realizou-se a osteotomia do processo espinhoso da

⁵⁴ Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁵⁵ Keflin® - ABL, Antibióticos do Brasil Ltda. Cosmópolis, SP, Brasil.

⁵⁶ Tramadol – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁵⁷ Isoflurane - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁵⁸ Biotrat® - LMFarma. São José dos Campos, SP, Brasil.

⁵⁹ Riodene- Álcool Iodado Rioquímica indústria farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil.

vértebra torácica número 12, com auxílio da pinça de Kocher, seguida da remoção da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico⁶⁰ e pinça hemostática de Halsted, sob irrigação intermitente com solução fisiológica⁶¹. O trauma mecânico foi obtido pela compressão da medula espinhal (ME) com peso de 40,5g mantido sobre a dura-máter exposta, durante cinco minutos (0,5g da haste somado ao peso de 40g). Após o tratamento, realizou-se a aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto empregando-se sutura padrão simples contínua com fio inabsorvível sintético, polipropileno 3-0⁶². A dermorrafia foi feita com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio.

Após a cirurgia, todos os animais receberam solução de NaCl 0,9%, na taxa de manutenção (15ml/kg), via SC. Os animais foram mantidos em caixas aquecidas, à temperatura de 37°C, com oxigenoterapia até completa recuperação anestésica. No pós-operatório, foi realizada analgesia com sulfato de morfina⁶³ (2,5mg/kg, SC, q4h) no dia da cirurgia e cloridrato de tramadol⁶⁴ (5mg/kg, SC, q8h) nos dias subsequentes; antibioticoterapia com cefalexina⁶⁵ (60mg/kg, VO, q12h) e massagem abdominal para esvaziamento vesical, três vezes ao dia, até a eutanásia.

Tratamentos

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos: controle negativo

(SHAM; n=6), placebo (PLA – PBS estéril; n=7), MVIIA (n=7), dantrolene (DANT; n=7) e MVIIA+DANT (n=6). No SHAM foi realizado somente laminectomia. O DANT recebeu o tratamento por via intraperitoneal, na dose de 10mg/kg, 60 minutos após o trauma medular, como descrito por Torres et al. (2010) e Torres et al. (2011). O grupo MVIIA, quatro horas após o trauma, recebeu 10µM MVIIA por via IT, dose determinada em estudo prévio (Capítulo 2). Já o grupo MVIIA+DANT recebeu o dantrolene e MVIIA uma e quatro horas após o trauma medular pelas vias citadas anteriormente, respectivamente.

A aplicação da MVIIA foi realizada de acordo com metodologias previamente descritas (Mestre et al., 1994). Administrou-se o volume de 10µL com microseringa de Hamilton de 10µL, enquanto os ratos eram gentilmente contidos com auxílio de uma compressa. O ligeiro movimento da cauda (“*flick*”) indicava a perfuração da duramater e o local exato da aplicação.

Avaliação da capacidade motora

A avaliação da capacidade motora foi realizada 24 horas antes da intervenção cirúrgica e diariamente, após a cirurgia, adotando-se a escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996). Para tanto, observou-se o padrão locomotor dos animais em 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 dos animais, atribuindo um escore que variava de zero a 21 (Anexo 2).

⁶⁰With ECCOS® Aesculap – Laboratórios B. Braun S.A. São Gonçalo, RJ, Brasil.

⁶¹Cloreto de sódio 0,9% – Laboratório Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG, Brasil.

⁶²Prolene® – Ethicon Endo Surgery. São Paulo, SP, Brasil.

⁶³Morfina 10mg/mL – Produto genérico, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

⁶⁴Tramadol® – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁶⁵Cefalexina suspensão® – Medley S.A. Indústria farmacêutica. Sumaré, SP, Brasil.

Coleta de amostra do líquido cerebrospinal

Após 48 horas do trauma, os animais foram pré-medicados com cloridrato de xilazina⁶⁶ (8mg/kg, IP) e submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico⁶⁷ (100mg/kg, IP). Em seguida, a cabeça dos animais foi flexionada ventralmente para facilitar a punção do espaço atlantoccipital e coleta de 50 a 80µL de líquido cerebrospinal. Para dosar o glutamato, realizou-se o ensaio enzimático, onde o neurotransmissor liberado pelas células sofre oxidação pela enzima GDH. O NADP⁺ é o aceptor do elétron desprendido que ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360nm, emite luz no comprimento de onda de 450nm, detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro⁶⁸. Dessa maneira, pode-se quantificar o neurotransmissor excitatório liberado (Nicholls et al., 1987; Romano-Silva et al., 1993).

Para o ensaio, foram adicionados 1,8mL de solução de incubação KRH (*Krebs Ringer Hepes*) sem cálcio (124mM NaCl; 4mM KCl; 1,2mM MgSO₄; 10mM HEPES)⁶⁹, 5µL de NADP (1mM), 22µL de GDH, 5µL da amostra e 5µL de glutamato padrão. As adições dos reagentes foram realizadas, respectivamente, nos tempos 0s, 0s, 70s, 170s, 500s, finalizando o procedimento com 600s.

Determinação da viabilidade celular

Dois métodos de avaliação da viabilidade celular foram utilizados e estão descritos a seguir. Após a eutanásia, coletou-se fragmento da ME no epicentro da lesão, em torno de 6mm, que foi subdividido em cranial

para avaliação da viabilidade mitocondrial e caudal para morte celular.

-Viabilidade mitocondrial

No método bioquímico de viabilidade celular empregado foi utilizado o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) como marcador da atividade mitocondrial. A redução desse composto resulta na formação do formazan trifenílico insolúvel, dependente da atividade respiratória mitocondrial, o qual se deposita nas células com mitocôndrias ativas e propicia análises quantitativas das células viáveis (Straus et al., 1948; Glenner, 1969 citado por Watson et al., 1994). O segmento medular coletado foi imerso em fluido cerebrospinal artificial resfriado por cinco minutos e submetido a cortes de 400µm com auxílio de cortador de tecido⁷⁰. As fatias foram incubadas em 1,5ml de solução de TTC a 2%, por 90 minutos a 37°C. Em seguida, o TTC foi removido, o tecido lavado com solução NaCl 0,9% e, então transferido para solução de etanol e dimetilsulfóxido⁷¹ (DMSO) na proporção 1:1, durante 48 horas a temperatura ambiente com proteção a luz, para solubilização do formazan. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda de 485nm e os resultados normalizados pelo peso do tecido.

-Morte celular

Como outra via de avaliação da viabilidade celular, utilizou-se a marcação com 2mM de etídeo homodímero-1⁷². Esse composto é um fluorocromo impermeável que ao passar apenas pelas membranas não funcionais, emite uma fluorescência vermelha detectada na microscopia de fluorescência, determinando a morte celular.

⁶⁶Virbaxyl® 2%, Virbac – Saúde Animal. São Paulo, SP, Brasil.

⁶⁷Cobas Mira® - Roche. Jacarepaguá, RJ, Brasil.

⁶⁸Spectrofluorophotometer (RF-5301 PC), Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão.

⁶⁹Sigma MO, USA.

⁷⁰McIlwain Tissue Chopper - Brinkman Instruments Inc., UK.

⁷¹Sigma MO, USA.

⁷²Live/dead – Viability/cytotoxicity Kit L-3224 – Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

As fatias de 400µm foram coradas com 3µL de etídeo homodímero-1 (concentração 6µM) diluídos em 1mL de meio de incubação aerado previamente com mistura carbogênica, mantidas por 30 minutos, a temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, foram lavadas com 2mL de meio de incubação aerado por 15 minutos. Ao término da lavagem, analisaram-se as fatias utilizando o microscópio Axiovert Zeiss 200M acoplado ao sistema APOTOME.

No microscópio foram adquiridas imagens de secções ópticas consecutivas ao longo do eixo Z, com espessura de 10µm, com comprimento de onda de excitação de 568nm para o etídeo homodímero e emissão em 598/40nm. As imagens foram adquiridas com saturação da fluorescência, com a objetiva de 20 vezes. Foi utilizada lâmpada de mercúrio HBO. Estes parâmetros foram mantidos em todos os experimentos. Foram observados dois campos da região do funículo lateral da substância cinzenta.

Para a realização da análise quantitativa, utilizou-se o programa de imagens ImageJ⁷³, as quais foram processadas através de um filtro de ajuste de pixels pela mediana, com o intuito de reduzir possíveis interferências de ruído e obter os histogramas das respectivas imagens. Com o histograma foi determinado o valor do limiar basal da fluorescência. Após esse processamento da imagem, a região medular foi selecionada com uma área pré-determinada e, assim, realizada a quantificação do número de células mortas presentes.

⁷³Image Processing and analysis in JAVA, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

Determinação das espécies reativas de oxigênio

Os níveis de diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA) foram determinados como um indicador da produção de peróxido dos componentes celulares. Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCF-DA e a sua oxidação subsequente por espécies reativas de oxigênio (ERO), gerando um composto altamente fluorescente (Jakubowski e Bartosz, 2000). O segmento caudal ao epicentro foi coletado e imediatamente refrigerado a -20°C em solução tampão TRIS-HCl (10mM; pH7,4). Após homogeneização, foi submetido à centrifugação (10000g, 5°C, 10min) e uma alíquota de 20µL desse sobrenadante foi adicionada a 80 µL DCF-DA 125µM. A placa em triplicata foi incubada no escuro durante 1h a 37°C até o momento da mensuração da fluorescência (488/525nm) no aparelho Victor X4⁷⁴. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Determinação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi determinada pela quantificação do conteúdo de malondialdeído presente no sobrenadante do homogenato, por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico (TBA) em altas temperaturas. Este método consiste na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea que é quantificado no espectrofotômetro. O ensaio para avaliar a lipoperoxidação foi realizado de acordo com a metodologia descrita Ohkawa et al. (1979).

O segmento caudal ao epicentro foi coletado e imediatamente imerso em solução tampão TRIS-HCl⁷⁵ (10mM;

⁷⁴Perkin-Elmer.

⁷⁵Sigma MO, USA.

pH7,4) na proporção de 1:10. Após manutenção em freezer a -20°C, a amostra foi homogeneizada no sonicador⁷⁶ (3 ciclos de 4s cada) e o homogenato centrifugado a 2500g, 4°C por 10min. Pipetou-se inicialmente 134µL do TBA 0,8%, 134µL de tampão ácido acético (125ml H₂O; 18,84ml de ácido acético glacial; 5,63ml de HCl 12N P.A.; pH3,4) e 54µL H₂O. No momento da incubação, adicionou-se 54µL da amostra e 54µL SDS 8,1% (dodecil sulfato de sódio), deixando-os por 90min a 95°C. O conteúdo de MDA foi medido no comprimento de onda de 532nm e os resultados normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificar a atividade da glutaciona peroxidase

A dosagem da atividade da glutaciona peroxidase (GPx) foi realizada de acordo com o método proposto por Paglia e Valentine (1967). Uma solução de reação foi preparada com os seguintes componentes: 3,12g de NADPH, 10µL de glutaciona redutase (500U/mg proteína/mL), 250µL de NaN₃ 100 mM; 7,68g de glutaciona reduzida em 20mL de tampão fosfato 100mM pH 7,0 com 5mM de EDTA. Na cubeta de acrílico foram pipetados 510µL da solução de reação, 30µL de água mili-Q e 30µL do homogenato. A reação enzimática começou pela adição de 60µL de H₂O₂ 4mM. A conversão do NADPH a NADP foi medida espectrofotometricamente por absorção a 340nm por 5 minutos. A unidade enzimática foi determinada pela oxidação de 1mol de NADPH por minuto e foi calculada baseado na absorção do NADPH em 340nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificar a atividade da glutaciona redutase

A dosagem da atividade da glutaciona redutase (GR) foi realizada de acordo com o método proposto por Aebi (1984). Uma solução de reação foi preparada com 2,13mg de NADPH em 20mL de tampão fosfato 150mM, pH 7,0 com EDTA 1,5mM. Uma fração de 50µL da amostra foi adicionada a 750µL de reagente de trabalho, contendo NADPH 0,15mM e TKF 0,15M (pH 7,0) e 100µL de H₂O. A análise cinética foi então iniciada em espectrofotômetro a 340nm durante 120 segundos, em intervalos de 30 segundos. Em seguida, adicionou-se o substrato glutaciona oxidada 20mM e continuou a leitura por mais 120 segundos, com intervalos de 30 segundos. A unidade enzimática foi determinada pela oxidação de 1mol de NADPH por minuto e foi calculada com base na absorção do NADPH em 340nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Ensaio para quantificar a atividade da glutaciona-S-transferase

A atividade da glutaciona-S-transferase (GT) foi medida de acordo com o método proposto por Habig et al. (1974). Uma fração de 30µL da amostra foi adicionada a 240µL de solução TKF (100ml tampão fosfato de potássio monobásico; 100ml de tampão fosfato dibásico; pH 7,5) e 318µL de água mili-Q. Após homogeneização, acrescentou-se 6µL de GSH 100mM e 6µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDBN) 100mM. A análise cinética foi medida espectrofotometricamente a 340nm durante 120 segundos, em intervalos de 30 segundos. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o coeficiente de extinção do CDNB. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

⁷⁶Branson modelo Sonifier 250, St. Louis – MO, USA.

Ensaio para quantificação de proteína pelo método de Bradford

A dosagem de proteína foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado na complexação de proteínas com Azul G Brilhante. Um volume de 2µL de sobrenadante, obtidos da ressuspensão do *pellet* de ME foram utilizados para a quantificação. Amostras em triplicatas foram colocadas em tubos *para microcentrífuga*, adicionando-se 500µL de NaCl 0,15M e 500µL do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi incubada por 5 minutos, sob agitação, e então, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de diluição padrão de BSA a 1mg/mL com 1, 3, 5, 7 e 10µg.

