

MARIA PAULA RAJÃO COSTA COELHO

**EFEITO NEUROPROTETOR DA TOXINA Ph α 1 β RECOMBINANTE NO
TRAUMA MEDULAR AGUDO EM RATOS**

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

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Prof^a Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte - MG

Escola de Veterinária- UFMG

2016

C672e Coelho, Maria Paula Rajão Costa, 1990-
Efeito neuroprotetor da toxina Ph α 1 β recombinante no trauma medular agudo em ratos /
Maria Paula Rajão Costa Coelho. – 2016.
76 p. : il.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

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

CDD – 636.089 7

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA PAULA RAJÃO COSTA COELHO

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

Aprovada em 28 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Eliane Gonçalves de Melo

Profª. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador

Nancy Scardua Binda

Profª. Nancy Scardua Binda
Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa BH - IEP

Benito Soto Blanco

Prof. Benito Soto Blanco
Escola de Veterinária - UFMG



“As pessoas consideram caminhar sobre as águas ou pelos ares um milagre. Mas eu penso que o verdadeiro milagre não é caminhar nem sobre a água nem pelos ares, mas caminhar sobre a Terra. Todos os dias nós estamos envolvidos em um milagre, mas nós nem o percebemos: um céu azul, nuvens brancas, folhas verdes, os olhos profundos e curiosos de uma criança, nossos próprios olhos. Tudo é um milagre”.

Thích Nhất Hạnh

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de qualquer coisa, agradeço a Deus por cuidar com tanto carinho de cada detalhe da minha vida e por me fortalecer mais a cada dia. Fé e gratidão sempre! “Pedi e vos será concedido; buscai, e encontrareis; batei, e a porta será aberta para vós. Pois todo o que pede recebe; o que busca encontra; e a quem bate, se lhe abrirá” Mateus, 7.7.

À minha família, minha base, meu incentivo, meu combustível para seguir em frente. Mãe, pai e Ciça, meus maiores exemplos de amor, fé, caráter e dedicação, obrigada pelo apoio sempre. Avós Mariana e Tatá, tias, tios, primos e Maria Cruzinha, essa vitória também é de vocês!

Agradeço à professora Eliane Gonçalves de Melo pelas orientações, confiança, pela calma contagiante e pelos ensinamentos. Espero poder dar continuidade ao nosso trabalho de forma cada vez melhor nos próximos anos!

Ao professor Marcus Vinícius Gomez pela parceria e por permitir o desenvolvimento desse trabalho em diversos aspectos.

À professora Marília Martins Melo e ao professor Benito Soto-Blanco por permitirem o desenvolvimento de parte deste trabalho no laboratório de Toxicologia.

À toda equipe de orientados e alunos de iniciação científica da Professora Eliane. Paula Milani, mais que uma companheira de mestrado, uma amiga que ganhei! Agradeço pela ajuda indispensável, pelos momentos de alegrias e dificuldades divididos e pela amizade para a vida toda. Carla Osorio, o elemento que faltava para a realização do estudo, agradeço pelas orientações, pela calma nos momentos de dificuldade e por todo o empenho na realização das cirurgias. À Karen Maciel e Pablo Herthel, pela boa vontade em dividir comigo seus aprendizados! Ao Sebastian Gutierrez, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos. Aos alunos de iniciação científica Ana Clara de Sá, Carolina Guimarães e Fernando Oliveira, agradeço pela ajuda na realização do trabalho. Em especial à aluna de iniciação científica Tayane Gouveia, agradeço por ter nos acompanhado desde o início do estudo, sempre com boa vontade em ajudar.

A todos os novos amigos e parceiros do IEP-Santa Casa, em especial Prof. Marcus Vinicius Gomez, Nancy Scardua, Nathalia Virtude e Fernando Rubatino. Gratidão imensa pela ajuda imprescindível.

A todo o Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, em especial Professores Paulo Ricardo de Oliveira Paes e Professora Fabíola de Oliveira Paes Leme, por permitirem a execução das análises clínicas no laboratório, à Nathalia Galuppo, minha amiga e “quebradora de galhos” oficial, e à Ayla Watanabe, pela boa vontade em auxiliar na realização das análises clínicas e nas discussões de casos.

Aos amigos, agradeço pelo apoio, companheirismo e compreensão nos momentos de ausência e estresse. Aos amigos companheiros de mestrado, agradeço pela amizade, cumplicidade e pelos bons momentos “currilares e extra-curriculares”.

A todos os companheiros do Hospital Veterinário da UFMG agradeço pela ótima convivência e cooperação. Ao pessoal da esterilização, enfermagem e limpeza, agradeço pela contribuição na fase de cirurgia dos animais. Agradeço à direção do Hospital Veterinário, em especial Professor Álan Maia Borges, e à Professora Patrícia Maria Colletto, por permitirem a realização dos procedimentos cirúrgicos na sala de técnica cirúrgica. A todos os residentes e veterinários, agradeço pela colaboração na condução dos casos clínicos em prol dos nossos pacientes, em especial Isabela Faria, Stephanie Branco, Dayane Pires, Túlio Avelar, Luiz Caiian e Dayana Vaz. Aos funcionários da limpeza, recepção, tesouraria, central de exames, farmácia, diretoria, informática, serviços gerais, portaria, segurança e enfermeiros agradeço imensamente pela colaboração e ótima convivência.

Aos professores Benito Soto Blanco, Nancy Scardua Binda, Juliana Figueira da Silva e Carla Maria Osório, constituintes da banca examinadora, agradeço por terem aceitado o convite para contribuir com o trabalho.

À Maria Adelaide Fernandes, José Batista (biotério da Faculdade de Farmácia – UFMG) e porteiros da Farmácia, pela cooperação na aquisição dos animais e transporte dos intermináveis sacos de ração e maravalha.

À Flávia Salazar e Rafaela Viana do departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, agradeço pela colaboração nas constantes visitas ao departamento.

Aos porteiros do departamento de clínica e cirurgia veterinárias, agradeço pela colaboração imensa no dia a dia. Em especial ao meu amigo Jeferson Brandão (Jeff) e ao Lindonei Cardoso (Nei).

A todos os funcionários do Colegiado de Pós Graduação em Ciência Animal, em especial Luzete Ornelas Queiroz, pela paciência, boa vontade e compreensão.

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

Aos animais, em especial animais utilizados nesse estudo, minha Lalazinha e pacientes do setor de neurologia do HV-UFMG, agradeço e dedico esse estudo. Que o conhecimento gerado possa ser empregado para um atendimento de cada vez mais qualidade para os nossos pacientes!

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	11
	LISTA DE FIGURAS.....	11
	LISTA DE QUADROS.....	12
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
	RESUMO.....	13
	ABSTRACT.....	14
1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1.	Fisiopatogenia do trauma medular agudo.....	17
2.1.1.	Lesão medular primária e lesão medular secundária.....	17
2.1.2.	Produção de espécies reativas de oxigênio.....	19
2.1.3.	Excesso de cálcio intracelular.....	23
2.1.4.	Excitotoxicidade.....	22
2.1.5.	Inflamação e resposta imunológica.....	22
2.1.6.	Morte celular: necrose e apoptose.....	25
2.2.	Utilização de bloqueadores de canais para cálcio como agentes neuroprotetores.....	25
2.3.	Toxina Phα1β.....	26
2.4.	Estudo experimental das lesões medulares.....	37
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1.	Animais.....	28
3.2.	Grupos experimentais.....	28
3.3.	Toxina Phα1β recombinante.....	33
3.4.	Procedimentos anestésico e cirúrgico e cuidados pós-operatórios.....	31
3.5.	Tratamentos.....	32
3.6.	Avaliação dos efeitos colaterais.....	35
3.7.	Avaliação da capacidade motora em campo aberto.....	35
3.8.	Eutanásia e coleta de materiais.....	39
3.9.	Avaliação hematológica, bioquímica plasmática e urinálise.....	37
3.10.	Quantificação das espécies reativas de oxigênio por ensaio fluorimétrico DCFDA.....	38
3.11.	Avaliação da peroxidação lipídica por método TBARS.....	38
3.12.	Quantificação do teor de proteína pelo método de Bradford.....	39
3.13.	Avaliação da expressão gênica relativa de Bax, Bcl-xl, caspase-3, caspase-8 e caspase-9 por qRT-PCR em tempo real.....	43
3.14.	Análise estatística.....	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1.	Modelo experimental de trauma medular agudo.....	42
4.2.	Tratamentos.....	48
4.3.	Avaliação clínica e laboratorial dos efeitos colaterais da Phα1β recombinante.....	43

4.4.	Avaliação da capacidade motora em campo aberto.....	49
4.5.	Efeito da Ph α 1 β recombinante sobre níveis de ERO após lesão medular.....	52
4.6.	Efeito da Ph α 1 β recombinante sobre peroxidação lipídica após lesão medular.....	54
4.7.	Efeito da Ph α 1 β recombinante sobre a expressão de fatores relacionados à apoptose após lesão medular.....	56
5.	Conclusões.....	60
6.	Anexo.....	61
7.0	Referências bibliográficas.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes e sequências de nucleotídeos dos primers iniciadores para qRT-PCR em tempo real.....	40
Tabela 2 - Relação da apresentação de efeitos colaterais com diferentes doses de aplicação da Pha1 β recombinante 1 hora após o trauma medular agudo em ratos.....	44
Tabela 3 - Valores médios de escores de deambulação por escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) de ratos submetidos à trauma medular agudo contusivo, avaliados imediatamente, em média 10 horas (dia 1) e 30 horas (dia 2) após indução do trauma medular. Os animais foram submetidos à avaliação anterior ao procedimento cirúrgico, em que apresentaram escore máximo de 21 pontos.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela via da xantina oxidase.....	20
Figura 2 - Representação esquemática das vias de apoptose após trauma medular espinal.....	24
Figura 3 - Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar com aparelho indutor de trauma Mascis Impactor. A) Indução anestésica em câmara com isoflurano. B) Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa aquecida. Realização de antissepsia com iodopovidona degermante em região dorsal do tronco tricotomizada. Manutenção anestésica por meio de máscara com isoflurano em sistema semiaberto. C) Afastamento da musculatura epaxial e identificação dos processos espinhosos. D) Osteotomia do processo espinhoso com auxílio de pinça de Halsted. E) Desgaste da lâmina dorsal com drill pneumático neurológico. F) Visualização da medula espinal após laminectomia dorsal. G) Utilização do sistema de estabilização vertebral “clamping system”. H) Posicionamento do animal no aparelho Mascis Impactor.....	33
Figura 4 - Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar com aparelho Mascis Impactor A) Animal posicionado no aparelho indutor de trauma espinal Mascis Impactor. Processos espinhosos de T10 e T12 individualizados e estabilizados pelo sistema de estabilização do aparelho, haste de impacto do aparelho tocando a medula na região de laminectomia dorsal (T11). B) Hemorragia sub-aracnóidea (seta) após trauma medular por queda de haste a 25 mm de altura. C) Recuperação anestésica em caixa individual com aquecimento por cobertor e oxigenoterapia. D) Aplicação intratecal realizada por meio de punção do espaço subaracnóide entre a quinta e sexta vértebras lombares por seringa de Hamilton 701LT acoplada a agulha 26G.....	34