Análise estatística

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados analisados pelo pacote estatístico *GraphPad Prism 5 for Windows* (*GraphPad Software*. La Jolla, CA, USA) e adotado nível de significância de 95%. Para determinar se os dados eram paramétricos (concentração de glutamato no líquido cerebrospinal, viabilidade mitocondrial, morte celular, ERO, peroxidação lipídica, glutathione peroxidase, glutathione redutase e glutathione-S-transferase), empregou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação das médias de Student-Newman-Keuls (SNK). Para avaliação da capacidade motora, expressa em escores, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn.

RESULTADOS

Os animais e o trauma medular

Não foram observados distúrbios comportamentais como alteração do apetite ou diminuição na ingestão de água, sinais que seriam condizentes com dor, mostrando que o protocolo de analgesia preventiva e pós-operatória foi adequado. Além disso, alterações decorrentes da cirurgia como infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica não foram constatadas.

O modelo de lesão medular aguda experimental aplicado possibilitou a reprodução de trauma de fácil execução, baixo custo e padronizado. A utilização do peso de 40,5g diretamente sobre a duramáter na região vertebral de T12, por cinco minutos, causou trauma com intensidade moderada a grave.

Complicações do trauma medular – retenção urinária

Dos grupos submetidos ao trauma medular, 100%, 45%, 83,33% e 100% dos animais tratados com PLA, MVIIA, DANT e MVIIA+DANT, respectivamente, apresentaram retenção urinária. Sendo que apenas nos grupos PLA e MVIIA+DANT foi observado esse quadro clínico associado à hematúria (63% e 16,66%).

Avaliação da capacidade motora

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade, representado pelo escore 21 na escala BBB. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, não houve diferença entre os grupos submetidos ao trauma (PLA, $1,22 \pm 0,67$; MVIIA, $2,25 \pm 1,28$; DANT, $1,86 \pm 1,46$; MVIIA+DANT, $1,5 \pm 0,84$), o que mostra padronização da lesão para avaliação dos tratamentos. Considerou-se a lesão como grau moderado a grave categorizado pela

discreta movimentação de uma ou duas articulações (escore 1) ou ampla de uma articulação (escore 2). Além disso, os animais do grupo SHAM mantiveram o

escore máximo no teste após procedimento cirúrgico, indicando que a laminectomia não causou lesão ao tecido medular (Fig. 1).

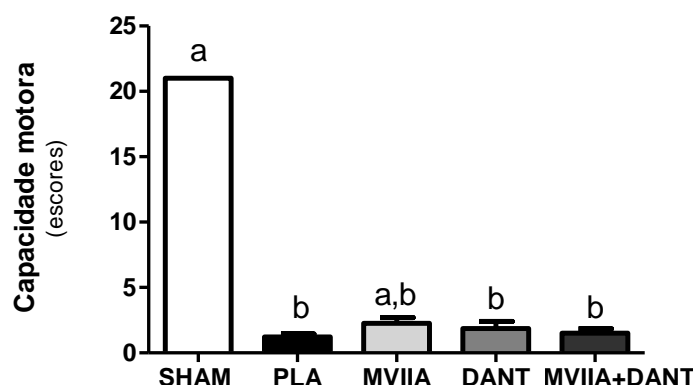


Figura 1 – Avaliação da capacidade motora após trauma medular em ratos tratados com MVIIA, dantrolene e sua associação. Gráfico do escore BBB (média \pm desvio padrão médio) de deambulação em campo aberto, 24 horas após o procedimento cirúrgico, de ratos submetidos à laminectomia (controle negativo - SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,01$).

Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação na liberação de glutamato após o trauma medular

Não foram observadas diferenças significativas na redução do glutamato 48 horas após o procedimento cirúrgico. Os

valores médios (\pm desvio padrão) da concentração de glutamato no líquido cerebrospinal, em relação ao PLA (100; $n=6$) foram: 52,6% \pm 14,81 (SHAM; $n=4$), 74,84% \pm 24,10 (MVIIA; $n=7$), 103,31% \pm 70,37 (DANT; $n=5$) e 91,58% \pm 20,94 (MVIIA + DANT; $n=6$) (Fig. 2).

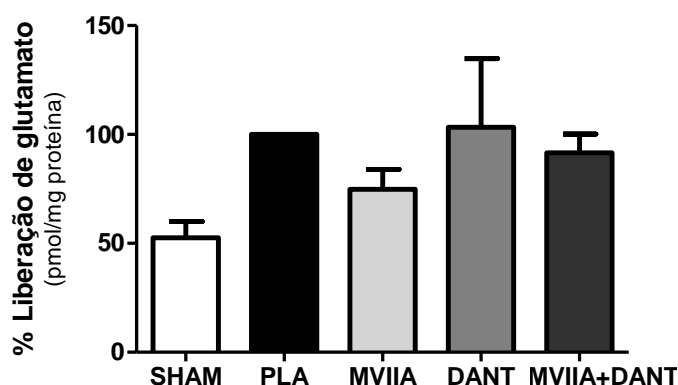


Figura 2 – Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a liberação do glutamato 48 horas após trauma medular em ratos. Concentração de glutamato no líquido cerebrospinal (média \pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Dados normalizados em relação ao PLA (100) (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Avaliação da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre a viabilidade celular após o trauma medular

A) Avaliação da viabilidade mitocondrial

O grupo MVIIA apresentou preservação celular significativa 1,7 vezes maior quando comparado ao PLA (100) ($p < 0,05$). DANT

isolado ($89,66\% \pm 30,91$) e em associação a MVIIA ($79,51\% \pm 25,77$) foram semelhantes ao PLA, com diferença relativa apenas ao SHAM ($223,61\% \pm 28,24$) ($p < 0,01$) e a MVIIA ($172,55\% \pm 109,62$) ($p < 0,05$) (Fig. 3).

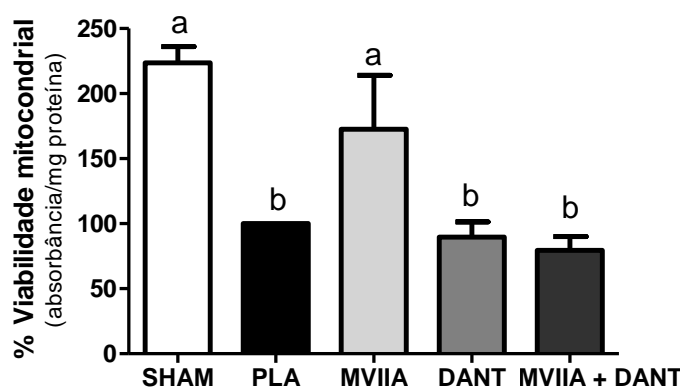


Figura 3 – Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a viabilidade mitocondrial 48 horas após trauma medular em ratos. Média da viabilidade mitocondrial (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

B) Avaliação da morte celular

Na comparação das médias de morte celular, houve diferença entre os grupos submetidos ao trauma e o controle negativo (SHAM; $37,01\% \pm 15,31$) ($p < 0,001$). O grupo MVIIA foi o único capaz de reduzir a

morte celular ($22,57\% \pm 3,62$) em comparação com PLA (100) ($p < 0,05$). Os outros valores desse ensaio foram (média \pm desvio padrão): $90,15\% \pm 15,02$ (DANT) e $82,70\% \pm 17,02$ (MVIIA + DANT) (Fig.4).

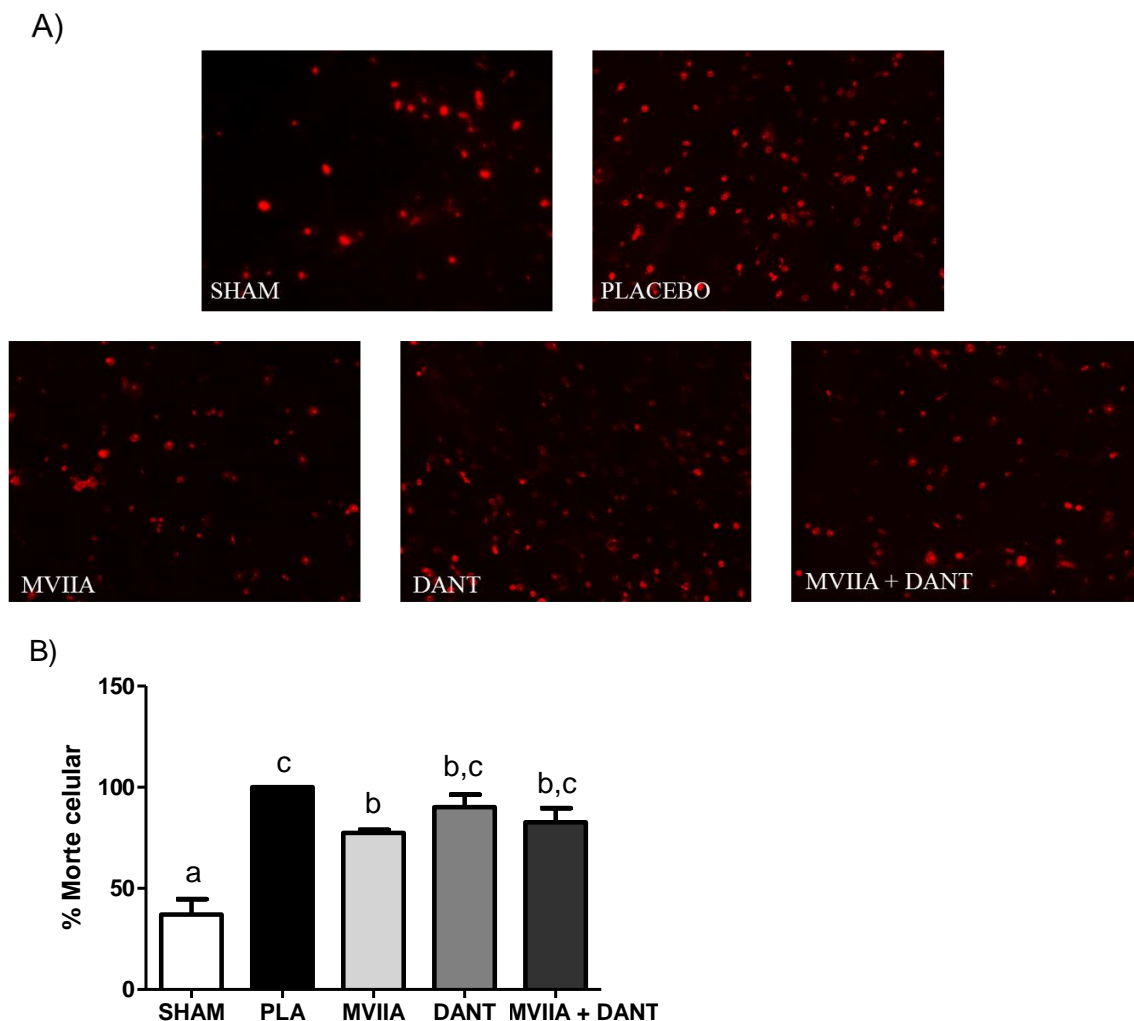


Figura 4 – Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a morte celular 48 horas após trauma medular em ratos. A) Imagens representativas do funículo lateral de fatias medulares, coradas com o marcador etídeo homodímero, de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. B) Média do número de células mortas (\pm desvio padrão médio) por campo coradas com etídeo homodímero na medula espinal nos grupos SHAM, PLA, MVIIA, DANT e MVIIA+DANT. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre as espécies reativas de oxigênio após o trauma medular

Na figura 5, observa-se que os grupos submetidos ao trauma e tratados com MVIIA ($21,50\% \pm 11,62$), dantrolene ($56,23\% \pm 23,43$) ou sua associação ($68,34\% \pm 17,33$) foram capazes de reduzir

a formação das ERO quando comparado ao PLA (100) ($p < 0,01$). O grupo MVIIA reduziu tanto a ERO que também diferiu do SHAM. Além disso, notou-se que, 48 horas após o trauma medular, os níveis do PLA permanecem elevados, diferindo-se do controle negativo (SHAM; $57,33\% \pm 29,56$) ($p < 0,01$). Dados normalizados em relação ao PLA (100).

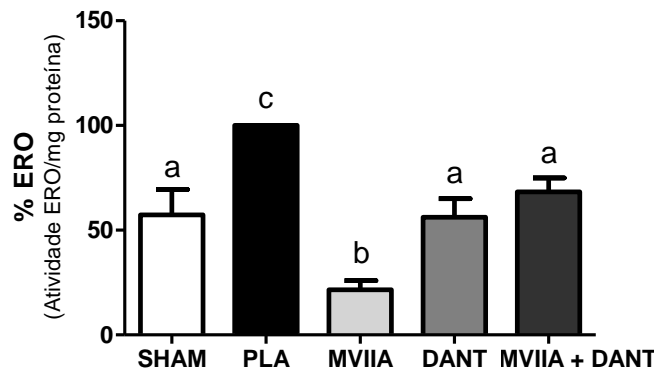


Figura 5 – Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre produção de espécies reativas de oxigênio 48 horas após trauma medular em ratos. Média da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,01$).

Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre a lipoperoxidação após o trauma medular

Apenas o grupo MVIIA foi capaz de reduzir a lipoperoxidação 2,34 vezes (42,69% \pm 12,38) quando comparado ao

PLA (100) ($p < 0,05$), igualando-se ao SHAM. Os resultados desse ensaio foram (média \pm desvio padrão): 32,17% \pm 10,84 (SHAM), 114,36% \pm 84,94 (DANT) e 51,53% \pm 17,87 (MVIIA + DANT). Dados normalizados em relação ao PLA (100) (Fig. 6).

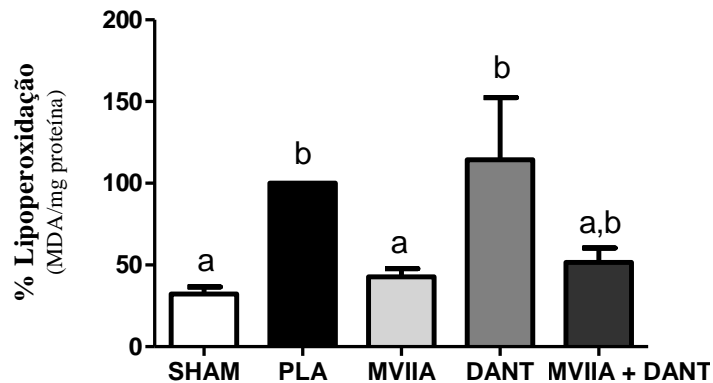


Figura 6 – Efeito da MVIIA e dantrolene, isolados ou em associação, sobre a lipoperoxidação 48 horas após trauma medular em ratos. Média da lipoperoxidação (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre a atividade da glutathiona peroxidase após o trauma medular

Apenas o grupo MVIIA (199,96% ± 68,65) foi capaz de aumentar a atividade antioxidante celular em 1,9 vezes em

relação ao PLA (100) ($p < 0,01$). E os demais grupos foram semelhantes entre si (Fig. 7). Os demais resultados desse ensaio foram (média ± desvio padrão): 71,36% ± 22,23 (SHAM), 94,82% ± 15,49 (DANT) e 126,03% ± 26,02 (MVIIA + DANT).

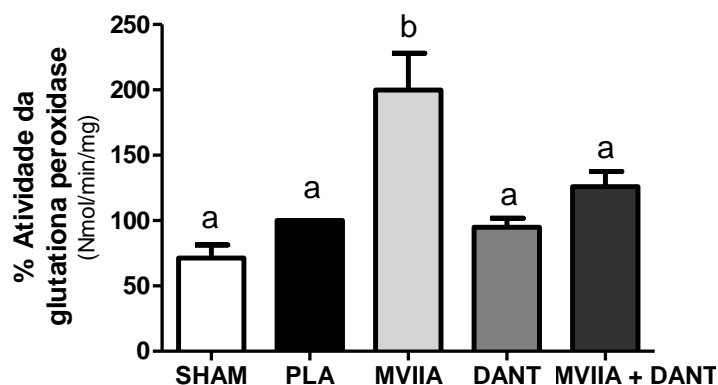


Figura 7 – Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre atividade da glutathiona peroxidase 48 horas após trauma medular em ratos. Média da atividade da glutathiona peroxidase (± desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,01$).

Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre a atividade da glutathiona redutase após o trauma medular

A atividade da GR foi significativamente menor no grupo PLA do que no SHAM (215,01% ± 58,54) ($p < 0,001$). Além disso, reforçando os resultados anteriores, a

MVIIA (193,86% ± 59,39) eleva a atividade da GR 1,9 vezes em comparação ao grupo PLA (100) ($p < 0,01$). Já o grupo DANT (130,27% ± 26,29) não foi capaz de aumentar a atividade de GR, apenas quando associado à MVIIA (229,18% ± 116,58) ($p < 0,01$) (Fig. 8).

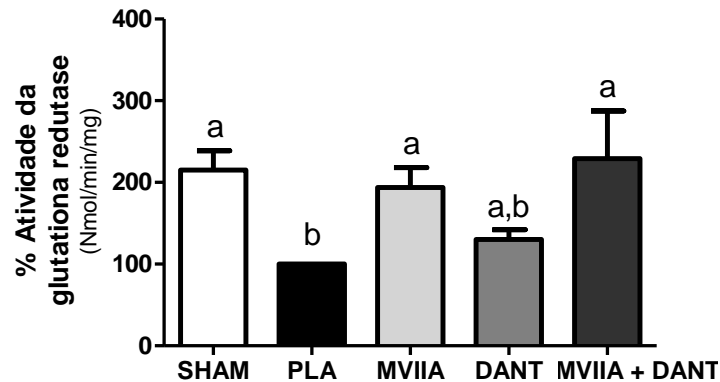


Figura 8 – Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre atividade da glutatona redutase 48 horas após trauma medular em ratos. Média da atividade da glutatona redutase (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,01$).

Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre a atividade da glutatona-S-transferase após o trauma medular

Apenas o grupo MVIIA ($157,78\% \pm 61,81$) foi capaz de aumentar a atividade da GT 1,5

vezes em relação ao PLA (100) ($p=0,0189$). O grupo DANT isolado ($108,91\% \pm 31,18$) ou em associação a MVIIA ($148,86\% \pm 30,85$) não diferiu do PLA, assemelhando-se ao SHAM ($106,83\% \pm 7,58$) (Fig. 9).

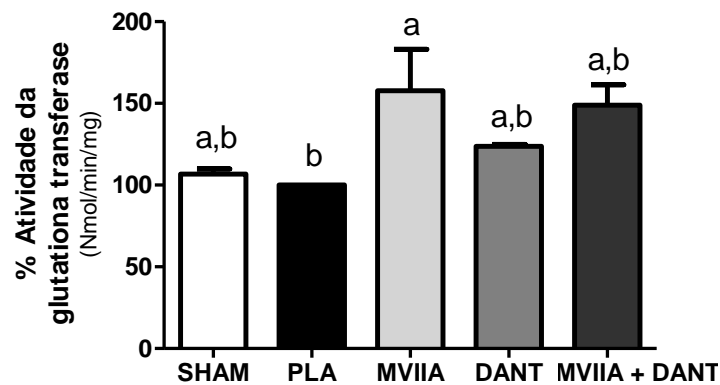


Figura 9 – Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre atividade da glutatona-S-transferase 48 horas após trauma medular em ratos. Média da atividade da glutatona-S-transferase (\pm desvio padrão médio) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (SHAM) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (PLA), MVIIA, dantrolene (DANT) e MVIIA + DANT. Dados normalizados em relação ao PLA. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,01$).

DISCUSSÃO

A MVIIA e o dantrolene

Diversos estudos experimentais têm mostrado melhora com aplicação de bloqueadores de canais para cálcio após a lesão neuronal, já que seu aumento exacerbado no meio intracelular é um importante mecanismo envolvido na morte celular (Choi, 1992; Lanz et al., 2000; Emmez et al., 2010; Gensel et al., 2012; Simard et al., 2012). Progressos moderados têm ocorrido, porém devido a multiplicidade fisiopatológica da lesão, considera-se que o uso de medicações associadas (Pointillart et al., 2000; Lu et al., 2003; Nikulina et al., 2004; Pearse et al., 2004; Fouad et al., 2005; Chen et al., 2013; Zhao et al., 2013), com enfoque em medicamentos neuroprotetores, regenerativos e reabilitadores (Rowland et al., 2008), possam aumentar as chances da terapia adequada. Neste contexto, realizou-se a associação de diferentes bloqueadores de canais para cálcio, a ω -conotoxina MVIIA e o dantrolene, após o TMA em ratos.

Estudos indicam que tanto a MVIIA (Bowersox et al., 1997; Perez-Pinzon et al., 1997; Verweij et al., 1997; Verweij et al., 2000) quanto o dantrolene (Zhang et al., 1993; Tasker et al., 1998; Niebauer e Gruenthal, 1999; Aslan et al., 2009; Muehlschlegel e Sims, 2009; Costa, 2010; Torres et al., 2010, 2011) são potencialmente benéficos na prevenção da lesão neuronal. A inibição do influxo de cálcio no CCVD pela MVIIA (Bowersox et al., 1997; Perez-Pinzon et al., 1997; Verweij et al., 1997; Verweij et al., 2000) ou a inibição do influxo no NMDA (Obenaus et al., 1989; Ziemska et al., 2001; Makarewicz et al., 2003; Salinska et al., 2008) e inibição do efluxo desse íon nos receptores de rianodina pelo dantrolene são correlacionadas a neuroproteção (Ward et al., 1986; Li et al., 2005; Aslan et al., 2009;

Nagarkatti et al., 2010; Torres et al., 2010). Todavia, a hipótese desse trabalho, baseada no possível efeito benéfico dessa associação, não apresentou resultados favoráveis no TMA.

Efeito da MVIIA, dantrolene e sua associação sobre eventos secundários ao trauma medular

Os achados nesse experimento são consistentes com a sequência de acontecimentos fisiopatológicos que comprometem a função celular levando a morte neuronal. A escolha do tempo de eutanásia para avaliação da neuroproteção foi de 48 horas após o trauma, já que os inúmeros fenômenos destrutivos como excitotoxicidade pelo glutamato (Kunihara et al., 2004; Brouns et al., 2009; Gensel et al., 2012), aumento exacerbado intracelular de sódio e cálcio (Young et al., 1982; Stokes et al., 1983; Gelderd e Sampson, 1990), estresse oxidativo (Azbill et al., 1997; Sullivan et al., 2007; Patel et al., 2010), depleção do sistema antioxidante (Azbill et al., 1997; Nagai et al., 2001; Masella et al., 2005), disfunção mitocondrial (Santo-Domingo e Demareux, 2010), isquemia (Rowland et al., 2008), disfunção neuronal e morte celular (Isaac e Pejic, 1995; Amar e Levy, 1999; Lu et al., 2000; Carlson e Gorden, 2002; Hall e Springer, 2004) ocorrem ou são ativados, em sua maioria, em até 48 horas após a lesão (Li et al., 1996; Dong et al., 2000; Lu et al., 2000; Hwan et al., 2006; Oyinbo, 2011; Yip e Malaspina, 2012).

A observação dos níveis de glutamato é uma ferramenta importante já que sua redução é considerada uma estratégia de neuroproteção (Kunihara et al., 2004; Gensel et al., 2012). Todavia, 48 horas após o trauma medular, as concentrações do glutamato em grupos submetidos ao trauma foram semelhantes ao controle negativo, o que não permitiu inferir sobre a ação efetiva da MVIIA (Souza et al., 2008; Gonçalves et

al., 2011) ou dantrolene (Frandsen e Schousboe, 1991; Nakayama et al., 2002), como já relatado em estudos prévios.

A inibição dos canais para cálcio pela MVIIA e dantrolene, como já relatado, podem reduzir a liberação do glutamato e sua excitotoxicidade com o bloqueio dos canais para cálcio (Ates et al., 2007; Gensel et al., 2012). Entretanto, isso não foi observado no momento de 48 horas após o trauma, já que o glutamato depois de atingir níveis tóxicos dentro dos primeiros minutos após o trauma medular (Nakamura et al., 1994; Liu et al., 1999b; Brouns et al., 2009), com pico entre 15 (Mills et al., 2001) a 40 minutos (Xu et al., 2004), ele retorna aos níveis basais em três (Liu et al., 1991; Liu e McAdoo, 1993; Xu et al., 2004) a quatro horas, no líquido cerebrospinal, sendo regulado/recaptado por proteínas transportadoras de glutamato (Ishikawa e Marsala, 1996; Yamamoto e Sakashita, 1998). Insistiu-se na avaliação com 48 horas, pois, apesar de poucos, alguns autores relatam a persistente elevação do glutamato por dias (Kunihara et al., 2004) a semanas no homogenato medular dependendo da intensidade da lesão, onde as moderadas elevariam a altos níveis por pouco tempo (Panter et al., 1990 citado por Lepore et al., 2011). E, ainda, algumas proteínas transportadoras do glutamato foram detectadas em altos índices por semanas no tecido medular adjacente ao epicentro, na tentativa de reestabelecer a homeostasia (Kim et al., 2011).

Ao utilizar bloqueadores de canais para cálcio, houve redução na produção de ERO pela MVIIA, dantrolene e sua associação, sendo a maior diminuição pelo grupo MVIIA. Tendo em vista que as ERO são produzidas tanto pelo aumento do cálcio intracelular como pela disfunção mitocondrial, observou-se no grupo MVIIA uma maior preservação mitocondrial, corroborando estudos de sua aplicação em lesão cerebral traumática (Xiong et al.,

1998; Verweij et al., 2000), o que justifica os menores níveis de ERO nesse grupo. Todavia, não foi observado aumento da preservação mitocondrial no grupo da associação.

Secundária à inibição significativa de ERO pela MVIIA aplicada isoladamente, notou-se a capacidade de reduzir a lipoperoxidação, o que não ocorreu com os demais tratamentos, sugerindo que o mecanismo de defesa antioxidante enzimático ou não tenha sido insuficiente nos demais grupos, como proposto por Aslan et al. (2009). Em contrapartida, alguns estudos relatam a inibição da peroxidação lipídica pelo dantrolene quando utilizado como pré-tratamento em injúrias causadas por irradiação (Büyükkuroglu et al., 2003) ou se aplicado imediatamente após o trauma medular (Aslan et al., 2009), além de maior preservação mitocondrial em modelos crônicos de Alzheimer (Peng et al., 2012), o que não foi constatado nesse estudo, talvez pelo tempo de aplicação mais tardio com 60 minutos ou tipo de trauma.

O desequilíbrio com alta produção de radicais livres e a baixa defesa antioxidante é um mecanismo em potencial nas doenças, causando ou acentuando a lesão neuronal (Azbill et al., 1997; Nagai et al., 2001; Masella et al., 2005). Optou-se pela avaliação de enzimas do sistema glutatona por ser um bom indicativo do *status* de defesa antioxidante do organismo (Gariballa et al., 2002).

A MVIIA apresentou índices elevados das enzimas avaliadas: GPx, GR e GT, o que pode explicar a atenuação do estresse oxidativo e maior preservação celular. Embora tenha sido relatado propriedade antioxidante do dantrolene *in vitro* (Büyükkuroglu et al., 2001) e Aslan et al. (2009) tenham observado o aumento da GPx com aplicação do dantrolene imediatamente após o trauma medular *in*

vivo, isso não foi observado nesse estudo. Uma possível explicação, mais uma vez, é a diferença do momento de aplicação do tratamento do dantrolene e o tipo de trauma realizado. Ainda, apesar de a MVIIA mostrar resultados favoráveis isoladamente, quando associado ao dantrolene apenas a GR apresentou elevação significativa. A GR é responsável pela regeneração da glutathiona reduzida, um importante antioxidante celular com função de limpar as ERO, radicais livres e metabólitos reativos (Gilbert et al., 1990; Valko et al., 2007), além de agir como substrato para antioxidação e detoxificação da enzima GPx (Nogues et al., 2006). Assim, no grupo da associação onde foram observados menores índices de ERO e apenas aumento da GR, sugere-se que ela foi importante para essa redução.