Figura 5 -	Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos valores de hemácias (A), hemoglobina (B) e leucócitos totais (C) de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinhal (demais grupos), tendo sido tratados com placebo (CN,CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante.....	46
Figura 6 -	Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de ALT (A), AST (B) e uréia (C) e creatinina (D) de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinhal (demais grupos), tendo sido tratados com placebo (CN,CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante.....	47
Figura 7 -	Representação gráfica de médias e desvio-padrão das concentrações plasmáticas (A) e urinárias (B) de cálcio e da concentração plasmática de FA (C) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinhal (demais grupos), tendo sido tratados com placebo (CN,CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante.....	48
Figura 8 -	Avaliação da função motora em campo aberto por escala de BBB em ratos Wistar.....	51
Figura 9-	Efeito da toxina Ph α 1 β recombinante sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) 48 horas após trauma medular.....	53
Figura 10-	Efeito da toxina Ph α 1 β recombinante sobre a peroxidação lipídica avaliada pelos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido medular 48 horas após trauma medular.....	55
Figura 11-	Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados á apoptose Bax (A), Bcl-xl (B), Caspase-3 (C), Caspase-8 (D) e Caspase-9 (E).....	58
Figura 12	Figura 12- Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados á apoptose Caspase-3(A), Caspase-8 (B) e Caspase-9 (C).....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Tempo decorrido após trauma medular, fases relacionadas e principais eventos observados após lesão inicial.....	18
Quadro 2 -	Distribuição dos ratos nos diferentes grupos experimentais e protocolos de tratamento após laminectomia (CN) e trauma medular contusivo (CP, PH25,PH50, PH100).....	30
Quadro 3-	Características de deambulação de membros pélvicos (MPs) e seus respectivos escores segundo avaliação de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação de capacidade motora em ratos após trauma medular torácico agudo.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

μg - Micrograma
 μL - Microlitro
ADP - Difosfato de adenosina
AIF - Fator indutor de apoptose
AMP - Monofosfato de adenosina
ALT - Alanina aminotransferase
AMPA - Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropionato
ANOVA - Análise de variância
APAF-1 - Protease ativadora da apoptose-1
AST - Aspartato aminotransferase
ATP - Trifosfato de adenosina
BBB - Basso, Beattie e Bresnahan
 Ca^{+2} - Cálcio
CCVD - Canais para cálcio voltagem dependentes
cDNA - DNA complementar
CEUA - Comissão de ética no uso de animais
Cm - Centímetro
CN - Controle negativo
CP - Controle positivo
CT - *Threshold*
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EROs - Espécies reativas de oxigênio
EV - Escola de veterinária
FA - Fosfatase alcalina
g - Grama
IM - Intramuscular
IT - Intratecal
LM - Lesão medular
LMA - Lesão medular aguda
MASCIS - Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
MDA - Malondialdeído
NMDA - N-Metil-D-aspartato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PH25 - Grupo experimental que recebeu dose de 25 pmol da toxina Ph α 1 β
PH50 - Grupo experimental que recebeu dose de 50 pmol da toxina Ph α 1 β
PH 100 - Grupo experimental que recebeu dose de 100 pmol da toxina Ph α 1 β
RE - Retículo endoplasmático
SC - Subcutâneo
SNC - Sistema Nervoso Central
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TM - Trauma medular
TMA - Trauma medular agudo
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

α - Alfa

β - Beta

RESUMO

O trauma medular é afecção comum nas medicinas humana e veterinária, com graves consequências para o indivíduo acometido e para a sociedade. A lesão à medula espinhal ocasiona dano ao tecido nervoso por mecanismos primários e secundários, sendo o influxo exacerbado de cálcio, principalmente devido à ativação de canais para cálcio voltagem-dependentes (CCVD), um evento secundário considerado crítico na fisiopatogenia da injúria medular. O peptídeo Ph α 1 β obtido da purificação do veneno total da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* é capaz de bloquear CCVD e, assim, reduzir o influxo de cálcio. Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação intratecal de diferentes doses da toxina Ph α 1 β recombinante em ratos submetidos a trauma medular agudo experimental. Foram utilizados 30 ratos machos adultos, variedade Wistar, aleatoriamente divididos em cinco grupos. Os animais do grupo CN foram submetidos à laminectomia dorsal. Nos demais grupos, além da laminectomia, os animais foram submetidos à trauma medular agudo contusivo. Realizou-se aplicação intratecal de placebo nos animais dos grupos controle e das doses de 25,50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante nos animais tratados. 48 horas após a intervenção cirúrgica, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de sangue, urina e segmentos de medula espinhal, para quantificação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica e avaliação da expressão gênica de fatores relacionados à apoptose através de técnica de qRT-PCR. Observou-se redução de peroxidação lipídica nos três grupos submetidos ao tratamento, o que sugere ação neuroprotetora desta toxina.

Palavras-chave: Lesão medular, *Phoneutria nigriventer*, Mascis impactor, cálcio, apoptose, peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio, qRT-PCR, em tempo real.

ABSTRACT

*Spinal cord injury is a common disease in human and veterinary medicine, with serious consequences for the one affected and for society. It causes damage to the nervous tissue by primary and secondary mechanisms, being exacerbated influx of calcium, mainly due to the activation voltage-dependent calcium channels, a secondary event considered critical in the pathogenesis of spinal cord injury. The Pha1 β peptide obtained from the purification of the whole venom of *Phoneutria nigriventer* spider is able to block voltage-dependent calcium channels and thereby reduce calcium influx. This study aimed to evaluate the effect of intrathecal administration of different doses of recombinant Pha1 β toxin in spinal cord experimentally injured rats. Thirty male Wistar rats were randomly distributed into five groups. Animals belonging to CN group underwent dorsal laminectomy. In other groups, beyond laminectomy, animals underwent acute spinal cord contusive trauma. Animals belonging the control groups received placebo intrathecally administered and treated animals received 25, 50 e 100 pmol of the toxin by the same via. Forty-eight hours after surgery animals were euthanized and were collected blood and urine samples, besides and spinal cord segments, for reactive oxygen species and lipid peroxidation quantification and to assess gene expression of apoptosis- related genes by qRT-PCR. It showed reduction in lipid peroxidation in all three groups who had received the toxin, wich suggests neuroprotector effect.*

Key Words: Spinal cord injury, *Phoneutria nigriventer*, Mascis impactor, calcium, apoptosis, lipid peroxidation, reactive oxygen species, qRT-PCR, real time.

1. INTRODUÇÃO

As lesões na medula espinhal são eventos comuns nas medicinas humana e veterinária, podendo provocar graves déficits neurológicos que afetam as funções motora, sensitiva e autonômica (Melo et al., 2013).

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

Na medicina veterinária, a lesão medular aguda (LMA) é uma afecção comum que pode levar a déficits neurológicos graves e permanentes (Rowland et al., 2008) ou determinar a morte ou eutanásia do animal afetado (Colter e Rucker, 1988). A exata incidência de LMA nos animais é desconhecida (Webb et al., 2010). Sabe-se que, assim como na medicina humana, a principal causa de lesão medular nos animais são os traumas, sobretudo devido a atropelamentos (66%), violência (9%) e quedas (7%) (Figuera et al., 2008; Mendes e Arias, 2012). Além disso, herniações intervertebrais agudas e embolismo fibrocartilagenoso/tromboembolismo também são causas comuns de LMA em animais domésticos (Olby, 2010).

Apesar dos efeitos devastadores e de sua gravidade, o trauma medular, geralmente, não resulta em ruptura completa das fibras axonais e/ou corpos neuronais, o que permite desenvolvimento e aplicação de terapias farmacológicas para essa afecção (Rabchevsky et al., 2011). O entendimento dos processos fisiopatológicos que ocorrem na lesão medular e de como esses componentes interagem gerando déficits funcionais é imprescindível para o desenvolvimento de terapias efetivas. Há décadas, a fisiopatologia e terapia das injúrias medulares têm sido exaustivamente pesquisadas. A reversão da paralisia gerada por trauma medular é um dos maiores desafios em toda a pesquisa da área de neurociências (Rowland et al., 2008). Não há ainda, no entanto, tratamento efetivo para as injúrias espinhais agudas ou crônicas (Onose et al., 2009; Rabchevsky et al., 2011). Nesse contexto, estudos que investiguem os mecanismos envolvidos na fisiopatogenia do trauma medular e suas possíveis estratégias terapêuticas se tornam interessantes.

Sabe-se que a lesão traumática aplicada à medula espinhal ocasiona dano ao tecido nervoso por mecanismos primários e secundários (Olby, 2010). A injúria medular primária, de caráter irreversível, consiste na ruptura mecânica direta de vias neurais, vasos sanguíneos e membranas celulares e morte celular, principalmente por necrose (Kwon et al., 2004). Instala-se, então, a injúria medular secundária, que se resume em cascatas fisiopatológicas envolvendo disfunção vascular, edema, isquemia, excitotoxicidade, alterações iônicas, inflamação e produção de

radicais livres que, em conjunto, podem levar à morte celular por necrose ou apoptose (Rowland et al., 2008).

Os déficits neurológicos permanentes após TMA estão principalmente relacionados à extensão das lesões secundárias (Oliveira, 2014). O excesso de cálcio intracelular é considerado crítico na fisiopatogenia da injúria medular secundária, sendo importante via de morte neuronal (Greenberg, 1997; Melo et al., 2013; Oliveira, 2014) e relevante alvo farmacológico a fim de promover neuroproteção.