Os resultados obtidos com a MVIIA corroboram os encontrados em lesões cerebrais traumáticas (Verweij et al., 1997; Verweij et al., 2000) e isquêmicas (Bowersox et al., 1997; Perez-Pinzon et al., 1997), com preservação mitocondrial e redução da morte celular, justificada em parte pelo potencial antioxidante e diminuição do estresse oxidativo como visto nesse experimento. A dose, o horário e a via de aplicação foram escolhidos pelo potencial neuroprotetor apresentado em estudos anteriores (Capítulo 2). Em relação ao dantrolene, não foi encontrada preservação neuronal, embora estudos tenham mostrado significativa preservação neuronal com aplicação em 60 minutos (Torres et al., 2011) ou imediatamente após o trauma medular *in vivo* com efeito antioxidante e diminuição de estresse oxidativo (Aslan et al., 2009), seu efeito se mostrou inconsistente. Outros estudos também encontraram nenhuma ou pouca variação na preservação neuronal tanto no trauma medular, mesmo com aplicação em 60 minutos (Rosado et al., 2014), quanto na isquemia cerebral (Kross et al., 1993; Zhang et al., 1993; Kim et al., 2002;

Martinez-Sanchez et al., 2004). Essas diferenças nos resultados podem ter sido encontradas pelas divergências de horários de aplicação, tempo de avaliação do dantrolene e tipo de trauma.

De modo interessante, a MVIIA quando associada ao dantrolene não manteve os mesmos benefícios após o trauma medular. Verweij et al. (2000) no estudo de tempo resposta da MVIIA em lesões cerebrais traumáticas, observaram que a aplicação tardia determinava uma melhor preservação mitocondrial como também observado em estudos anteriores no trauma medular (Capítulo 2). Verweij et al. (2000) sugeriram, então, que a eficácia da MVIIA seria melhor frente aos períodos críticos do cálcio após a lesão. O mesmo raciocínio pode ser abordado à associação desses bloqueadores de canais para cálcio. O uso do dantrolene anterior a MVIIA pode ter diminuído os níveis do cálcio intracelular como mostrado pela redução na produção de ERO, evento secundário a elevação do cálcio. Assim, no momento de aplicação da MVIIA, os níveis do cálcio possivelmente estariam reduzidos e o potencial de ação da toxina não seria tão eficiente. Faz-se necessários mais estudos sobre a interação desses medicamentos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, apesar da associação da MVIIA e dantrolene reduzir os níveis de ERO e aumentar a atividade da GR, não foi capaz de realizar preservação celular após o trauma medular agudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A morte neuronal secundária ao trauma medular é determinada por uma cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos, tendo importante participação o influxo exacerbado do cálcio com consequente disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e morte neuronal. Diversas estratégias terapêuticas têm focado na inibição ou ativação de sinalizações moleculares como potenciais neuroprotetores.

Nesse estudo, a aplicação intratecal tardia da MVIIA, com consequência dos bloqueios dos canais para cálcio, mostrou preservação essencial de uma das principais fontes de radicais livres, a mitocôndria. Assim, a MVIIA reduziu significativamente os danos oxidativos ao inibir a produção de ERO e sua reação secundária, a lipoperoxidação. Além dessa via, sugere-se que a redução da expressão da nNOS dependente do influxo de cálcio e a estimulação do sistema antioxidante pela MVIIA também participa ativamente da inibição do estresse oxidativo, com

consequente atuação tanto em vias intrínsecas quanto extrínsecas da cascata de apoptose.

Esses resultados proporcionam avanços na aplicação da MVIIA para diferentes fins terapêuticos, como uma importante estratégia de neuroproteção, e contribuirão no despertar de novas pesquisas a cerca de outros possíveis mecanismos de ação, utilização da conotoxina e, principalmente, consolidar sua aplicação clínica após o trauma medular a fim de possibilitar a melhora neurológica dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGRAWAL, S.K.; FEHLINGS, M.G. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J. Neurosci.*, v. 17, p. 1055-1063, 1997.
- 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. Neurosci.*, v. 99, p. 179-188, 2000.
- AGUILAR, M.B.; FLORES-TORRES, A.; BATISTA, C.V. et al. Structural characterization of five post-translationally modified isomorphs of a novel putative δ -conotoxin from the vermivorous snail *Conus delessertii* from the Mexican Caribbean Sea. *Peptides*, v. 30, p. 458-466, 2009.
- ALAQARSAMY, S.; LONART, G.; JOHNSON, K.M. Regulation of nitric oxide blood-brain barrier at or adjacent to the lesion center synthase activity in cortical slices by excitatory amino acids and calcium. *J. Neurosci. Res.*, v. 38, p. 648-653, 1994.
- 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. et al. Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 284, p. F966-F976, 2003.
- ARVANIAN, V.L.; MANUZON, H.; DAVENPORT, M. et al. Combined Treatment with Neurotrophin-3 and LSD Facilitates Behavioral Recovery from Double-Hemisection Spinal Injury in Neonatal Rats. *J. Neurotrauma*, v. 23, p. 66-74, 2006.
- ASLAN, A.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M.E. et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. *Eur. Spine J.*, v. 18, p. 1442-1451, 2009.
- ASLAN, A.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M.E. et al. Royal jelly can diminish secondary neuronal damage after experimental spinal cord injury in rabbits. *Food Chem. Toxicol.*, v. 50, p. 2554-2559, 2012.
- ATES, O.; CAYLI, S.R.; GURSES, I. et al. Comparative neuroprotective effect of sodium channel blockers after experimental spinal cord injury. *J. Clin. Neurosci.*, v. 14, p. 658-665, 2007.
- AZBILL, R.D.; MU, X.; BRUCE-KELLER, A.J. et al. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 765, p. 283-290, 1997.
- BA, F.; SONG, W.; LI, H. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after complete spinal cord transaction in rats. *Life Sci. J.*, v. 10, p. 704-709, 2013.
- BAINS, M.; HALL, E.D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1822, p. 675-684, 2012.
- BALI, M.S.; LANG, J.; JAGGY, A. et al. Comparative study of vertebral fractures and luxations in dogs and cats. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, v. 22, p. 47-53, 2009.

- BAO, F.; LIU, D. Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induce cell death by necrosis and apoptosis: protection by a metalloporphyrin. *Neuroscience*, v. 126, p. 285-295, 2004.
- BARROS, F.; TARICCO, M.A.; OLIVEIRA, R.P. et al. Epidemiological study of patients with spinal cord injuries. *Rev. Hosp. Fac. Med. S. Paulo*, v. 45, p. 123-126, 1990.
- BARTHOLDI, D.; SCHWAB, M.E. Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat. *Brain Res.*, p. 177-186, 1995.
- 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, p. 244-256, 1996.
- BECKMAN, J.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n. 87, p. 1620-1624, 1990.
- 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, p. 197-217, 1992.
- BERGKNUT, N.; EGENVALL, A.; HAGMAN, R. et al. Incidence of intervertebral disk degeneration-related diseases and associated mortality rates in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 240, p. 1300-1309, 2012.
- BERMAN, R.F.; VERWEIJ, B.H.; MUIZELAAR, J.P. Neurobehavioral protection by the neuronal calcium channel blocker Ziconotide in a model of traumatic diffuse brain injury in rats. *J. Neurosurg.*, v. 93, p. 821-828, 2000.
- BERNARDI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R. et al. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, v. 264, p. 687-701, 1999.
- BERRIDGE, M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, v. 32, p. 235-249, 2002.
- BINGHAM, J.P.; MITSUNAGA, E.; BERGERON, Z.L. Drugs from slugs - Past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chem.-Biol. Interact.*, v. 183, p. 1-18, 2010.
- BINSHTOK, A.M.; WANG, H.; ZIMMERMANN, K. et al. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J. Neurosci.*, v. 28, p. 14062-14073, 2008.
- BLIGHT, A.R. Animal models of spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj. Rehabil.*, v. 6, p. 1-13, 2000.
- BOLAÑOS, J.P.; HEALES, S.J.R.; PEUCHEN, S. et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 21, p. 995-1001, 1996.
- BOLDIN, M.P.; GONCHAROV, T.M.; GOLTXEV, Y.V. et al. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, n. 85, p. 803-15, 1996.
- BOSE, D.D.; THOMAS, D.W. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) stimulates a conformationally coupled

- calcium release pathway in the NG115-401L neuronal cell line. *Neuropharmacol.*, v. 50, p. 532-539, 2006.
- 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, p. 1651-1658, 1998.
- 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.; MILJANICH, G.P.; SUGIURA, Y. et al Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel -conopeptides and -agatoxin- IVA. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, n. 273, p. 248-256, 1995.
- BOWERSOX, S.S.; SINGH, T.; LUTHER, R.R. Selective blockade of N-type voltage-sensitive calcium channels protects against brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.*, v. 747, p. 343-347, 1997.
- BRACKEN, M.B.; SHEPARD, M.J.; COLLINS, W.F. et al: A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N. Engl. J. Med.*, v. 322, p. 1405-1411, 1990.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL, A.V.B.; COELHO, D.G. The neurological outcome of acute spinal cord injury in a neurosurgical hospital of a developing country. *Spinal Cord*, v. 36, p. 353-356, 1998.
- BROUNS, R.; DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin. Neurol. Neurosur.*, v. 11, p. 483-495, 2009.
- BUBENIK, L.; HOSGOOD, G. Disc herniation and urinary bladder dysfunction managed by manual expression, indwelling catheterization or intermittent catheterization. *Vet. Surg.*, v. 37, p. 791-800, 2008.
- BUCHAN, A.M.; GERTLER, S.Z.; LI, H. et al. A Selective N-Type Ca²⁺ channel blocker prevents Cal injury 24 h following severe forebrain ischemia and reduces infarction following focal ischemia. *J. Cerebr. Blood F. Met.*, v. 14, p. 903-910, 1994.
- BURNS, L.H.; JIN, Z.; BOWERSOX, S.S. The neuroprotective effects of intrathecal administration of the selective N-type calcium channel blocker ziconotide in a rat model of spinal ischemia. *J. Vasc. Surg.*, v. 30, p. 334-343, 1999.
- BÜYÜKOKUROĞLU, M.E.; TAYSI, S.; KOÇ, M. et al. Dantrolene protects erythrocytes against oxidative stress during whole-body irradiation in rats. *Cell Biochem. Funct.*, v. 21, p. 127-131, 2003.
- CADOTTE, D.W.; FEHLINGS, M.G. Spinal cord injury: a systematic review of current treatment options. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 469, p. 732-741, 2011.
- CALDEIRA, F.M.C. Células tronco mesenquimais indiferenciadas no tratamento do trauma medular espinhal de ratos Lewis. 2011. 100f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.

- CAMERINO, D.C.; TRICARICO, D.; DESAPHY, J.F. Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics*, v. 4, p. 184-198, 2007.
- CAMPOS DA PAZ, A.; BERALDO, P.S.S.; ALMEIDA, M.C.R.R. et al. Traumatic injury to the spinal cord. Prevalence in Brazilian hospitals. *Paraplegia*, v. 30, p. 636-640, 1992.
- CARLIN, K.P.; JIANG, Z.; BORWNSTONE, R.M. Characterization of calcium currents in functionally mature mouse spinal motoneurons. *Eur. J. Neurosci.*, v. 12, p. 1624-34, 2000.
- CARLSON, G.D.; GORDEN, C. Current developments in spinal cord injury research. *Spine J.*, v. 2, p. 116-128, 2002.
- CASHA, S.; YU, W.R.; FEHLINGS, M.G. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, v. 103, p. 203-218, 2001.
- CASTRO, A.; DÍAZ, F.; SUMICH, A. Long-term neuroplasticity in spinal cord injury patients: A study on movement-related brain potentials. *Int. J. Psychophysiol.*, v. 87, p. 205-214, 2013.
- CEMIL, B.; TOPUZ, K.; DEMIRCAN, M.N. et al. Curcumin improves early functional results after experimental spinal cord injury. *Acta Neurochir.*, v. 152, p. 1583-1590, 2010.
- CERDA-GONZALEZ, S.; OLBY, N.J. Fecal incontinence associated with epidural spinal hematoma and intervertebral disk extrusion in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, p. 230-235, 2006.
- CHAI, O.; JOHNSTON, D.E.; SHAMIR, M.H. Bite wounds involving the spine: Characteristics, therapy and outcome in seven cases. *Vet. J.*, v. 175, p. 259-265, 2008.
- CHAPLAN, S.R.; POGREL, J.W.; YAKSH, T.L. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 269, p. 1117-1123, 1994.
- CHATZIPANTELI, K.; GARCIA, R.; MARCILLO, A.E. et al. Temporal and segmental distribution of constitutive and inducible nitric oxide synthases after traumatic spinal cord injury: effect of aminoguanidine treatment. *J. Neurotrauma*, v. 19, p. 639-651, 2002.
- CHEN, A.V.; BAGLEY, R.S.; WEST, C.L. et al. Fecal incontinence and spinal cord abnormalities in seven dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 12, p. 1945-1951, 2005.
- CHEN, G.; ZHANG, Z.; WANG, S. et al. Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats. *Exp. Ther. Med.*, v. 6, p. 868-872, 2013.
- CHINOPOULOS, C.; GERENCSEK, A. A.; DOCZI, J. et al. Inhibition of glutamate-induced delayed calcium deregulation by 2-APB and LA³⁺ in cultured cortical neurones. *J. Neurochem.*, v. 91, p. 471-483, 2004.
- CHOI, D.W. Excitotoxicity cell death. *J. Neurobiol.*, n. 23, p. 1261-1276, 1992.
- CHRISTIE, S.D.; COMEAU, B.; MYERS, T. et al. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. *Neurosurg. Focus*, v. 25, p. 1-7, 2008.
- CITRON, B.A.; ARNOLD, P.M.; SEBASTIAN, C. et al. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp. Neurol.*, v. 166, p. 213-226, 2000.