Os canais para cálcio voltagem-dependentes (CCVD) são encontrados na maioria das células excitáveis, dentre elas os neurônios da medula espinhal (Carlin et al., 2000). Participam de atividades importantes como excitabilidade neuronal, liberação de neurotransmissores e iniciação de diversos mecanismos de sinalização intracelular (Ghosh e Greenberg, 1995; Maciel et al., 2014). A ativação desses canais constitui uma das mais importantes vias de entrada de cálcio (Ca^{+2}) e representa um passo chave na regulação dos processos celulares no TMA (Uchitel, 1997). A utilização de substâncias bloqueadoras dos CCVDs tem demonstrado efeito neuroprotetor em lesões traumáticas e isquêmicas da medula (Burns et al., 1999; Lavor, 2013; Oliveira, 2014) e do encéfalo (Hovda et al., 1994; Bowersox et al., 1997; Berman et al., 2000).

Os venenos encontrados na natureza contêm uma série de proteínas e peptídeos que bloqueiam receptores ou ativam canais iônicos como meio de produção de choque, paralisia e morte de sua presa (Silva, 2014). Alternativamente, tais toxinas têm sido alvo de pesquisas que têm revelado seu potencial farmacológico (Estrada et al., 2007; Guatimosim et al., 1997; Oliveira, 2012; Oliveira, 2014; Pinheiro, 2007; Souza et al., 2008).

O peptídeo Ph α 1 β (também denominado PnTx3.6), obtido da purificação do veneno total da aranha “armadeira” *Phoneutria nigriventer*, é capaz de bloquear CCVD de alta voltagem de maneira reversível e não específica (Rigo et al., 2013), com maior proporção de bloqueio de canais do tipo N (Vieira et al., 2005). Sua utilização na injúria medular aguda foi avaliada em ratos por Drumond (2010) tendo sido observada discreta melhora na preservação morfológica da medula espinhal.

A produção de toxinas por meio de diferentes técnicas de expressão gênica recombinante permitiu a obtenção de proteínas de pureza e quantidade suficientes para sua caracterização funcional e aplicação em pesquisas (Gurkan e Ellar, 2005). A Ph α 1 β recombinante (CTK 01512-2), obtida por meio de tecnologia de DNA recombinante com sequência de plasmídeo expressa por *Escherichia coli*, demonstrou resposta analgésica similar à da toxina nativa em estudo de dor por meio de teste de formalina em ratos (Souza et al., 2008).

Com intuito de facilitar a compreensão dos mecanismos envolvidos na injúria medular e possibilitar a avaliação de diferentes tratamentos, foram desenvolvidos modelos de lesão medular experimental em animais. O modelo de trauma medular contusivo pelo aparelho Mascis (*Multicenter animal spinal cord injury study*) Impactor é o mais amplamente empregado no estudo de trauma medular em ratos (Young, 2009).

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação intratecal de diferentes doses da toxina Ph α 1 β recombinante 1 hora após o trauma medular agudo através de avaliação clínica e laboratorial de toxicidade, classificação da locomoção em campo aberto, quantificação

de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e avaliação da expressão gênica de fatores relacionados a apoptose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiopatogenia do trauma medular agudo

2.1.1 Lesão medular primária e lesão medular secundária

O TMA resulta em mecanismos de injúria à medula espinhal, que podem ser divididos nas fases aguda, subaguda e crônica e que se sobrepõem durante o desenvolvimento da lesão medular (Quadro 1) (Chacón e Nieto-Sampietro, 2005; Oyinbo, 2011).

As lesões primárias aplicadas à medula espinhal são, com maior frequência, do tipo compressivas-contusivas, em que componentes da coluna vertebral, incluindo discos intervertebrais e ligamentos, exercem força sobre a medula causando lesão traumática imediata e compressão contínua (Baptiste e Fehlings, 2006). Além disso, outros mecanismos físicos como transsecção, concussão, laceração, estiramento e movimentos de aceleração-desaceleração podem estar envolvidos na injúria à medula (Sekhon e Fehlings, 2001).

A injúria medular aguda, ou lesão primária, é causada pela transferência de força para a medula espinhal, tendo início segundos após o insulto medular e podendo se estender durante as fases subaguda a crônica por semanas a meses após o trauma inicial (Donnelly e Popovich, 2008; Fehlings e Nguyen, 2010). Resulta em ruptura imediata de vias neurais, vasos sanguíneos e membranas celulares, que geram hemorragia, isquemia, edema e rápida morte de neurônios e células da glia, principalmente por necrose (Grill, 2005; Severo et al., 2007; Oyinbo, 2011). Instala-se, em minutos, a fase subaguda ou lesão secundária, definida por cascata de eventos secundários como alterações vasculares, edema, isquemia, excitotoxicidade, resposta inflamatória e produção de radicais livres, que podem levar à morte celular por necrose ou apoptose e ao impedimento da recuperação neurológica (Sekhon e Fehlings, 2001; Cadotte e Fehlings, 2011; Jia et al., 2013).

A extensão das alterações histológicas iniciais e da lesão medular secundária subsequente está diretamente relacionada à quantidade de energia transferida à medula espinhal no momento do impacto (Kwon et al., 2004). Sabe-se que os mecanismos de lesão primária raramente resultam em rompimento completo da medula, havendo continuidade do tecido principalmente por meio de axônios na região sub-pial (Rowland et al., 2008). Dessa forma, as intervenções terapêuticas visam minimizar a injúria secundária e proteger o tecido que se manteve intacto após lesão medular primária (Kwon et al., 2004).

A ruptura mecânica da microvasculatura medular causa hemorragia petequial e trombose intravascular, que, em conjunto com vasoespasmo e edema gerados pela liberação de substâncias vasoativas, levam à hipoperfusão e isquemia do tecido medular. Além disso, a perda dos mecanismos de auto-regulação da medula associada à hipovolemia, hipotensão sistêmica e aumento da pressão intersticial também contribuem para a hipoperfusão e isquemia do tecido medular, que são considerados eventos importantes da lesão medular secundária (Tator e Fehlings, 1991; Levi et al., 1993).

Quadro 1 – Tempo decorrido após trauma medular, fases relacionadas e principais eventos observados após lesão inicial

TEMPO APÓS TRAUMA MEDULAR			
	0 A 48 HORAS	15 MINUTOS A 2 SEMANAS	> 2 SEMANAS
FASE DA LESÃO	PRIMÁRIA IMEDIATA (AGUDA)	SECUNDÁRIA (SUB-AGUDA)	SECUNDÁRIA (CRÔNICA)
PRINCIPAIS EVENTOS	Morte celular pela lesão direta	Morte celular pela lesão direta	
	Hemorragia	Hemorragia	
	Isquemia	Isquemia	
	Edema	Edema	
	Desequilíbrio iônico	Desequilíbrio iônico	
	Acúmulo de neurotransmissores	Acúmulo de neurotransmissores	
	Comprometimento de membrana plasmática	Comprometimento de membrana plasmática	
	Necrose	Necrose	
	Vasoespasmó	Vasoespasmó	
	Início das alterações funcionais	Progressão das alterações funcionais	
	Hipotensão sistêmica	Produção de espécies reativas de oxigênio	
		Peroxidação lipídica	
		Excitotoxicidade	
		Depleção energética e redução de ATP	
		Recrutamento e invasão de células imunológicas	
		Liberação de citocinas	
		Morte celular mediada por inflamação	
		Desmielinização de axônios sobreviventes	Desmielinização contínua
		Apoptose	Apoptose contínua
		Início de cavitação central	Cavitação central contínua
		Início da formação de cicatriz glial	Continuidade de formação de cicatriz glial
			Degeneração Walleriana
			Estabilização da lesão
			Processos neuroregenerativos

2.1.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

As alterações vasculares geram redução do aporte de oxigênio e glicose, havendo falha nos mecanismos celulares (Hulsebosch, 2002). Após período de isquemia, ocorre hiperemia com reperfusão do tecido medular (Rowland et al., 2008). Apesar de o retorno de aporte sanguíneo a um órgão isquêmico ser essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, a reperfusão pode agravar as lesões produzidas na fase de isquemia, principalmente devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), conceito conhecido como paradoxo do oxigênio (Castro e Silva et al., 2002). Há diversas vias de formação de ERO como ativação da cadeia respiratória mitocondrial, NADPH oxidase, reação de Fenton e xantina oxidase, sendo esta última considerada a via principal (Figura 1) (Ribeiro et al., 2005).

No TMA, os níveis de ERO produzidos geralmente ultrapassam a capacidade fisiológica de neutralização dos antioxidantes endógenos. Assim, os radicais livres podem gerar oxidação progressiva dos lipídeos de membranas celulares, processo chamado de peroxidação lipídica. Trata-se de reação em cascata, uma vez que gera mais EROs, que são capazes de propagar o estresse oxidativo através da superfície da célula (Hall, 1996). Além disso, o estresse oxidativo também é capaz de alterar o metabolismo mitocondrial, gerar dano ao DNA e proteínas associadas, lise celular, alteração da homeostase do cálcio e inibir a bomba de sódio e potássio, contribuindo para a indução de colapso metabólico e consequente morte celular de neurônios e células da glia (Cuzzocrea et al., 2001).



Figura 1 – Representação esquemática de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela via da xantina oxidase. Durante período de isquemia do tecido medular ocorre aumento de cálcio intracelular devido à disfunção da bomba de cálcio, o que ativa as proteases intracelulares moduladas pela calmodulina (como a calpaína), que transformam a xantina desidrogenase em xantina oxidase. Há acúmulo dessa enzima nas células, uma vez que seu consumo se dá na presença de oxigênio, quando é capaz de promover a oxidação da hipoxantina, produto do metabolismo da adenosina-trifosfato (ATP) que também se acumula na ausência de aporte de oxigênio. Com a reperfusão, a hipoxantina acumulada é oxidada pela ação da xantina oxidase, realizando transferência de elétrons para o oxigênio, que se torna uma ERO (Adaptado de Yoshida, 1996).

2.1.3 Excesso de cálcio intracelular

O cálcio é importante sinalizador celular que regula diversos processos neuronais, como a liberação de neurotransmissores, transcrição gênica, proliferação celular, entre outros. O seu nível intracelular é determinado pelo equilíbrio de sinais que determinam sua entrada e liberação de reservas intracelulares (Berridge, 1998; Triggle, 2003; Terlau e Olivera, 2004). Após lesão medular, o acúmulo intracelular de cálcio se dá por diversos mecanismos, dentre eles transporte passivo pela membrana citoplasmática, ativação de CCVD devido a despolarização neuronal, abertura de canais para cálcio por receptores glutamatérgicos, mobilização das reservas intracelulares do retículo endoplasmático (RE) via ativação de receptores rianodina (Rir) e influxo capacitativo de cálcio por canais operados por estoque (Greenberg, 1997; Berridge, 2002; Ruiz et al., 2009; Suzuki et al., 2012). Dentre esses mecanismos, a ativação de CCVD constitui importante via de influxo desse íon e representa um passo chave na regulação dos processos celulares no TMA (Uchitel, 1997).

O acúmulo intratecelular de cálcio é capaz de gerar desarranjos metabólicos letais para as células, dentre eles: disfunção mitocondrial – que determina falha no metabolismo aeróbio, acúmulo de lactato e liberação de fatores apoptogênicos; ativação das enzimas óxido nítrico sintase e fosfolipase A – que realizam produção de óxido nítrico e liberação de vasoconstritores e promotores de agregação plaquetária; e ativação de proteases como calpaína e caspases - as quais destroem o citoesqueleto e o DNA microssomal, iniciando processos de necrose e apoptose (Amar e Levy, 1999; Lu et al., 2000; Carlson e Gorden, 2002; Hall e Springer, 2004; Severo et al., 2007; Liu et al., 2011).

2.1.4 Excitotoxicidade

O glutamato é o principal neurotransmissor liberado após o TMA (McAdoo et al., 1999; Xu et al., 2005). Em condições fisiológicas, é removido da fenda sináptica por proteínas transportadoras específicas, prevenindo seu acúmulo e consequentes efeitos patológicos (McAdoo et al., 2000; Xu et al., 2004; Kim et al., 2011). No entanto, após injúria medular primária ocorre isquemia do tecido nervoso, o que causa o esgotamento celular de ATP. Consequentemente ocorre disfunção de processos dependentes de energia como a bomba de sódio-potássio (Hulsebosch, 2002). Inicia-se, então, o transporte passivo de íons pela membrana de acordo com o gradiente de concentração, havendo efluxo de potássio e influxo de sódio, cloreto e cálcio (Kwon et al., 2004; Melo et al., 2013). Como consequências desse desequilíbrio iônico celular ocorre despolarização axonal, com entrada de cálcio nas células nervosas pela ativação de canais para cálcio voltagem- dependentes (Kwon et al., 2004; Olby, 2010) e liberação e acúmulo de glutamato na fenda sináptica (Hwan et al., 2006; Olby, 2010), levando à transmissão sináptica excitatória prolongada com ativação de mecanismos glutamatérgicos (Choi, 1990; McAdoo et al., 2000; Mills et al., 2001; Hulsebosch, 2002; Hausmann, 2003; Rowland et al., 2008).

A excitotoxicidade se refere às alterações patológicas geradas pela exposição excessiva ou prolongada ao glutamato, que resultam em morte neuronal por necrose ou apoptose (Doble, 1999). Na membrana pós-sináptica há receptores para o glutamato do tipo ionotrópicos como n-metil-D-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3- hidroxil- 5-metil-isoxazolepropionato (AMPA/kainato), responsáveis pelo transporte iônico de cálcio e sódio pela membrana celular, respectivamente, e metabotrópicos, responsáveis por mecanismos de sinalização intracelular via proteína G (Kwon et al., 2004). Com a ativação desses receptores, iniciam-se diversos processos celulares como ativação de canais iônicos voltagem-dependentes e consequente agravamento do desequilíbrio iônico com aumento intracelular de sódio e cálcio, ativação da proteína quinase C (Choi, 1992), aumento da liberação de glutamato (Herrero et al., 1994), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e isquemia secundária, os quais levam à morte celular (Nakamura et al., 1994; Liu et al., 1999b; Mills et al., 2001; Brouns et al., 2009; Oyinbo, 2011).

2.1.5 Inflamação e resposta imunológica

Inflamação e resposta imunológica são defesas reparativas universais do organismo frente a um tecido lesado (Kwon et al., 2004). Nas lesões medulares, no entanto, a resposta inflamatória apresenta, ao mesmo tempo, propriedades de neuroproteção e neurotoxicidade, contribuindo tanto para o reparo do tecido quanto para a progressão da lesão medular (Flemming et al., 2006). Após TMA, o epicentro da lesão é rapidamente preenchido por infiltrado neutrofílico que realiza a liberação de enzimas líticas e citocinas citotóxicas, que podem gerar lesão tecidual local e recrutamento de outros componentes inflamatórios (Popovich et al., 1997). Noventa minutos após a injúria inicial, ocorre recrutamento de monócitos e macrófagos e ativação das células da microglia, o que leva à fagocitose do tecido lesado (Beattie et al., 2002; Liverman et al., 2005). Essas células passam a produzir citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas, leucotrienos, prostaglandinas e interferons, que mediam a resposta inflamatória e podem contribuir para a progressão de lesão ao tecido (Bartholdi e Schwab, 1997; Klusman e Schwab, 1997). Após lesão medular, a resposta inflamatória pode resultar em redução da recuperação funcional devido à formação de cicatriz glial, e à morte de neurônios e células da glia por necrose e apoptose (Hausmann, 2003).

2.1.6 Morte celular: necrose e apoptose

O conjunto de eventos observados após TMA pode levar à morte celular por necrose ou apoptose. Do ponto de vista prático, a distinção desses processos é relevante devido ao maior potencial de intervenção terapêutica na apoptose. Parece não ser possível prevenir a ocorrência de necrose frente a injúrias graves ao tecido, porém as células próximas ao epicentro da lesão, mantidas intactas após lesão primária, podem sofrer os efeitos patológicos da lesão secundária, deflagrando apoptose. A avaliação de terapias capazes de reduzir esse evento é alvo de intensa investigação científica (Kwon et al., 2004).

Tipicamente, o epicentro da lesão medular é caracterizado por necrose hemorrágica central, que tem início quinze minutos após a lesão e se propaga radialmente e rostrocaudalmente, resultando em áreas de cavitação cística do tecido e, em alguns casos mais graves, em liquefação do tecido medular (Summers et al., 1995; Beattie e Bresnahan, 2000; Bergman et al., 2000). A morte celular por necrose ocorre, principalmente, em consequência da transferência inicial de força ao tecido, em que o insulto sobrepassa a capacidade celular de manutenção de mecanismos de homeostase, levando à edemaciação passiva das células, lesão de membrana e organelas, interrupção da produção de energia celular (ATP) e eventual ruptura da célula com liberação do conteúdo intracelular, que é capaz de gerar reação inflamatória local (Kwon et al., 2004).

Após lesão medular, a morte celular por apoptose pode ser desencadeada por uma série de mecanismos, incluindo liberação de citocinas, lesão inflamatória, ação de ERO e excitotoxicidade (Beattie et al., 2000; Lu et al., 2000). É considerada mecanismo ativo de morte celular por envolver processos dependentes de energia com transcrição e tradução, sendo caracterizada morfológicamente por contração citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA internucleossomal e formações de corpos apoptóticos e núcleo picnóticos (Springer, 1997; Lu et al., 2000). Ocorrem também alterações na membrana celular, devido à movimentação de moléculas de fosfolípídeos para a superfície, que possibilitam o rápido reconhecimento e remoção dessas células por fagócitos sem que se inicie resposta inflamatória concomitante (Lu et al., 2000).

A morte celular por apoptose pode ser mediada pelas vias intrínseca (mitocôndria-dependente), extrínseca (mediada por receptores transmembranais) ou caspases independente, de acordo com estímulo recebido (Figura 2) (Riedl e Shi, 2004; Kawaguchi et al., 2005). As caspases são uma família de proteases de cisteína executoras da apoptose, sendo divididas em iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras (caspases 3, 6 e 7). São sintetizadas em suas pró-formas inativas e, para sua ativação e ação, são clivadas e, assim, clivam diversas substâncias no citoplasma ou núcleo da célula (Degterev et al., 2003). A ativação das caspases pode ser deflagrada por estímulo em diferentes locais, no ambiente extracelular, por meio de ligação à receptor na membrana plasmática (via extrínseca) ou na mitocôndria com liberação de citocromo C (via intrínseca) (Hengartner, 2000).

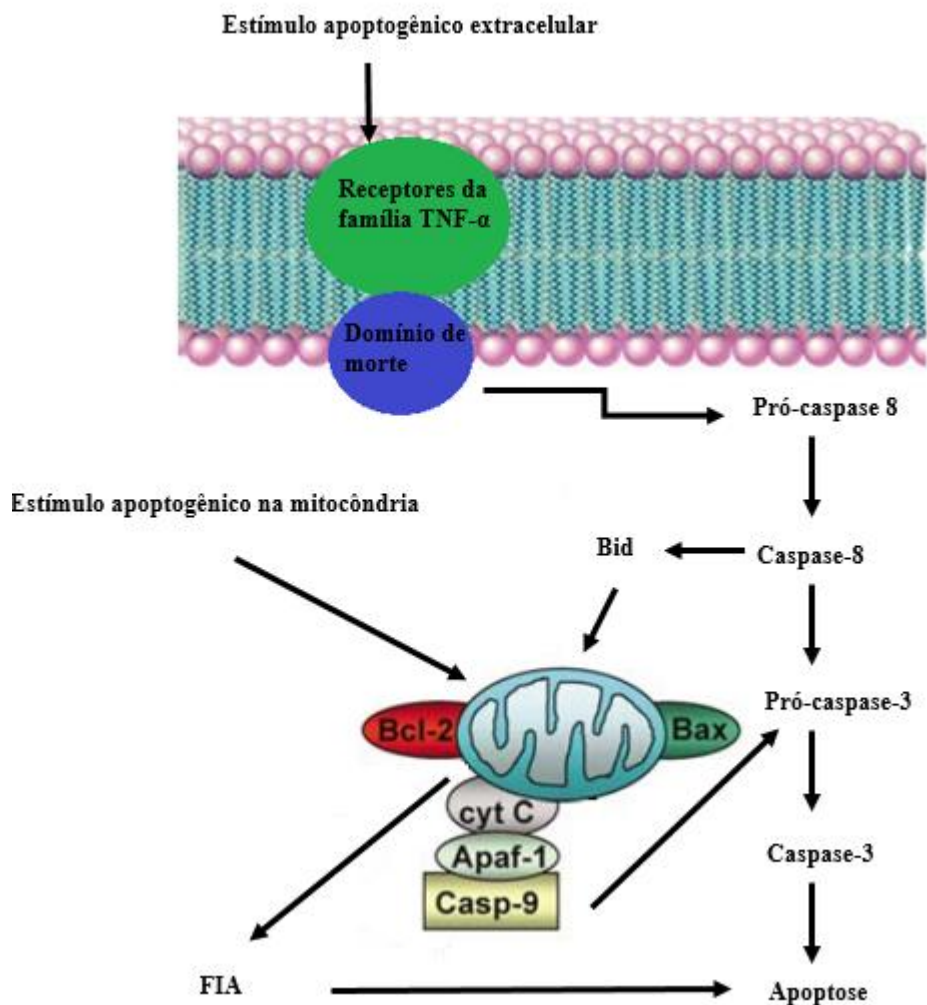


Figura 2 – Representação esquemática das vias de apoptose após trauma medular espinhal.