- CLOUTIER, F.; SIEGENTHALER, M.M.; NISTOR, G. et al. Transplantation of human embryonic stem cell- cord derived oligodendrocyte progenitors into rat spinal cord injuries does not cause harm. *Regen. Med.*, v. 1, p. 469-479, 2006.
- COATES, J.R. Paraparesis. In: *Canine and Feline Neurology*. 3. ed. Gloucester: BSAVA, 2004. p. 237-264.
- COHEN, T.I.; WEINBERG, R.J.; BLIGHT, A.R. Intrathecal infusion of the nitric oxide synthase inhibitor N-methyl L-arginine after experimental spinal cord injury in guinea pigs. *J. Neurotrauma*, v. 13, p. 361-369, 1996.
- ÇOLAK, A.; KARAOGLAN, A.; BARUT, S. et al. Neuroprotection and functional recovery after application of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk in a rat model of traumatic spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine*, v. 2, p. 327-334, 2005.
- COLBOURNE, F.; LI, H.; BUCHAN, A.M. Continuing postischemic neuronal death in CA1 influence of ischemia duration and cytoprotective doses of NBQX and SNX-111 in rats. *Stroke*, v. 30, p. 662-688, 1999.
- CONTI, A.; MISCUSI, M.; CARDALI, S. et al. Nitric oxide in the injured spinal cord: synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. *Brain Res. Rev.*, v. 54, p. 205-218, 2007.
- 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.
- CRIPPS, R.A.; LEE, B.B.; WING, P. et al. A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository for injury prevention. *Spinal Cord*, v. 49, p. 493-501, 2011.
- CZESCHIK, J.C.; HAGENACKER, T.; SCHAFERS, M. et al. TNF-alpha differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci. Lett.*, n. 434, p. 293-298, 2008.
- DASARI, V.R.; SPOMAR, D.G.; GONDI, C.S. et al. Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 24, p. 391-410, 2007.
- DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J.N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Bio. Med.*, v. 62, p. 170-185, 2013.
- DECUYPERE, J.; MONACO, G.; MISSIAEN, L. 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.
- DELANTY, N.; DICHTER, M.A. Antioxidant therapy in neurologic disease. *Arch. Neurol.*, v. 57, p. 1265-1270, 2000.
- DEVADAS, S.; ZARITSKAYA, L.; RHEE, S.G. et al. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J. Exp. Med.*, v. 195, p. 59-70, 2002.
- 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.
- DIVANOGLU, A.; LEVI R. Incidence of traumatic spinal cord injury in Thessaloniki, Greece and Stockholm, Sweden: a prospective population-based study. *Spinal Cord*, v. 47, p. 1-6, 2009.
- DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.*, v. 81, p. 163-221, 1999.
- DONG, Y.; SHOU, T.; ZHOU, Y. et al. Ultraviolet blood irradiation and oxygenation affects free radicals and antioxidase after rabbit spinal cord injury. *Chin. Med. J.*, v. 113, p. 991-995, 2000.
- DRUMMOND, B.L. Subfração PnTx 3-6 do veneno da aranha armadeira (*Phoneutria nigribiter*) no tratamento de ratos wistar submetidos ao trauma agudo compressivo à medula espinhal. 2010. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DUNLAP, K.; LUEBKE, J.I.; TURNER, R.J. Excitotoxic Ca^{++} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.*, v. 18, p. 89-98, 1995.
- DUZENLI, S.; BAKURIDZE, K.; GEPIREMEN, A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicol. In Vitro*, v. 19, p. 589-594, 2005.
- DYKES, M.H. Evaluation of a muscle relaxant: dantrolene sodium (Dantrium). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 231, p. 862-864, 1975.
- EMMEZ, H.; BÖRCEK, A.Ö.; KAYMAZ, M. et al. Neuroprotective effects of gabapentin in experimental spinal cord injury. *World Neurosurg.*, v. 73, p. 729-734, 2010.
- EROL, F.S.; KAPLAN, M.; TIFTIKCI, M. et al. Comparison of the effects of octreotide and melatonin in preventing nerve injury in rats with experimental spinal cord injury. *J. Clin. Neurosci.*, v. 15, p. 784-790, 2008.
- FANG, M.; WANG, J.; HAN, S. et al. Protective effects of ω -conotoxin on amyloid- β -induced damage in PC12 cells. *Toxicol. Lett.*, v. 206, p. 325-338, 2011.
- FERRARI, L.F.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A. et al. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. *J. Neurosci. Meth.*, v. 159, p. 236-243, 2007.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver. Ass. Med. Brasil*, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FIGHERA, R.A.; SILVA, M.C.; SOUZA, T.M. et al. Aspectos patológicos de 155 casos fatais de cães atropelados por veículos automotivos. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1375-1380, 2008.
- FINEMAN, I.; HOVDA, D.A.; SMITH, M. et al. Concussive brain injury is associated with a prolonged accumulation of calcium: a ^{45}Ca autoradiographic study. *Brain Res.*, v. 624, p. 94-102, 1993.
- FITZMAURICE, S.N. Localizando as lesões. In: _____. *Neurologia em pequenos animais*. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. cap. 3, p. 34-43.
- FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIE`RE, J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, v. 84, p. 131-141, 2002.

- FOUAD, K.; SCHNELL, L.; BUNGE, M.B. et al. Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J. Neurosci.*, v. 25, p. 1169-1178, 2005.
- FOURNIER, P. Dossier toxicologique, pharmacologique, pharmacocinétique du Dantrium IV. *Dantrium et hyperthermia maligne*. Lyon, Laboratoire Oberval (Unpublished internal report), 1982.
- FRANSEN, A.; SCHOUSBOE, A. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca²⁺ release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, v. 56, p. 1075-1078, 1991.
- FUKUSHIMA, F.B. Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol e etomidato em ratos submetidos ao trauma medular espinal. 2012. 85p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GALANG, N.; SASAKI, H.; MAULIK, N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy. *Toxicol.*, v. 148, p. 111-118, 2000.
- GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; KEPP, O.; KROEMER, G. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1787, p. 402-413, 2009.
- GARIBALLA, S.E.; HUTCHIN, T.P.; SINCLAIR, A.J. Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. *QJM*, v. 95, p. 685-690, 2002.
- GAROSI, L. Lesion localization and differential diagnosis. In: PLATT, S.R.; OLBY, N.J. *Canine and Feline Neurology*. 3rd ed. Gloucester: BSAVA, 2004. cap. 2, p. 24-34.
- GARREL, C.; FOWLER, P.A.; AL-GUBORY, K.H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J. Endocrinol.*, v. 205, p. 107-116, 2010.
- GAUR, S.; NEWCOMB, R.; RIVNAY, B. et al. Calcium channel antagonist peptides define several components of transmitter release in the hippocampus. *Neuropharmacol.*, v. 33, p. 1211-1219, 1994.
- GELDERD, J.B.; SAMPSON, H.W. Tissue calcium levels following spinal cord transection in rats. *Acta Neurobiol Exp.*, v. 50, p. 601-608, 1990.
- GENSEL, J.C.; TOVAR, C.A.; BRESNAHAN, J.C.; BEATIE, M.S. Topiramate treatment is neuroprotective and reduces oligodendrocytes loss after cervical spinal cord injury. *Plos One*, v. 7, p. 1-6, 2012.
- GHOSH, A.; GREENBERG, M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, v. 268, p. 239-247, 1995.
- GILBERT, H.F.; MCLEAN, V.; MCLEAN, M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulphide exchange. *Adv. Enz.*, v. 63, p. 169-172, 1990.
- GLENNER, G.G. Tetrazolium salts. In: LILLIE, R.D. *H.J. Conn's Biological Stains*. 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. p. 154-162.
- GLITSCH, M.D.; BAKOWSKI, D.; PAREKH, A.B. Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake. *EMBO J.*, v. 21, p. 6744-6754, 2002.

- GOHIL, K.; BELL, J.R.; RAMACHANDRAN, J. Neuroanatomical distribution of receptors for a novel voltage-sensitive calcium channel antagonist, SNX-230 (conopeptide MVIIC). *Brain Res.*, n. 653, p. 258-266, 1994.
- GONÇAVES, J.M.; FERREIRA, J.; PRADO, M.A. et al. The effect of spider toxin PhTx3-4, ω -conotoxins MVIIA and MVIIC on glutamate uptake and on capsaicin-induced glutamate release and $[Ca^{2+}]_i$ in spinal cord synaptosomes. *Cell Mol. Neurobiol.*, v. 31, p. 277-283, 2011.
- GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M.G.; THOMPSON, C.B. Bcl-x1 prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, v. 20, p. 5680-5689, 2000.
- 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.
- GUO, Y.; SRINIVASULA, S.M.; DRUILLE, A. et al. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 13430-13437, 2002.
- GUTH, L.; ZHANG, Z.; STEWARD, O. The unique histopathological responses of the injured spinal cord. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 890, p. 366-384, 1999.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol. Chem.*, v. 249, p. 7130-7139, 1974.
- HACHMEISTER, J.E.; VALLURU, L.; BAO, F. et al. Mn (III) Tetrakis (4-Benzoic Acid) porphyrin administered into the intrathecal space reduces oxidative damage and neuron death after spinal cord injury: a comparison with methylprednisolone. *J. Neurotrauma*, v. 23, p. 1766-1778, 2006.
- HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 23, p. 264-280, 2006.
- HALL, E.D.; BRAUGHLER, J.M.; McCALL, J.M. Antioxidant effects in brain and spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 9, p. S165-172, 1992.
- 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.*, v. 56, p. 556-563, 2009.
- HAMADA, Y.; IKATA, T.; KATOH, S. et al. Roles of nitric oxide in compression injury of the rat spinal cord. *Free Radical Biol. Med.*, v. 20, p. 1-9, 1996.
- HANNON, H.E.; ATCHISON, W.D. Omega-Conotoxins as Experimental Tools and Therapeutics in Pain Management. *Mar. Drugs*, v. 11, p. 680-699, 2013.
- HAPPEL, R.D.; SMITH, K.P.; BANIK, N.L. et al. Ca^{2+} accumulation in experimental spinal cord trauma. *Brain Res.*, v. 211, p. 476-479, 1981.
- HAUSMANN, O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 41, p. 369-378, 2003.

- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, p. 51-88, 2005.
- HAYES, J.D.; McLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad. Res.*, v. 31, p. 273-300, 1999.
- 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.
- HERRERO, I.; MIRAS-PORTUGAL, M.T.; SÁNCHEZ-PRIETO, J. Rapid Desensitization of the metabotropic glutamate receptor that facilitates glutamate release in rat cerebrocortical nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.*, v. 6, p. 115-120, 1994.
- HILLARD, V.H.; PENG, H.; ZHANG, Y. et al. Tempol, a nitroxide antioxidant, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *J. Neurotrauma*, v. 21, p. 1405-1414, 2004.
- HILLYARD, D.R.; MONJE, V.D.; MINTZ, I.M. et al. A new *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron*, v. 9, p. 69-77, 1992.
- HOFSTETTER, C.P.; SCHWARZ, E.J.; HESS, D. et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 99, p. 2199-2204, 2002.
- HORVATH, G.; BRODACZ, B.; HOLZER-PETSCH, U. Blood pressure changes after intrathecal co-administration of calcium channel blockers with morphine or clonidine at the spinal level. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 366, p. 270-275, 2002.
- HOVDA, D.A.; FU, K.; BADIE, H. et al. Administration of an omegaconopeptide one hour following traumatic brain injury reduces 45calcium accumulation. *Acta Neurochir.*, v. 60, p. 521-523, 1994.
- HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol. Educ.*, v. 26, n. 4, p. 238-255, 2002.
- HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol. Educ.*, v. 26, 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.
- HWAN, A.Y.; YEOP, B.Y.; GWANG, L. et al. Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 348, p. 560-570, 2006.
- IGELMUND, P.; ZHAO, Y.Q.; HEINEMANN, U. Effects of T-type, L-type, N-type, P-type and Q-type calcium channel blockers on stimulus-induced pre- and postsynaptic calcium fluxes in rat hippocampal slices. *Exp. Brain. Res.*, v. 109, p. 22-32, 1996.
- 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.
- INAN, S.; WEI, H. The Cytoprotective Effects of Dantrolene: A Ryanodine Receptor Antagonist. *Anesth. Analg.*, v. 111, p. 1400-1410, 2010.