A morte celular por apoptose pode ser mediada pelas vias intrínseca (mitocôndria-dependente), extrínseca (mediada por receptores transmembranais) ou caspases independente, de acordo com o estímulo recebido. Na via extrínseca, a ligação dos receptores da família TNF- α à seus domínios de morte determina a ativação de caspase-8, ativando a caspase-3, que inicia o processo de apoptose. Além disso, a ativação da caspase-8 determina liberação do fator pró-apoptótico Bid, havendo liberação de citocromo C pela mitocôndria e ativação de via intrínseca. Na via intrínseca, ocorre aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial, com liberação de citocromo C para o citoplasma. Tal substância se liga à protease ativadora da apoptose (APAF-1) e à pró-caspase 9, formando molécula chamada de apoptossoma, que determina ativação da caspase-3 e apoptose. A via caspase independente é iniciada pela liberação do fator indutor da apoptose (FIA/AIF) pela mitocôndria que determina a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais e consequente apoptose.

Fonte: Maria Paula Rajão

A via intrínseca é ativada/regulada principalmente pela mitocôndria, havendo liberação de citocromo C e ativação de caspase-9 que, por sua vez, ativa a caspase-3 (Krajewski et al., 1999; Portt et al., 2011). Em resposta ao estímulo apoptótico, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax e Bak) tornam-se ativados e agem aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial, gerando liberação de proteínas apoptogênicas como citocromo C, fator indutor de apoptose (FIA/AIF), segundo fator mitocondrial ativador de caspase (SMAC) e endonuclease G da região intermembrana da mitocôndria (Cande et al., 2002; Saelens et al., 2004; Portt et al., 2011). A liberação de citocromo C no citoplasma deflagra ativação de caspase-3 através da formação de molécula chamada apoptossoma constituída da ligação dessa substância à protease ativadora da apoptose (APAF-1) e à pró-caspase 9 (Saelens et al., 2004). A formação da apoptossoma gera ativação da caspase-9, que resulta em recrutamento e ativação da caspase-3 (Green, 1998; Kawaguchi et al., 2005). Uma vez ativada, a caspase-3 cliva substratos na célula que produzem diversos eventos celulares e bioquímicos observados na apoptose (Fulda e Debatin, 2006). Para evitar a ativação excessiva das caspases, outras proteínas da família Bcl-2 antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x1) regulam a liberação do citocromo C mantendo 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 retículo endoplasmático (RE), frente à liberação de cálcio no citoplasma mediada pela caspase-12 (Nakagawa et al., 2000).

A via extrínseca é iniciada pela ligação de receptores extracelulares como o CD95 (APO-1, Fas) e TNF- α aos seus “domínios de morte” celular. Os receptores extracelulares são membros da superfamília do fator de necrose tumoral, que consistem em mais de 20 proteínas que possuem diversas funções biológicas como regulação da morte celular e regulação e diferenciação imunológicas (Walczak and Krammer, 2000; Ashkenazi, 2002). Apresentam domínio citoplasmático chamado “domínio de morte”, que tem papel crucial na transmissão do estímulo apoptogênico da superfície da célula para o ambiente intracelular (Fulda e Debatin, 2006). A ativação desses receptores resulta na ativação da caspase-8 iniciadora (Boldin et al., 1996; Matsushita et al., 2000; Wu et al., 2014), que ativa a caspase-3 que cliva proteínas intracelulares estruturais e regulatórias (Casha et al., 2001; Takagi et al., 2003).

Há também uma comunicação (via comum) entre as vias intrínseca e extrínseca, em que a caspase-8 ativa a liberação do fator pró-apoptótico Bid que sinaliza a liberação de citocromo C pela mitocôndria e ativa a via intrínseca (Majno e Joris, 1995). Já a via caspase independente é iniciada pela liberação de AIF pela mitocôndria, que determina a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais (Zheng et al., 2003).

A maior parte dos eventos realacionados à lesão secundária ocorre ou é ativada na fase subaguda, em torno de 48 horas após o TMA (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).

2.2 Utilização de bloqueadores de canais para cálcio como agentes neuroprotetores

Dentre os diferentes tratamentos propostos para a lesão medular, ressaltam-se a utilização de anti-inflamatórios esteroidais (Bartholdi e Schwab, 1995; Webb et al., 2010b; Rosado et al., 2014) e não esteroidais (Guth et al., 1999), terapia celular (Dasari et al., 2007; Caldeira, 2011), bloqueadores de canais para sódio (Schwartz 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).

O bloqueio de CCVD é uma relevante estratégia neuroprotetora no tratamento da lesão medular, por estarem envolvidos em processos celulares importantes, como liberação de neurotransmissores (Snutch et al., 2001), que é um dos efeitos deletérios do aumento exacerbado do nível de cálcio intracelular (Imaizumi, et al., 1999; Lee et al., 2009; Vaishnav et al., 2010; Liu et al., 2013).

Agentes bloqueadores de canais para cálcio como as ômega-conotoxinas MVIIA e MVIIC, ziconotide, nimodipine, dantrolene, riluzol e $\text{Ph}\alpha 1\beta$ têm sido avaliados no tratamento de lesões cerebrais e medulares, tendo apresentado efeito neuroprotetor variável (Choi, 1992; Hovda et al., 1994; McDonough et al., 1996; Olby, 1999; Lanz et al., 2000; Ridgeway et al., 2000; Verweij et al., 2000; Pinheiro, 2007; Gwak et al., 2008; Aslan et al., 2009; Drummond, 2010; Fehlings et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Oliveira et al., 2016).

2.3 Toxina $\text{Ph}\alpha 1\beta$

A aranha *Phoneutria nigriventer*, popularmente conhecida como “aranha armadeira” devido à postura defensiva que toma ao se sentir ameaçada, é uma das espécies mais agressivas e venenosas da América do Sul (Lucas, 1988). É responsável pela maioria dos acidentes por araneísmo no Brasil, com 2.687 casos registrados em humanos no ano de 2006 (Medeiros et al., 2013). Permanece refugiada durante o dia e apresenta hábitos noturnos, se alimentando de insetos, aranhas e pequenos roedores. No período de acasalamento, esta espécie pode atingir o ambiente intradomiciliar, quando os machos se tornam mais ativos à procura das fêmeas, acentuando-se os riscos de acidentes (Bucherl, 1972).

Acidentes envolvendo *Phoneutria nigriventer* podem gerar sinais como dor local intensa frequentemente irradiada, edema discreto, eritema e sudorese local, além de sintomas mais graves como câimbras, tremores, crises epiléticas generalizadas tônicas, paralisia espástica, priapismo, arritmias e distúrbios visuais (Vital-Brazil e Vellard, 1925; Lucas, 1988). A injeção endovenosa experimental deste veneno gerou salivação, paralisia flácida ou espástica, tremores e crises epiléticas, o que demonstra sua ação nos sistemas nervosos autônomo (Gomez et al., 1995), periférico (Love e Cruz-Hofling, 1986) e central (Zanchet et al., 2004).

A aranha *Phoneutria nigriventer* não produz teia para abrigo ou captura de alimentos, e seu sucesso como predadora se dá, em parte, pela diversidade de toxinas presentes em seu veneno, composto por aproximadamente 17 peptídeos ativos (Gomez et al., 2002). A purificação e o fracionamento desse veneno têm permitido avanços na descoberta de sítios e mecanismos de ação celular. Sabe-se que as toxinas encontradas no veneno da “aranha armadeira” apresentam ampla gama de ações, incluindo ativação de canais para sódio e bloqueio de canais para cálcio e potássio (Gomez et al., 2002; Kochegarov, 2003).

Estudos de purificação por filtração em gel e cromatografia de fase reversa demonstraram que o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* pode ser classificado em três categorias, considerando o seu conteúdo proteico, sendo: 1) peptídeos neurotóxicos ativos em mamíferos e insetos; 2) peptídeos atóxicos ativos em músculo liso; e 3) enzimas (Drummond, 2010). Rezende et al., (1991) isolaram uma fração não tóxica (PhM) e três frações neurotóxicas PnTx1, PnTx2 e PnTx3 a partir do veneno total dessa espécie. Quando injetada por via intracerebroventricular

em roedores, a fração PnTx3 induzia paralisia flácida (Rezende et al., 1991), o que mais tarde foi atribuído à sua ação inibitória na liberação de neurotransmissores através de inibição de CCVD (Gomez et al., 1995; Prado et al., 1996). A partir dessa fração, seis diferentes isoformas de neurotoxinas foram isoladas (PnTx3.1 a PnTx3.6) (Cordeiro Mdo et al., 1993).

O peptídeo Ph α 1 β (também denominado PnTx 3.6) é uma neurotoxina capaz de bloquear canais para cálcio voltagem-dependentes de alta voltagem, com maior especificidade para CCVD do tipo N, em sistemas heterólogos e nativos (Vieira et al., 2005). Sua obtenção se dá por meio de combinação de técnicas de cromatografia de permeação em gel, de fase reversa por sistema de FPLC/FPLC e de troca iônica por HPLC, conforme descrito por Cordeiro Mdo et al., 1993. Seu emprego tem sido avaliado no controle de dor pela sua capacidade de inibir CCVD de alta voltagem de maneira reversível e não específica (Rigo et al., 2013), apresentando alta janela terapêutica. Atua na prevenção da dor neuropática (Souza et al., 2011; Castro-Júnior et al., 2013; Rosa et al., 2014), somática (Diniz et al., 2014), dor da fibromialgia (de Souza et al., 2013) e dor visceral persistente (Diniz et al., 2012). Apresentou efeito antialodínico superior à ômega-conotoxina MVIIA (Prialt®) em aplicação intratecal, após indução de dor por incisão plantar em camundongos (Tonello et al., 2014). Além disso, sua utilização foi avaliada na injúria medular aguda em ratos por Drummond (2010), tendo sido observada discreta melhora na preservação morfológica da medula espinhal com consequente recuperação funcional.

A utilização clínica da fração Ph α 1 β nativa pode ser dificultada pela sua baixa produção a partir do veneno total (Tonello et al., 2014). Alternativamente, a produção de toxinas recombinantes por meio de diferentes técnicas de expressão gênica recombinante permitiu a obtenção de proteínas de pureza e quantidade suficientes para sua caracterização funcional e aplicação em pesquisas (Gurkan e Ellar, 2005). A Ph α 1 β recombinante (CTK 01512-2), obtida por meio de tecnologia de DNA recombinante com sequência de plasmídeo expressa por *Escherichia coli*, mimetizou os efeitos da toxina nativa, tendo demonstrado resposta analgésica similar à forma nativa em estudo de dor em camundongos (Souza et al., 2008). Não foram encontrados relatos de avaliação do efeito neuroprotetor da toxina Ph α 1 β recombinante no tratamento de lesão medular.

2.4 Estudo experimental das lesões medulares

A utilização de modelo experimental de lesão medular confiável, padronizado e reprodutível é de suma importância nos estudos de fisiopatogenia e avaliação de intervenções terapêuticas após lesão medular (Santos et al., 2011). O desenvolvimento de tais modelos tem sido objeto de frequentes investigações científicas (Dohrmann, 1972; Ford, 1983; Panjabi e Wrathall, 1988; Taoka e Okajima, 1998; Meyer et al., 2003). O TMA experimental tem sido estudado em diferentes espécies como ratos, gatos, cachorros e macacos. O rato é a espécie mais amplamente utilizada com este fim, devido ao baixo custo, tamanho, acessibilidade (Roussos et al., 2005) e capacidade de tolerar o rigor da experimentação (Taoka e Okajima, 1998).

Como modelos de lesão medular, são empregadas técnicas de transecção medular (Siegenthaler et al., 2007), clip de aneurisma (Rivling e Tato, 1978) e diferentes tipos de traumas contusivos (Metz et al., 2000; Young, 2009; Agrawal et al., 2010; Santos et al., 2011) e compressivos (Silva et al., 2008; Lonjon et al., 2010; Torres et al., 2010b). Os modelos de compressão e

contusão mimetizam de forma mais representativa as injúrias medulares que ocorrem em humanos (Rosenweig et al., 2004), sendo, por isso, os mais utilizados.

O dispositivo MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) Impactor foi desenvolvido em 1993 por meio de colaboração de oito principais centros de estudo de lesão medular, entre eles a State University of New Jersey. É atualmente utilizado em mais de 100 laboratórios ao redor do mundo, sendo o modelo mais amplamente empregado no estudo de trauma medular em ratos (Young, 2009). Este aparelho estereotáxico é conectado a um computador com software específico que registra a velocidade de queda da haste sobre a medula, o momento do impacto e o grau de compressão sofrida pela medula espinhal, diminuindo, portanto, a variabilidade do trauma entre os animais (Gruner, 1992; Basso et al., 1996), permitindo a execução de estudo confiável. Apresenta padrões pré-estabelecidos de anestesia, cirurgia, trauma, cuidados e avaliações pós-operatórias, relatados por Young (2009). O trauma consiste na liberação em queda livre de haste de impacto de peso de 10 g através de um tubo-guia, de alturas pré-determinadas de 6.25, 12.5, 25 e 50 mm (Rodrigues et al., 2010). Segundo Silva et al. (2008) e Agrawal et al. (2010), a queda da haste de alturas de 6.25 e 12.5 mm configura lesão medular discreta, enquanto alturas de 25 e 50 mm estão relacionadas às lesões moderada e grave do tecido medular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido nas dependências físicas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG e do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Minas Gerais (IEP-SCBH). O delineamento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG) sob protocolo de número 124/2015 (Anexo 1), estando em concordância com os princípios éticos de experimentação animal seguidos pela comissão.

3.1. Animais

Foram utilizados 30 animais machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, com idade média de 75 dias e peso médio de 350 g.

Os animais foram mantidos no Centro Experimental da Escola de Veterinária da UFMG, acondicionados em caixas plásticas de dimensões 17cm x 41cm x 33 cm forradas com maravalha, com três ratos cada. Foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Receberam ração comercial para roedores¹ e água *ad libitum*. Passaram por período de aclimação de 14 dias antes do início dos procedimentos cirúrgicos.

3.2 Toxina Ph α 1 β recombinante

A toxina Ph α 1 β recombinante liofilizada² foi cedida pelo Professor Marcus Vinícius Gomez. Foram diluídos em PBS estéril 50 μg da toxina, de peso molecular de 10,9 KDa (Souza et al., 2008), correspondentes a 4590 pmol. Gerou-se soluções de estoque de 20, 10 e 5 pmol/ μL que foram armazenadas em tubos plásticos siliconizados e conservadas a -20°C .

3.3 Grupos experimentais

Após período de adaptação, os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos experimentais, constituídos por 6 animais cada: controle negativo (CN), controle positivo (CP), 25 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante (PH25), 50 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante (PH50) e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante (PH100). Um animal recebeu a dosagem de 200 pmol da toxina, porém devido às intensas reações de toxicidade observadas a dosagem foi retirada do estudo.

Todos os grupos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos de laminectomia e, com exceção do grupo controle negativo, foram também submetidos ao trauma medular. Conforme demonstrado no Quadro 2, os animais do grupo CN foram submetidos à laminectomia, com posterior aplicação intratecal de placebo (10 μ L de PBS estéril) uma hora após laminectomia. Já os animais do grupo CP foram submetidos à laminectomia, indução de trauma medular contusivo pelo aparelho indutor de trauma Mascis Impactor, com posterior aplicação intratecal de placebo (10 μ L de PBS estéril) uma hora após trauma medular. Os animais dos grupos tratamento, por outro lado, foram submetidos à laminectomia, indução de trauma medular contusivo pelo aparelho indutor de trauma Mascis Impactor e aplicação intratecal de 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante diluídos em 10 μ L de PBS estéril uma hora após trauma medular.

-
- 1 Nuvilab® CR-1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo-PR, Brasil.
 - 2 CTK 01512-2, Giotto Biotech S.r.l., Florença, Itália.

Quadro 2 - Distribuição dos ratos nos diferentes grupos experimentais e protocolos de tratamento após laminectomia (CN) e trauma medular contusivo (CP, PH25, PH50, PH100).

Nome do grupo	Denominação	Procedimento
Controle Negativo	CN	Os animais foram submetidos à laminectomia e aplicação intratecal de 10 µL de PBS estéril 1 hora após a laminectomia.
Controle Positivo	CP	Os animais foram submetidos à laminectomia, aplicação de trauma medular contusivo pelo aparelho indutor de trauma Mascis Impactor e aplicação intratecal de 10 µL de PBS estéril 1 hora após o trauma medular.
25 pmol da toxina Phα1β recombinante	PH25	Os animais foram submetidos à laminectomia, aplicação de trauma medular contusivo pelo aparelho indutor de trauma Mascis Impactor e aplicação intratecal de 25 pmol da toxina Phα1β recombinante em um volume final de 10 µL 1 hora após o trauma medular.
50 pmol da toxina Phα1β recombinante	PH50	Os animais foram submetidos à laminectomia, aplicação de trauma medular contusivo pelo aparelho indutor de trauma Mascis Impactor e aplicação intratecal de 50 pmol da toxina Phα1β recombinante em um volume final de 10 µL 1 hora após o trauma medular.
100 pmol da toxina Phα1β recombinante	PH100	Os animais foram submetidos à laminectomia, aplicação de trauma medular contusivo pelo aparelho indutor de trauma Mascis Impactor e aplicação intratecal de 100 pmol da toxina Phα1β recombinante em um volume final de 10 µL 1 hora após o trauma medular.

3.4 Procedimentos anestésico e cirúrgico e cuidados pós-operatórios

Após pesagem dos animais, foi realizada antibioticoprofilaxia com cefalotina sódica² (60 mg/kg via IM) e medicação pré-anestésica e analgesia com sulfato de morfina³ (5 mg/kg via IM), 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. Em seguida, foi realizada indução anestésica em câmara com isoflurano⁴ e manutenção do plano anestésico cirúrgico com o mesmo agente, por meio de máscara facial.

Após tricotomia da região dorsal do tronco, os animais foram posicionados sobre a mesa do dispositivo indutor de trauma Mascis Impactor para realização de antisepsia da região tricotomizada com iodopovidona degermante⁵ e solução de álcool iodado.

Posteriormente, foram realizadas incisões cutânea e subcutânea na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica à primeira lombar. Os músculos epiaxiais foram afastados lateralmente. Realizou-se a individualização dos processos espinhosos de T10, T11 e T12, ostectomia do processo espinhoso da décima primeira vértebra torácica, com auxílio da pinça hemostática de Kocher, seguida da remoção da lâmina dorsal com drill pneumático neurológico⁶ e pinça hemostática de Halsted, sob irrigação intermitente com solução fisiológica⁷. Após abertura da lâmina dorsal e exposição da medula em T11, empregou-se o sistema de estabilização vertebral do aparelho Mascis Impactor (“clamping system”) nos processos espinhosos de T10 e T12, e o animal foi posicionado no sistema indutor de trauma espinhal Mascis Impactor, em que o trauma medular contusivo foi gerado por queda de haste de 10 g a uma altura de 25 mm.