- ISAAC, L.; PEJIC, L. Secondary mechanisms of spinal cord injury. *Surg. Neurol.*, v. 43, p. 484-485, 1995.
- ISHIKAWA, T.; MARSALA, M. Excitatory amino acids and prostanoids release in spinal cord injury. *No To Shinkei*, v. 48, p. 259-263, 1996.
- JAKUBOWSKI, W.; BARTOSZ, G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol. Int.*, v. 24, p. 757-760, 2000.
- JIA, X.; KOWALSKI, R.G.; SCIUBBA, D.M. et al. Critical Care of Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Intensiv. Care Med.*, v. 28, p. 12-23, 2013.
- JOHNSON, S.; RABINOVITCH, P. Ex-vivo imaging of excised tissue using vital dyes and confocal microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.*, cap. 9, unit 9.39, p. 1-20, 2012.
- JUNG, W.K.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S.K. Antioxidative activity of a low molecular weight peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 220, p. 535-539, 2005.
- JURGENSMEIER, J.M.; XIE, Z.; DEVERAUX, Q. et al. Bax directly induces release cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 4997-5002, 1998.
- JUURLINK, B.H.; PATERSON, P.G. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J. Spinal Cord Med.*, v. 21, p. 309-334, 1998.
- KAMENCIC, H.; GRIEBEL, R.W; LYON, A.W. et al. Promoting glutathione synthesis after spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *FASEB J.*, v. 15, p. 243-250, 2001.
- KANTER, M.; COSKUN, O.; KALAYCI, M. et al. Neuroprotective effects of *Nigella sativa* on experimental spinal cord injury. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 25, p. 127-133, 2006.
- KAPOOR, V.K. Natural toxins and their therapeutic potential. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 48, p. 228-237, 2010.
- KARALIJA, A.; NOVIKOVA, L.N.; KINGHAM, P.J. et al. The effects of n-acetyl-cysteine and acetyl-l-carnitine on neural survival, neuroinflammation and regeneration following spinal cord injury. *Neuroscience*, v. 260, p. 143-151, 2014.
- KAWAGUCHI, M.; FURUYA, H.; PATEL, P. Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J. Anesth.*, v. 19, p. 150-156, 2005.
- 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.
- KIM, B.C.; KIM, H.T.; MAMURA, M. et al. Tumor Necrosis Factor Induces Apoptosis in Hepatoma Cells by Increasing Ca²⁺ Release from the Endoplasmic Reticulum and Suppressing Bcl-2 Expression. *JBC*, v. 277, p. 31381-31389, 2002.
- KIM, Y.; PARK, Y.K.; CHO, H. et al. Long-term changes in expressions of spinal glutamate transporters after spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 1389, p. 194-199, 2011.
- KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a

- transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 86, p. 5159-5162, 1989.
- KOÇ, R.K.; AKDEMİR, H.; KURTSOY, A. et al. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Res. Exp. Med.*, v. 195, p. 117-123, 1995.
- KOCHEGAROV, A.A. Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium*, v. 33, p. 145-162, 2003.
- KOCOGULLARI, C.U.; EMMILER, M.; CEMEK, M. et al. Can dantrolene protect spinal cord against ischemia/reperfusion injury? An experimental study. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 56, p. 406-411, 2008.
- KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; ELLERBY, L.M. et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p. 5752-57, 1999.
- 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.
- KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M.U.; FIEGE, M. et al. Dantrolene - a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*, v. 59, p. 364-373, 2004.
- KROSS, J.; FLEISCHER, J.E.; MILDE, J.H. et al. No dantrolene protection in a dog model of complete cerebral ischaemia. *Neurol. Res.*, v. 15, p. 37-40, 1993.
- KUBLI, D.A.; QUINSAY, M.N.; HUANG, C. et al. Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 295, p. H2025-H2031, 2008.
- KUNIHARA, T.; MATSUZAKI, K.; SHIYA, N. et al. Naloxone lowers cerebrospinal fluid levels of excitatory amino acids after thoracoabdominal aortic surgery. *J. Vasc. Surg.*, v. 40, p. 681-690, 2004.
- KWAK, E.K.; KIM, J.W.; KANG, K.S. et al. The role of inducible nitric oxide synthase following spinal cord injury in rat. *J. Korean Med. Sci.*, v. 20, p. 663-669, 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.
- LANDER, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.*, v. 11, p. 118-124, 1997.
- LANZ, O.; BERGMAN, R.; SHELL, L. Initial assessment of patients with spinal cord trauma. *Vet. Med.*, p. 851-854, 2000.
- LAVOR, M.S.L. Efeito do etomidato na isquemia e no trauma medular agudo em ratos. 2013. 146p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LAVOR, M.S.L.; BINDA, N.S.; FUKUSHIMA, F.B. et al. Efeito de bloqueadores de canais de cálcio na isquemia medular in vitro de ratos: avaliação da viabilidade celular. In: V Simpósio de Neurociências da UFMG: Interfaces com a Engenharia Biomédica, 2011. *Rev. Neurociênc.*, v. 19, p. 97-98, 2011.
- LEE, B.B.; CRIPPS, R.A.; FITZHARRIS, M. et al. The global map for traumatic

- spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*, p. 1-7, 2013.
- LEE, S.; KIM, Y.; Back, S.K. et al. Analgesic effect of highly reversible ω -conotoxin FVIA on N type Ca²⁺ channels. *Molec. Pain*, v. 6, p. 1-12, 2010.
- LEE, Y.L.; PARK, K.H.; PARK, H.H. et al. Clonidine mediates a neuroprotective effect by scavenging free radicals and activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Neurochem.*, v. 111, p. 90-100, 2009.
- LEPORE, A.C.; O'DONELL, J.; BONNER, J.F. et al. Spatial and temporal changes in promoter activity of the astrocyte glutamate transporter GLT1 following traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.*, v. 89, p. 1001-1017, 2011.
- LEWIS, R.J.; NIELSEN, K.J.; CRAICK, D.J. et al. Novel omega-conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.*, n. 275, p. 35335-35344, 2000.
- LI, D.; UETA, E.; KIMURA, T. et al. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci.*, v. 95, p. 644,650, 2004.
- LI, F.; HAYASHI, T.; JIN, G. et al. The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers. *Brain Res.*, v. 1048, p. 59-68, 2005.
- LI, G.L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M. et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v. 55, p. 280-289, 1996.
- 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.
- LI, M.; ONA, V.O.; CHEN, M. et al. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, v. 99, p. 3333-342, 2000.
- LIPSKI, J.; PARK, T.I.; LEE, S.C. et al. Involvement of TRP-like channels in the acute ischemic response of hippocampal CA1 neurons in brain slices. *Brain Res.*, v. 1077, p. 187-199, 2006.
- LIU, D.; LING, X.; WEN, J. et al. The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated protein. *J. Neurochem.*, v. 75, p. 2144-2154, 2000.
- LIU, D.; LIU, J.; SUN, D. et al. Spinal cord injury increases iron levels: catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Radical Bio. Med.*, v. 34, p. 64-71, 2003.
- LIU, D.; LIU, J.; SUN, D. et al. The time course of hydroxyl radical formation following spinal cord injury: the possible role of the iron-catalyzed haber-weiss reaction. *J. Neurotrauma*, v. 21, p. 805-816, 2004.
- LIU, D.; LIU, J.; WEN, J. Elevation of hydrogen peroxide after spinal cord injury detected by using the fenton reaction. *Free Radical Bio. Med.*, v. 27, p. 478-482, 1999a.
- LIU, D.; McADOO, D.J. Methylprednisolone reduces excitatory amino acids release following experimental spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 609, p. 293-297, 1993.

- LIU, D.; SYBERT, T.E.; QIAN, H. et al. Superoxide production after spinal injury detected by microperfusion of cytochrome *c*. *Free Radical Bio. Med.*, v. 25, p. 298-304, 1998.
- LIU, D.; THANGNIPON, W.; McADOO, D.J. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res.*, v. 547, p. 344-348, 1991.
- LIU, D.; XU, G.-Y.; PAN, E. et al. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neurosci.*, v. 93, p. 1383-1389, 1999b.
- LIU, H.; WAARDS, M.; SCOTT, V.E.S. et al. Identification of three subunits of the high affinity ω -conotoxin MVIIC-sensitive Ca^{2+} channel. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 13804-13810, 1996.
- LIU, W.-M.; WU, J.-Y.; LI, F.-C. et al. Ion channel blockers and spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.*, v. 89, p. 791-801, 2011.
- LIU, Z.-Q.; XING, S.-S.; ZHANG, W. Neuroprotective effect of curcumin on spinal cord in rabbit model with ischemia/reperfusion. *J. Spinal Cord Med.*, v. 36, p. 147-152, 2013.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LIVERMAN, T.C.; ALTEVOGT, M.B.; JOY, E.J. et al. (2005) Spinal cord injury: progress, promise, and priorities. In: _____. Washington: National Academy of Sciences, 2005. 360 p.
- 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.; NAHMIAS, 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: role of apoptosis. *Spine*, v. 25, p. 1859-1866, 2000.
- LU, P.; JONES, L.L.; SNYDER, E.Y. et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v. 181, p. 115-129, 2003.
- LUO, H.; CHENG, X.; TANG, Y. et al. Electroacupuncture treatment contributes to the downregulation of neuronal nitric oxide synthase and motoneuron death in injured spinal cords following root avulsion of the brachial plexus. *Biomed. Rep.*, v. 2, p. 207-212, 2014.
- LUO, J.; LI, N.; ROBINSON, J.P. et al. Detection of reactive oxygen species by flow cytometry after spinal cord injury. *J. Neurosci. Meth.*, v. 120, p. 105-112, 2002.
- LUO, J.; SHI, R. Diffusive oxidative stress following acute spinal cord injury in guinea pigs and its inhibition by polyethylene glycol. *Neurosci. Lett.*, v. 359, p. 167-170, 2004.
- LUO, J.; UCHIDA, K.; SHI, R. Accumulation of acrolein-protein adducts after traumatic spinal cord injury. *Neurochem. Res.*, v. 30, p. 291-295, 2005.
- MAKAREWICZ, D.; ZIEMINSKA, E.; LAZAREWICZ, J.W. Dantrolene inhibits NMDA-induced $45Ca$ uptake in cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.*, v. 43, p. 273-278, 2003.
- MALMBERG, A.B.; GILBERT, H.; MCCABE, R.T. et al. Powerful antinociceptive effects of the cone snail

- venomderived sub-type-selective NMDA receptor antagonists conantokins G and T. *Pain*, v. 101, p. 109-116, 2003.
- 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. Neurosci.*, v. 14, p. 4882-4890, 1994.
- MARCHI, M.; RISSO, F.; VIOLA, C. et al. Direct evidence that release-stimulating $\alpha 7^*$ nicotinic cholinergic receptors are localize on human and rat brain glutamatergic axon terminal. *J. Neurochem.*, v. 80, p. 1071-1078, 2002.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.*, v. 47, p. 469-474, 1974.
- MARTINEZ-SANCHEZ, M.; STRIGGOW, F.; SCHRODER, U.H. et al. Na(+) and Ca(2+) homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurosci.*, v. 128, p. 729-740, 2004.
- MARTINS, B.C. Efeitos da associação do riluzol ao dantrolene em ratos submetidos ao trauma medular agudo. 2012. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MASELLA, R.; BENEDETTO, R.; VARI, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, v. 16, p. 577-586, 2005.
- MATSUSHITA, K.; WU, Y.; QIU, J. et al. Faz receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J. Neuroscience*, v. 20, p.6879-6887, 2000.
- MATSUYAMA, Y.; SATO, K.; KAMIYA, M. et al. Nitric oxide: a possible etiologic factor in spinal cord cavitation. *J. Spinal Disord.*, v. 11, p. 248-252, 1998.
- MATTSON, M.P.; LAFERLA, F.M.; CHAN, S.L. et al. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *TINS*, v. 23, p. 222-229, 2000.
- MAULIK, N.; YOSHIDA, T.; DAS, D.K. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radical Biol. Med.*, v. 24, p. 869-875, 1998.
- McADOO, D.J.; XU, G.-Y.; ROBAK, G. et al. Evidence that reversed glutamate uptake contributes significantly to glutamate release following experimental injury to the rat spinal cord. *Brain Res.*, v. 865, p. 283-285, 2000.
- McGIVERN, J.G. Ziconotide: a review of is pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, v. 3, p. 69-85, 2007.
- McPHERSON, P.S.; CAMPBELL, K.P. The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 13765-13768, 1993.
- MEHDIRATTA, R.; SABERWAL, G. Bio-business in brief: the case of conotoxins. *Cur. Sci.*, v. 92, p. 39-45, 2007.
- MENDES, D.S.; ARIAS, M.V.B. Traumatismo da medula espinhal em cães e gatos: estudo prospectivo de 57 casos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, p. 1304-13012, 2012.
- MESTRE, C.; PÉLISSIER, T.; FIALIP, J. et al. A method to perform direct

- transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 32, p. 197-200, 1994.
- MILJANICH, G.P.; RAMACHANDRAN, J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, n. 35, p. 707-734, 1995.
- MILLS, C.D.; XU, G.-Y.; McADOO, D.J. et al. Involvement of metabotropic glutamate receptors in excitatory amino acid and GABA release following spinal cord injury in rat. *J. Neurochem.*, v. 79, p. 835-848, 2001.
- 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.
- MITSUI, T.; FISHCER, I.; SHUMSKY, J. et al. Transplants of fibroblasts expressing BDNF and NT-3 promote recovery of bladder and hindlimb function following spinal cord contusion injury in rats. *Exp. Neurol.*, v. 194, p. 410-431, 2005.
- MONETTE, R.; SMALL, D.L.; MEALING, G. 1998. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, v. 2, p. 99-108, 1998.
- MONTAZERI, F.; ESMAEILI, A.; MIROLIAEI, M.; MOSHTAGHIAN, S.J. Messenger RNA expression patterns of p75 neurotrophin receptor and tropomyosin-receptor-kinase A following spinal cord injury. *J. Spinal Cord Med.*, v. 36, p. 231-236, 2013.
- MORI, F.; OKADA, M.; TOMIYAMA, M. et al. Effects of ryanodine receptor activation on neurotransmitter release and neuronal cell death following kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.*, v. 65, p. 59-70, 2005.
- MU, X.; AZBILL, R.D.; SPRINGER, J.E. Riluzole improves measures of oxidative stress following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 870, p. 66-72, 2000.
- MUEHLSCHLEGEL, S.; SIMS, J.R. Dantrolene: mechanisms of neuroprotection and possible clinical applications in the neurointensive care unit. *Neurocrit Care*, v. 10, p. 103-115, 2009.
- NADASDI, L.; YAMASHIRO, D.; CHUNG, D. et al. Structure—activity analysis of a *Conus* peptide blocker of N-type neuronal calcium channels. *Biochem.*, v. 34, p. 8076-8081, 1995.
- NAGAI, T.; SAKAI, M.; INOUE, R. et al. Antioxidative activities of some commercially honeys, Royal jelly, and propolis. *Food Chem.*, v. 75, p. 237-240, 2001.
- NAGARKATTI, N.; DESHPANDE, L.S.; CARTER, D.S. et al. Dantrolene inhibits the calcium plateau and prevents the development of spontaneous recurrent epileptiform discharges following *in vitro* status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.*, v. 32, p. 80-88, 2010.
- NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA, N. et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, v. 403, p.98-103, 2000.
- NAKAHARA, S.; YONE, K.; SETOGUCHI, T. et al. Changes in nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in spinal cord after acute traumatic injury in rats. *J. Neurotrauma*, v. 19, p. 1467-1474, 2002.
- NAKAMURA, R.; KAMAKURA, K.; KWAK, S. Late-onset selective neuronal