O dispositivo encontrava-se conectado ao *Software Impactor 7.0* no computador, que exibe as curvas de trajetória de impacto por meio de sensores do aparelho, apontando possíveis erros de velocidade, tempo e altura de queda. Para o presente estudo foram aceitos animais com erro máximo de 5% durante a indução do trauma. Realizou-se a aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto empregando-se suturas padrão Reverdin e simples contínua, respectivamente, ambas com fio inabsorvível sintético nylon 2-0⁸. A dermorrafia foi feita com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio. Durante todo o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos aquecidos por meio de bolsa térmica aquecida.

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

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

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

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

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

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

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

3.5 Tratamentos

A aplicação intratecal foi realizada de acordo com o método previamente descrito para ratos por Mestre et al. (1994). Uma hora após a laminectomia (grupo controle negativo) ou o trauma medular (demais grupos), os animais sofreram nova indução anestésica em câmara com isoflurano. Um volume total de 10 µL contendo 25, 50 e 100 pmol da toxina Phα1β recombinante diluída em PBS estéril foi administrado no espaço subaracnóide por meio de punção entre a quinta e sexta vértebras lombares com seringa de Hamilton 701LT⁹ acoplada a agulha 26 G¹⁰. Nos animais pertencentes aos grupos controle foi realizada aplicação de 10 µL de PBS estéril.

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

9 10 microl, Model 701 LT SYR – Hamilton Company, Reno, NV, USA.

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

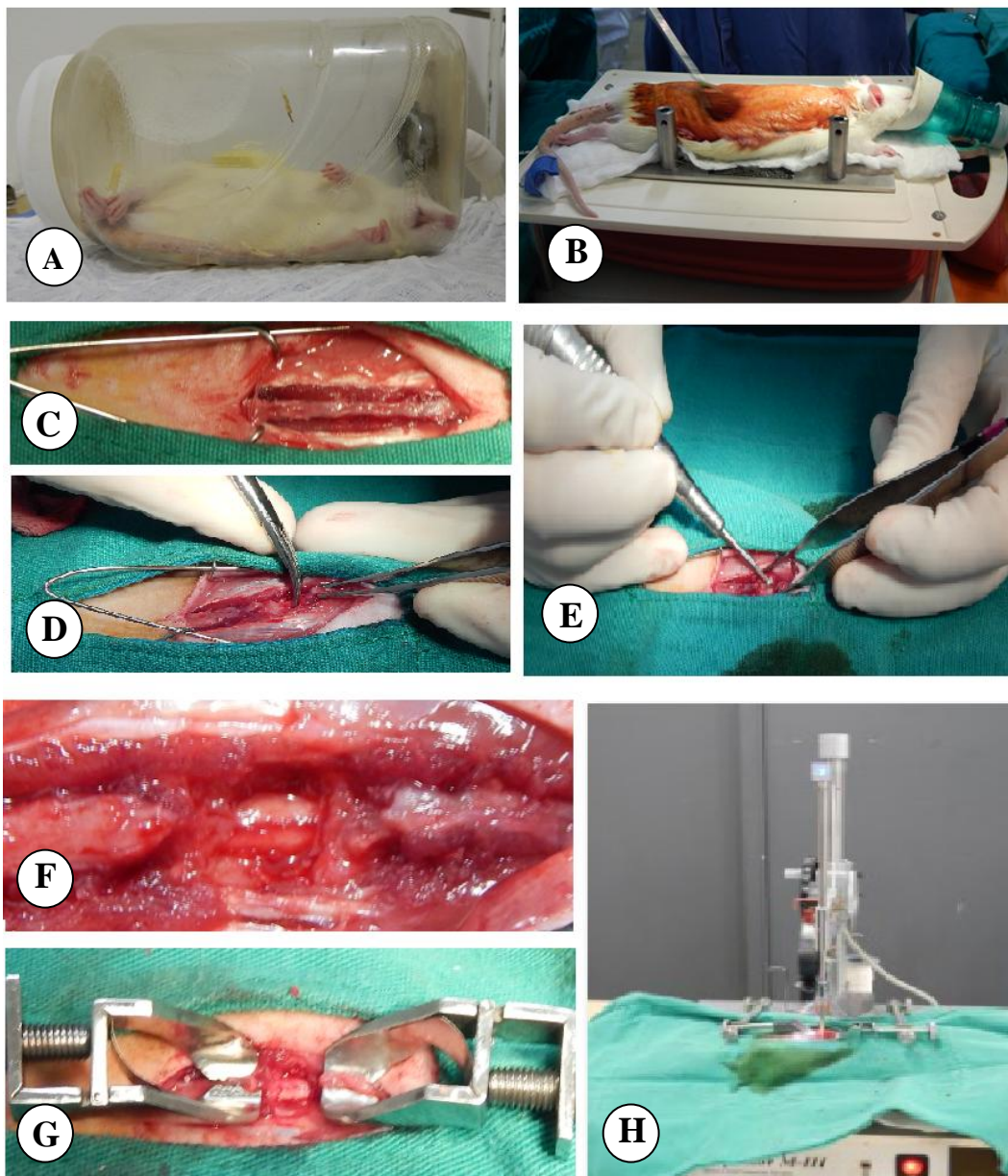


Figura 3 – Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar com aparelho indutor de trauma Mascis Impactor. **A)** Indução anestésica em câmara com isoflurano. **B)** Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa aquecida com bolsa térmica. Realização de antisepsia com iodopovidona degermante em região dorsal do tronco tricotomizada. Manutenção anestésica por meio de máscara com isoflurano em sistema semiaberto. **C)** Afastamento da musculatura epaxial e identificação dos processos espinhosos. **D)** Osteotomia do processo espinhoso com auxílio de pinça de Halsted. **E)** Desgaste da lâmina dorsal com drill pneumático neurológico. **F)** Visualização da medula espinhal após laminectomia dorsal. **G)** Utilização do sistema de estabilização vertebral “clamping system”. **H)** Posicionamento do animal após laminectomia dorsal no aparelho Mascis Impactor.

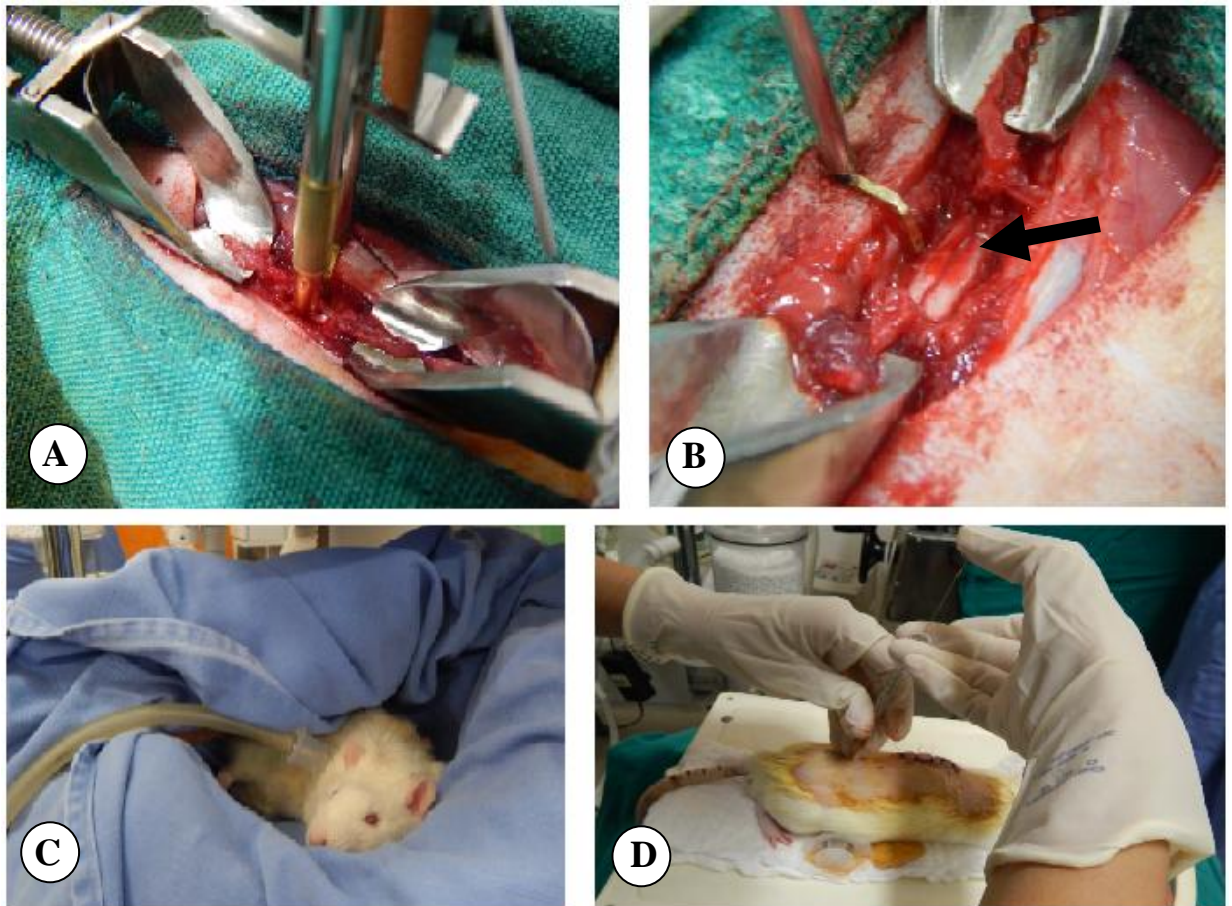


Figura 4 – Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar com aparelho Mascis Impactor, recuperação anestésica e aplicação intratecal. **A)** Animal posicionado no aparelho indutor de trauma espinal Mascis Impactor. Processos espinhosos de T10 e T12 individualizados e estabilizados pelo sistema de estabilização do aparelho, haste de impacto do aparelho tocando a medula na região de laminectomia dorsal (T11). **B)** Hemorragia sub-aracnóidea (seta) após trauma medular por queda de haste a 25 mm de altura. **C)** Recuperação anestésica em caixa individual com oxigenoterapia e aquecimento por cobertor. **D)** Aplicação intratecal realizada por meio de punção do espaço subaracnóide entre a quinta e sexta vértebras lombares por seringa de Hamilton 701LT acoplada a agulha 26G.