- damage in the rat spinal cord induced by continuous intrathecal administration of AMPA. *Brain Res.*, v. 654, p. 279-285, 1994.
- NAKAYAMA, R.; YANO, T.; USHIJIMA, K. et al. Effects of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia. *Anesthesiology*, v. 96, p. 705-710, 2002.
- NEUMANN, C.R.; BRASIL, A.V.; ALBERS, F. Risk factors for mortality in traumatic cervical spinal cord injury: Brazilian data. *J. Trauma*, v. 67, p. 67-70, 2009.
- NEW, P.W.; CRIPPS, R.A.; BONNE LEE, B. Global maps of non-traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository. *Spinal Cord*, v. 52, p. 97-109, 2014.
- NEWCOMB, R.; PALMA, A. Effects of ω -conopeptides on the in vivo release of glutamic and γ -aminobutyric acids. *Brain Res.*, v. 638, p. 95-102, 1994.
- NICHOLLS, D.G.; SIHRA, T.S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.*, v. 49, p. 50-57, 1987.
- NIEBAUER, M.; GRUENTHAL, M. Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental status epilepticus. *Neuropharmacol.*, v. 38, p. 1343-1348, 1999.
- NIKULINA, E.; TIDWELL, J.L.; DAI, H.N. et al. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 101, p. 8786-8790, 2004.
- NOGUES, M.R.; GIRALT, M.; ROMEU, M. Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J. Pineal. Res.*, v. 41, p. 142-149, 2006.
- NORTON, R.S.; OLIVERA, B.M. Conotoxins down under. *Toxicon*, v. 48, p. 780-798, 2006.
- OBENAU, A.; MODY, I.; BAIMBRIDGE, K.G. Dantrolene-Na (Dantrium) blocks induction of long-term potentiation in hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, v. 98, p. 171-178, 1989.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, v. 2, p. 351-358, 1979.
- OLBY, N.; LEVINE, J.; HARRIS, T. et al. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). *JAVMA*, v. 222, p. 762-769, 2003.
- OLBY, N.J.; MACKILLOP, E.; CERDA-GONZALEZ, S. et al. Prevalence of urinary tract infection in dogs after surgery for thoracolumbar intervertebral disc extrusion. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 24, p. 1106-1111, 2010.
- OLIVEIRA, K.M. Efeitos de diferentes doses de ω -conotoxina MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo. 2012. 61 p. Dissertação (Mestrado em Medicina e Cirurgia Veterinárias) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, K.M.; LAVOR, M.S.L.; SILVA, C.M.O. et al. Omega-conotoxin MVIIC attenuates neuronal apoptosis in vitro and improves significant recovery after spinal cord injury in vivo in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v. 7, p. 3524-3536,

2014.

OLIVERA, B.M.; CRUZ, L.J. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*, v. 39, p. 7-14, 2001.

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.; GRAY, W.R.; ZEIKUS, R. et al. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*, v. 230, p. 1338-1343, 1985.

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.; RIVIER, J.; CLARK, C. et al. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science*, v. 249, p. 257-263, 1990.

OLIVERA, B.M.; TEICHERT, R.W. Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: a model of concerted pharmacological discovery. *Mol. Interv.*, v. 7, 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, p. 385-395, 2007.

OUARDOUZ, M; NIKOLAEVA, M.A; CODERRE, E. et al. Depolarization-induced Ca²⁺ release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca²⁺ channel activation of ryanodine receptors. *Neuron.*, v. 40, p. 53-63, 2003.

OYINBO, C.A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury:

a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol. Exp.*, v. 71, p. 281-299, 2011.

OZDOGAN, M.; DEVAY, A.O.; GURER, A. et al. Plasma total anti-oxidant capacity correlates inversely with the extent of acute appendicitis: a case control study. *World J. Emerg. Surg.*, v. 1, p. 1-4, 2006.

OZGIRAY, E.; SERARSLAN, Y.; OZTURK, O.H. et al. Protective effects of edaravone on experimental spinal cord injury in rats. *Pediatr. Neurosurg.*, v. 47, p. 254-260, 2011.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 70, p. 158-169, 1967.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 524-6, 1987.

PANTER, S.S.; YUM, S.W.; FADEN, A.I. Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann. Neurol.*, v. 27, p. 96-99, 1990.

PATEL, S.P.; SULLIVAN, P.G.; LYTTLE, T.S. et al. Acetyl-L-carnitine ameliorates mitochondrial dysfunction following contusion spinal cord injury. *J. Neurochem.*, v. 114, p. 291-301, 2010.

PEARSE, D.D.; PEREIRA, F.C.; MARCILLO, A.E. et al. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat. Med.*, v. 10, p. 610-616, 2004.

PENG, J.; LIANG, G.; INAN, S. et al. Dantrolene ameliorates cognitive decline and neuropathology in Alzheimer triple transgenic mice. *Neurosci. Lett.*, v. 516, p. 274-279, 2012.

- PEREZ-PINZON, M.A.; YENARI, M.A.; SUN, G.H. et al. SNX-111, a novel, presynaptic N-type calcium channel antagonists, is neuroprotective against focal cerebral ischemia in rabbits. *J. Neurol. Sci.*, n. 153, p. 25-31, 1997.
- PINHEIRO, A.C.N.; SILVA, A.J.; PRADO, M.A.M. et al. Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus*, v. 19, p. 1123-1129, 2009.
- PITKANEN, A.; LONGHI, L.; MARKLUND, N. et al. Neurodegeneration and neuroprotective strategies after traumatic brain injury. *Drug Discov. Today Dis. Mech.*, v. 2, p. 409-418, 2005.
- POINTILLART, V.; PETIJEAN, M.E.; WIART, L. et al. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord*, v. 38, p. 71-76, 2000.
- PORTT, L.; NORMAN, G.; CLAPP, C. et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1813, p. 238-259, 2011.
- PRIESTLEY, J.V.; MICHAEL-TITUS, A.T.; TETZLAFF, W. Limiting spinal cord injury by pharmacological intervention. *Handb. Clin. Neurol.*, v. 109, p. 463-484, 2012.
- QIAN, H.; LIU, D. The time course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measured by microdialysis and high pressure liquid chromatography. *Neurochem. Res.*, v. 22, p. 1231-1236, 1997.
- QIAN, Z.-J.; JUNG, W.-K.; BYUN, N.-G. et al. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 3365-3371, 2008.
- RAHIMI-MOVAGHAR, V.; SAYYAH, M.K.; AKBARI, H. et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology*, v. 41, p. 65-85, 2013.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Res.*, v. 45, p. 125-141, 2004.
- RÉCASSENS, M.; VIGNES, M. Excitatory amino acids metabotropic receptor subtypes and calcium regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 757, p. 418-429, 1995.
- REGAN, R.F.; CHOI, D.W. The effect of NMDA, AMPA/kainate, and calcium channel antagonists on traumatic cortical neuronal injury in culture. *Brain Res.*, v. 633, p. 236-242, 1994.
- RHEE, S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.*, v. 31, p. 53-59, 1999.
- RIEDL, S.J.; SHI, Y. Caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 5, p. 897-907, 2004.
- RIESELBACH, R.E.; DI CHIRO, G.; FREIREICH, E.J. et al. Subarachnoid distribution of drugs after lumbar injection. *New Engl. J. Med.*, v. 267, p. 1273-1278, 1962.
- 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, p. 38-43, 1978.
- ROBICHAUD, L.J.; WURSTER, S.; BOXER, P.A. The voltage-sensitive Ca²⁺ channel (VSCC) antagonists omega-Aga-IVA and Omega-CTXMVIIC inhibit spontaneous epileptiform discharges in the

- rat cortical wedge. *Brain Res.*, v. 643, p. 352-356, 1994.
- ROMANO-SILVA, M.A.; RIBEIRO-SANTOS, R.; RIBEIRO, A.M. et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem. J.*, v. 296, p. 313-319, 1993.
- ROSADO, I.R.; LAVOR, M.S.L.; ALVES, E.G.L. et al. Effects of methylprednisolone, dantrolene, and their combination on experimental spinal cord injury. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v. 7, p. 4617-4626, 2014.
- ROSSIGNOL, S.; SCHWAB, M.; SCHWARTZ, M. et al. Spinal cord injury: time to move? *J. Neuroscience*, v. 27, p. 11782-11792, 2007.
- ROWLAND, J.W.; HAWRYLUK, G.W.; KWON, B.; FEHLINGS, M.G. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus*, v. 25, suppl. E2, p.1-17, 2008.
- RUIZ, A.; MATUTE, C.; ALBERDI, E. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP₃ receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium*, v. 46, p. 273-281, 2009.
- SALINSKA, E.; SOBCZUK, A.; LAZAREWICZ, J.W. Dantrolene antagonizes the glycineB site of the NMDA receptor. *Neurosci. Lett.*, v. 432, p. 137-140, 2008.
- SALOMONE, S.; SOYDAN, G.; MOSKOWITZ, M.A. et al. Inhibition of cerebral vasoconstriction by dantrolene and nimodipine. *Neurocrit Care*, v. 10, p. 93-102, 2009.
- SAMRAJ, A.K.; SOHN, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SCHMITZ, I. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol. Biol. Cell*, v. 18, p. 84-93, 2007.
- SANTO-DOMINGO, J.; DEMAUREX, N. Calcium uptake mechanism of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1797, p. 907-912, 2010.
- SANTOS, R.P.; MAZZANTI, A.; BECKMANN, D.V. Recuperação funcional em cães com doença do disco intervertebral toracolombar sem percepção à dor profunda: 37 casos (2002-2010). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, p. 345-349, 2011.
- SATAKE, K.; MATSUYAMA, Y.; KAMIYA, M. et al. Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v. 85, p. 114-122, 2000.
- SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M.G. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J. Neurosurg.*, v. 94, p. 245-256, 2001.
- SCOTT, D.A.; WRIGHT, C.E.; ANGUS, J.A. Actions of intrathecal N-conotoxins CVID, GVIA, MVIIA, and morphine in acute and neuropathic pain in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 451, p. 279-286, 2002.
- SEKHON, L.H.S.; FEHLINGS, M.G. Epidemiology, demographics, and Pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v. 26, p. S2-S12, 2001.
- SELIGMAN, M.L.; FLAMM, E.S.; GOLDSTEIN, B.D. et al. Spectrofluorescent detection of malonaldehyde as a measure of lipid free radical damage in response to ethanol

potentiation of spinal cord trauma. *Lipids*, v. 12, p. 945-950, 1977.

SERARSLAN, Y.; YÖNDEN, Z.; OZGIRAY, E. et al. Protective effects of tadalafil on experimental spinal cord injury in rats. *J. Clin. Neurosci.*, v. 17, p. 349-352, 2010.

SEVERO, M.S.; TUDURY, E.A.; ARIAS, M.V.B. Fisiopatologia do trauma e da compressão à medula espinhal de cães e gatos. *Med. Vet.*, v. 1, p. 78-85, 2007.

SHARMA, H.S.; BADGAIYAN, R.D.; ALM, P. et al. Neuroprotective effects of nitric oxide synthase inhibitors in spinal cord injury – induced pathophysiology and motor functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1053, p. 422-434, 2005.

SHEN, G.S.; LAYER, R.T.; McCABE, R.T. Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. *DDT*, v. 5, p. 98-105, 2000.

SILVA, C.M.O. Condroitinase ABC e células tronco mesenquimais no tratamento de *Rattus norvegicus* submetidos a trauma da medula espinhal. 2013. 73p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, p. 641-650, 2008.

SIMARD, J.M.; TSYMBALYUK, O.; KELEDJIAN, K. et al. Comparative effects of glibenclamide and riluzole in a rat model of severe cervical spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v. 233, p. 566-574, 2012.

SINGH, I.N.; SULLIVAN, P.G.; DENG, Y. et al. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and

dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 26, p. 1407-1418, 2006.

SINISCALCO, D.; FUCCIO, C.; GIORDANO, C. et al. Role of reactive species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. *Pharmacol. Res.*, v. 55, p. 158-166, 2007.

SKOV, M.J.; BECK, J.C.; DE KATER, A.W. et al. Nonclinical safety of ziconotide: an intrathecal analgesic of a new pharmaceutical class. *Int. J. Toxicol.*, v. 26, p. 411-421, 2007.

SMITH, H.S.; DEER, T.R. Safety and efficacy of intrathecal ziconotide in the management of severe chronic pain. *Ther. Clin. Risk Manag.*, v. 5, p. 521-534, 2009.

SMITH, M.T.; CABOT, P.J.; ROSS, F.B. et al. The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain*, v. 96, p. 119-127, 2002.

SMITH, S.J.; AUGUSTINE, G.J. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *TINS*, v. 11, p. 458-464, 1988.

SNUTCH, T.P. Targeting chronic and neuropathic pain: The N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx*, v. 2, p. 662-670, 2005.

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.

SODERQUIST, R.G.; MILLIGAN, E.D.; SLOANE, E.M. et al. PEGylation of brain-derived neurotrophic factor for preserved biological activity and enhanced spinal cord

- distribution. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 91, p. 719-729, 2009.
- SOLAROGLU, I.; KAPTANOGLU, E.; OKUTAN, O. et al. Magnesium sulfate treatment decreases caspase-3 activity after experimental spinal cord injury in rats. *Surg. Neurol.*, v. 64, p. 17-21, 2005.
- SONG, Y.; LIU, J.; ZHANG, F. et al. Antioxidant effect of quercetin against acute spinal cord injury in rats and its correlation with the p38MAPK/iNOS signaling pathway. *Life Sci.*, v. 92, p. 1215-1221, 2013.
- SOUZA, A.H.; CASTRO JR, C.J.; RIGO, F.K. et al. An Evaluation of the antinociceptive effects of Pha1b, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*, and ω -conotoxin MVIIA, a cone snail *Conus magus* toxin, in rat model of inflammatory and neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 33, p. 59-67, 2013.
- SOUZA, A.H.; FERREIRA, J.; CORDEIRO, M.N. et al. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Pha1b toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain*, v. 140, p. 115-126, 2008.
- SOUZA, A.H.; LIMA, M.C.; DREWES, C.C. et al. Antiallodynic effect and side effects of Pha1b, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with ω -conotoxin MVIIA and morphine. *Toxicon*, v. 58, p. 626-633, 2011.
- SPRINGER, J.E.; AZBILL, R.D.; KNAPP, P.E. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nature Medicine*, v. 5, p. 943-946, 1999.
- STAATS, K.A.; RILLAER, M.V.; SCHEVENEELS, W. et al. Dantrolene is neuroprotective in vitro, but does not affect survival in *sod1^{G93A}* mice. *Neuroscience*, v. 220, p. 26-31, 2012.
- STOKES, B.T.; FOX, P.; HOLLIDEN, G. Extracellular calcium activity in the injured spinal cord. *Exp. Neurol.*, v. 80, p. 561-572, 1983.
- STRAUS, F.H.; CHERONIS, N.D.; STRAUS, E. Demonstration of reducing enzyme systems in neoplasms and living mammalian tissues by triphenyltetrazolium chloride. *Science*, v. 108, p. 113-115, 1948.
- 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.
- SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N. et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*, v. 1, p. 17-25, 2004.
- SULLIVAN, P.G.; KRISHNAMURHTY, S.; PATEL, S.P. et al. Temporal characterization of mitochondrial bioenergetics after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 24, p. 991-999, 2007.
- 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, p. 353-356, 2004.
- SUZUKI, M.; NAGAI, Y.; WADA, K. et al. Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 429, p. 18-23, 2012.
- TAKAGI, T.; TAKAYASU, M.; MIZUNO, M. et al. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol. Med. Chir.*, v. 43, p. 20-30, 2003.
- TAKAHASHI, Y.; TSUJI, O.; KUMAGAI, G. et al. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells

- to treat spinal cord injury in mice. *Cell Transplant.*, v. 20, p. 727-739, 2011.
- TAKIZAWA, S.; MATSUSHIMA, K.; FUJITA, H. et al. A Selective N-Type Calcium Channel Antagonist Reduces Extracellular Glutamate Release and Infarct Volume in Focal Cerebral Ischemia *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 15, p. 611-618, 1995.
- 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, p. 813-819, 1953.
- TASKER, R.C.; SAHOTA, S.K.; COTTER, F.E. et al. Early postischemic dantrolene-induced amelioration of poly(ADP-Ribose) polymerase-related bioenergetic failure In neonatal rat brain slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 18, p. 1346-1356, 1998.
- TASKIRAN, D.; TANYALCIN, T.; SOZMEN, E.Y. et al. The effects of melatonin on the antioxidant systems in experimental spinal injury. *Int. J. Neurosci.*, v. 104, p. 63-73, 2000.
- TATOR, C.H. Strategies for recovery and regeneration after spinal cord injury. *Inj. Prev.*, v. 8, p. iv33-iv36, 2002.
- TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, v. 75, p. 15-26, 1991.
- TERLAU, H.; OLIVERA, B.M. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.*, v. 84, p. 41-68, 2004.
- TEWARIE, R.D.S.; HURTADO, A.; RITFELD, G.J. et al. Bone marrow stromal cells elicit tissue sparing after acute but not delayed transplantation into the contused adult rat thoracic spinal cord. *J. Neurotrauma*, v. 26, p. 2313-2322, 2009.
- THORELL, W.E.; LEIBROCK, L.G.; AGRAWAL, S.K. Role of RyRs and IP3 receptors after traumatic injury to spinal cord white matter. *J. Neurotrauma*, v. 19, p. 335-342, 2002.
- TOM, V.J.; HOULÉ, J.D. Intraspinial microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Exp. Neurol.*, v. 211, p. 315-319, 2008.
- TORRES, B.; SERAKIDE, R.; CALDEIRA, F. et al. The ameliorating effect of dantrolene on the morphology of urinary bladder in spinal cord injured rats. *Pathol. Res. Pract.*, v. 207, p. 775-779, 2011.
- TORRES, B.B.J.; CALDEIRA, F.M.C.; GOMES, M.G. et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. *Int. J. Exp. Path.*, v. 91, p. 530-536, 2010.
- TRIGGLE, D.J. Drug targets in the voltage-gated calcium channel family: why some are and some are not. *ASSAY Drug Dev. Technol.*, v. 1, p. 719-733, 2003.
- TWEDE, V.D.; MILJANJICH, G.; OLIVERA, B.M. et al. Neuroprotective and cardioprotective conopeptides: An emerging class of drug leads. *Curr. Opin.*


- Drug Discov. Devel.*, v. 12, p. 231-239, 2009.
- UCHITEL, O.D. Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon*, v. 35, p. 1161-1191, 1997.
- VAISHNAV, R.A.; SINGH, I.N.; MILLER, D.M. et al. Lipid peroxidation-derived reactive aldehydes directly and differentially impair spinal cord and brain mitochondrial function. *J. Neurotrauma*, v. 27, p. 1311-1320, 2010.
- VALENTINO, K.; NEWCOMB, R.; GADBOIS, T. et al. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 7894-7897, 1993.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VAN DEN BERG, M.E.L.; CASTELLOTE, J.M.; MAHILLO-FERNANDEZ, I. et al. Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Neuroepidemiol.*, v. 34, p. 184-192, 2010.
- VANICKÝ, I.; URDZÍKOVÁ, 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, p. 1399-1407, 2001.
- VARIZI, N.D.; LEE, Y.-S.; LIN, C.-Y et al. NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 995, p. 76-83, 2004.
- VERA-PORTOCARRERO, L.P.; MILLS, C.D.; YE, Z. et al. Rapid changes in expression of glutamate transporters after spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 927, p. 104-110, 2002.
- VERWEIJ, B.H.; MUIZELAAR, J.P.; VINAS, F.C. et al. Improvement in mitochondrial dysfunction as a new surrogate efficiency measure for preclinical trials: dose-response and time-window profiles for administration of the calcium channel blocker Ziconotide in experimental brain injury. *J. Neurosurg.*, v. 93, p. 829-834, 2000.
- VERWEIJ, B.H.; MUIZELAAR, J.P.; VINAS, F.C. et al. Mitochondrial dysfunction after experimental and human brain injury and its possible reversal with a selective N-type calcium channel antagonist (SNZ-111). *Neurol. Res.*, v. 19, p. 334-339, 1997.
- WADA, K.; CHATZIPANTELI, K.; BUSTO, R., DIETRICH, W.D. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosurg.*, v. 89, p. 807-818, 1998.
- WALLACE, M.S. Ziconotide: a new nonopioid intrathecal analgesic for the treatment of chronic pain. *Expert Rev Neurother.*, v. 6, p. 1423-1428, 2006.
- WANG, Y.X.; BOWERSOX, S.S. Analgesic properties of ziconotide, a selective blocker of N-type neuronal calcium channels. *CNS Drug Rev.*, v. 6, p. 1-20, 2000.
- WARD, A.; CHAFFMAN, M.O.; SORKIN, E.M. Dantrolene. *Drugs*, v. 32, p. 130-168, 1986.
- WATSON, G.B.; LOPEZ, O.T.; CHARLES, V.D. et al. Assessment of long-term effects of transient anoxia on metabolic activity of rat hippocampal slices using triphenyltetrazolium chloride. *J. Neurosci. Meth.*, v. 53, p. 203-208, 1994.

- WATTERS, M.R.; STOMMEL, E.W. Marine neurotoxins: envenomations and contact toxins. *Curr. Treat. Options Neurol.*, v. 6, p. 115-123, 2004.
- WERMELING, D.; DRASS, M.; ELLIS, D. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intrathecal ziconotide in chronic pain patients. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 43, p. 624-636, 2003.
- WESTENBROEK, R.E.; HOSKINS, L.; CATTERALL, W.A. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J. Neurosci.*, v. 18, p. 6319-6330, 1998.
- WINGRAVE, J.M.; SCHAECHER, K.E.; SRIBNICK, E.A. et al. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J. Neurosci. Res.*, v. 73, p. 95-104, 2003.
- WRIGHT, C.E.; ANGUS, J. Effects of N-, P- and Q-type neuronal calcium channel antagonists on 604 mammalian peripheral neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.*, v. 119, p. 49-56, 1999.
- WU, K.L.H.; HSU, C.; CHAN, J.Y.H. Nitric oxide and superoxide anion differentially activate poly(ADP-ribose) polymerase-1 and Bax to induce nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and mitochondrial release of cytochrome c after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 26, p. 965-977, 2009.
- WU, Y.; ZHENG, M.; WANG, S. et al. Spatiotemporal pattern of TRAF3 expression after rat spinal cord injury. *J. Mol. Hist.*, DOI 10.1007/s10735-014-9575-2, 2014.
- XIONG, Y.; PETERSON, P.L.; VERWEIJ, B.H. et al. Mitochondrial dysfunction after experimental traumatic brain injury: combined efficacy of SNX-111 and U-101033E. *J. Neurotrauma*, v. 15, p. 531-544, 1998.
- XIONG, Y.; RABCHEVSKY, A.G.; HALL, E.D. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J. Neurochem.*, v. 100, p. 639-649, 2007.
- XU, G.-Y.; HUGHES, M.G.; YE, Z. et al. Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord. *Exp. Neurol.*, v. 187, p. 329-336, 2004.
- XU, W.; CHI, L.; XU, R. et al. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 43, p. 204-213, 2005.
- YAMADA, K.; TERAOKA, S.; MORITA, T. ω-Conotoxin GVIA protects against ischemic-induced neuronal death in the Mongolian gerbil but not against quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat. *Neuropharmacol.*, v. 33, p. 251-254, 1994.
- YAMAGISHI, F.; KOMODA, T.; OHNISHI, K. et al. Protective effect of dantrolene sodium on carbon tetrachloride induced liver injury in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, v. 82, p. 237-240, 1993.
- YAMAMOTO, T.; SAKASHITA, Y. Differential effects of intrathecally administered N- and P-type voltage-sensitive calcium channel blockers upon two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Brain Res.*, v. 794, p. 329-332, 1998.
- YIP, P.K.; MALASPINA, A. Spinal cord trauma and the molecular point of no return. *Molec. Neurodegener.*, v. 7, p. 1-10, 2012.

- YOO, A.S.; CHENG, I.; CHUNG, S. et al. Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron*, v. 27, p. 561-572, 2000.
- YOUNG, W.; YEN, V.; BLIGHT, A. Extracellular calcium ionic activity in experimental spinal cord contusion. *Brain Res.*, v. 253, p. 105-113, 1982.
- YU, Z.; LUO, H.; FU, W.; MATTSON, M.P. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp. Neurol.*, v. 155, p. 302-314, 1999.
- ZALK, R.; LEHNART, S.E.; MARKS, A.R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 76, p. 367-385, 2007.
- ZHANG, H.; WU, F.; KONG, X. et al. Nerve growth factor improves functional recovery by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury. *J. Transl. Med.*, v. 12, p. 1-15, 2014.
- ZHANG, L.; ANDOU, Y.; MASUDA, S. et al. Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci. Lett.*, v. 158, p. 105-108, 1993.
- ZHANG, N.; YIN, Y.; XU, S.J. et al. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Indian J. Med. Res.*, v. 135, p. 287-296, 2012.
- ZHANG, Z.; 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.
- ZHAO, F.; LI P.; CHEN, S.R.W. et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 13810-13816, 2001.
- ZHAO, R.-R.; ANDREWS, M.R.; WANG, D. et al. Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury. *Eur. J. Neurosci*, v. 38, p. 2946-2961, 2013.
- ZIEMINSKA, E.; GORDON-KRAJCER, W.; MATYJA, E. et al. Ryanodine receptors participate in the induction of mitochondrial permeability transition and excitotoxic damage of cultured rat cerebellar granule cells. *Acta Neurobiol. Exp.*, v. 61, p. 215, 2001.
- 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, p. 8785-8789, 2002.
- ZOTTI, A.; GIANESELLA, M.; GASPARINETTI, N. et al. A preliminary investigation of the relationship between the “moment of resistance” of the canine spine, and the frequency of traumatic vertebral lesions at different spinal levels. *Res. Vet. Sci.*, v. 90, p. 179-184, 2011.

ANEXO

Anexo 1

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 226 / 2012, relativo ao projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES E ANTIINFLAMATÓRIOS DA ÔMEGA-CONOTOXINA MVIIA NO TRATAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO TRAUMA MEDULAR", que tem como responsável Eliane Gonçalves de Melo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/10/2012. Este certificado expira-se em 11/10/2017.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 226 / 2012, related to the Project entitled "EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF OMEGA-CONOTOXIN MVIIA IN SPINAL CORD INJURED RATS", under the supervision of Eliane Gonçalves de Melo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/10/2012. This certificates expires in 11/10/2017.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 11/10/2012.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

Anexo 2 – 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.