3.6 Avaliação dos efeitos colaterais

A avaliação dos efeitos colaterais foi realizada por meio de observação dos animais em campo aberto quanto à presença de tremor generalizado e de cauda, podendo ser classificado como ausente, discreto, moderado e intenso, conforme descrito por Malmberg e Yaksh (1994). Tal avaliação teve início um dia antes dos procedimentos cirúrgicos, para condicionamento dos animais, tendo sido realizada imediatamente após aplicação intratecal, após cinco horas e diariamente até o momento da eutanásia (no mesmo momento da avaliação da capacidade motora em campo aberto).

3.7 Avaliação da capacidade motora em campo aberto

A avaliação da capacidade motora em campo aberto foi realizada diariamente até a eutanásia, tendo início dois dias antes da intervenção cirúrgica para condicionamento dos animais. Os animais foram posicionados em campo aberto de área de um metro quadrado, e filmados por quatro minutos. Os vídeos foram assistidos por dois avaliadores sem identificação dos grupos, classificando a deambulação dos animais de acordo com score BBB, proposto por Basso, Beattie e Bresnahan (1995), que varia de zero a 21 (Quadro 3). Tal avaliação foi realizada com principal objetivo de padronizar a lesão experimental, garantindo que a queda da haste a 25 mm de altura tenha sido capaz de gerar trauma medular moderado a severo em todos os animais, como descrito na literatura (Agrawal et al, 2010; Santos et al., 2011). Além disso, nos animais pertencentes ao grupo controle negativo, a avaliação da locomoção teve a finalidade de garantir que a laminectomia não tenha gerado lesão medular.

Quadro 3 – Características de deambulação de membros pélvicos (MPs) e seus respectivos escores segundo avaliação de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação de capacidade motora em ratos após trauma medular torácico agudo

SCORE	DEAMBULAÇÃO EM MPs
0	Ausência de movimento.
1	Movimento discreto de uma das articulações.
2	Movimento extenso de uma articulação e movimento discreto de outra articulação.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto das três articulações.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações.
8	Passada ou posicionamento plantar sem suporte de peso.
9	Posicionamento plantar com suporte de peso somente em estação ou passada dorsal com suporte de peso ocasional, frequente ou consistente e sem apoio plantar.
10	Passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação com os MT.
11	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso sem coordenação com MT.
12	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e coordenação com MT ocasional.
13	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e coordenação com MT frequente.
14	Passada plantar consistentemente coordenada, com a posição da pata predominantemente rotacionada durante contato inicial e retirada; passada plantar frequente, coordenação com MT consistente e passada dorsal ocasional.
15	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos ausente ou ocasional durante avanço do membro, posicionamento da pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial.
16	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos frequente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e rotacionada na retirada.
17	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos frequente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada.
18	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada.
19	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda abaixada por parte ou todo o tempo de avaliação.
20	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e instabilidade de tronco.
21	Marcha coordenada consistente, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e estabilidade de tronco consistente.

3.8 Eutanásia e coleta de materiais

Quarenta e oito horas após a intervenção cirúrgica, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg)¹¹ por via intraperitoneal. Foram coletados aproximadamente 3,0 mL de sangue por cardiopunção, dos quais 1,0 mL foi acondicionado em frasco com EDTA¹² para realização de análises hematológicas e o restante em tubo siliconizado sem anticoagulante¹³ para avaliação da bioquímica plasmática. Coletou-se também aproximadamente 1,0 mL de urina por massagem vesical manual para realização de urinálise. Além disso, após dissecação da coluna espinhal realizou-se a coleta de dois segmentos medulares: o primeiro, de 2,0 cm cranial ao epicentro da lesão ou região de laminectomia (animais pertencentes ao grupo CN), que foi acondicionado em tubos plásticos siliconizados e imediatamente congelado à - 20 ° C até o processamento para análises de quantificação de EROs e avaliação de peroxidação lipídica, e o segundo, de 1,0 cm caudal ao epicentro da lesão ou região de laminectomia, que foi acondicionado em tubos plásticos siliconizados livres de RNase/ DNase e imediatamente congelado à - 80 ° C até o processamento para avaliação de expressão gênica de fatores relacionados à apoptose por qRT-PCR em tempo real.

3.9 Avaliação hematológica, bioquímica plasmática e urinálise

- Avaliação hematológica

O hemograma foi realizado em contador eletrônico¹⁴ utilizando-se o sangue colhido em tubo com EDTA¹², que apresentou os resultados de concentração de hemácias, hemoglobina e leucócitos totais. O volume globular (VG) foi determinado utilizando centrífuga¹⁵ pela técnica do microhematócrito e quantificação em tabela padrão. Os esfregaços sanguíneos foram realizados em lâminas de vidro¹⁶ e corados com panótipo rápido¹⁷ para contagem diferencial de leucócitos e plaquetas. A dosagem de proteínas totais foi estimada por refratômetro analógico portátil.

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

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

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

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

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

16 Lâminas para microscopia não lapidada, Exacta, SOS lab, Belo Horizonte-MG, Brasil.

-Avaliação de bioquímica plasmática

Para avaliação de bioquímica plasmática, o sangue total coletado em tubo siliconizado sem anticoagulante¹³ foi centrifugado para obtenção do plasma. As análises foram realizadas por método colorimétrico cinético¹⁸, por meio de aparelho analisador bioquímico¹⁹, seguindo protocolo de *kits* comerciais²⁰. Para avaliação da função hepática foram dosadas no soro fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), proteína total e albumina. A avaliação da função renal se deu a partir de mensuração das concentrações plasmáticas de ureia e creatinina. Além disso, foi realizada dosagem de cálcio total no soro.

- Urinálise

Para urinálise, aproximadamente 1,0 mL de urina foi coletado por massagem vesical manual no momento da eutanásia. Foram realizadas as quantificações de uréia, GGT urinária (gama-glutamil transferase urinária), albumina e cálcio. Da mesma forma que as análises bioquímicas, as análises de urinálise foram realizadas por método colorimétrico cinético¹⁸, por meio de aparelho analisador bioquímico¹⁹, seguindo protocolo de *kits* comerciais²¹.

3.10 Quantificação das espécies reativas de oxigênio por ensaio fluorimétrico DCFDA

A quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada através da técnica de diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA). Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCF-DA e sua oxidação subsequente por EROs, gerando um composto altamente fluorescente que é considerado indicador da produção de peróxido pelos componentes celulares (Jakubowski e Bartosz, 2000). Para análise de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e teor de proteína coletou-se fragmento de medula espinhal de 1,0 cm cranial ao epicentro da lesão ou da região de laminectomia, que foi imediatamente congelado a - 20°C. Após adição de 750 µL de solução tampão TRIS- HCl e homogeneização em sonicador por 2 minutos, o tecido foi centrifugado a 2.500 rpm a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante (S1) foi transferido para um novo tubo, e uma alíquota de 20 µL foi retirada e adicionada a 80µL DCF-DA 125 µM para quantificação de EROs. A placa em triplicata foi incubada no escuro durante uma hora a 37°C até o momento da mensuração da fluorescência (488/525 nm) no aparelho Victor X426²². Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

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

18 TP Analyser basic®- Thermo Plate.

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

20 Perkin- Elmer.

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

22 Perkin-Elmer.

3.11 Avaliação da peroxidação lipídica por método TBARS

Para avaliação da peroxidação lipídica foi utilizado método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Tal ensaio, introduzido por Buege e Aust (1978), quantifica o

malondialdeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica de membranas celulares por meio de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que gera produto colorimétrico. Para determinação da peroxidação lipídica por método TBARS, preparou-se solução “mix” contendo 200 µL de solução TBA 0,8%, 200 µL de tampão ácido acético e 40 µL de água por amostra. Foram pipetados 440 µL desse mix para cada Eppendorf, adicionou-se 80 µL de sobrenadante (S1) e, por último, foram adicionados 80 µL de solução SDS 8,1%. Realizou-se incubação das amostras a 95°C por uma hora. O conteúdo de MDA foi mensurado a partir da leitura da absorbância das amostras a 532 nm em espectrofotômetro e os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

3.12 Quantificação do teor de proteína pelo método de Bradford

A quantificação do teor de proteína foi realizada através de método descrito por Bradford (1976), em que o substrato azul G brilhante de Comassie se converte da cor vermelha para o azul após complexação com proteínas. Um volume de 5,0 µL do sobrenadante (S1) foi utilizado para o ensaio. As amostras foram colocadas em tubos para microcentrifuga, adicionando-se 500 µL de NaCl 0,9% e 500 µL do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi incubada por 5 minutos, sob agitação, e então, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro ²³ no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva-padrão de BSA a 1,0 mg/mL contendo teores conhecidos de 1, 3, 5, 7 e 10,0 µg de albumina.

3.13 Avaliação da expressão gênica relativa de Bax, Bcl-xl, caspase-3, caspase-8 e caspase-9 por qRT-PCR em tempo real

Para realização da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcriptase reversa (qRT-PCR), coletou-se segmento medular de meio centímetro caudal ao epicentro da lesão ou da região de laminectomia, que foi imediatamente congelado a – 80 °C para posterior processamento.. Em relação aos genes de interesse, foram utilizados os *primers* das proteínas relacionadas a apoptose Bax ²¹, caspase-3 ²², caspase-8 ²³, caspase-9 ²⁴ (pró-apoptóticas), ²⁵ (antiapoptótica), e da proteína constitutiva beta-actina ²⁶, utilizada como normalizadora (“housekeeping gene”) (Tabela 1).

²¹ Primer Bax F e Primer Bax R – Thermo Fisher, São Paulo,SP, Brasil.

²² Primer Cas-3 F e Primer Cas-3 R – Thermo Fisher, São Paulo,SP, Brasil.

²³ Primer Cas-8 F e Primer Cas-8 R – Thermo Fisher, São Paulo,SP, Brasil.

²⁴ Primer Cas-9 F e Primer Cas-9 R – Thermo Fisher, São Paulo,SP, Brasil.

²⁵ Primer Bcl-xl F e Primer Bcl-xl R – Thermo Fisher, São Paulo,SP, Brasil.

²⁶ Primer Beta-act. F e Primer Beta-act. R – Thermo Fisher, São Paulo,SP, Brasil.

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

Bax	F: CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC R: AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA
Bcl-xl	F: CCCCAGAAGAAACTGAACCA R: AGTTTACCCCATCCCGAAAG
Caspase-3	F: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA R: CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT
Caspase-8	F: TAAGACCTTTAAGGAGCTTCATTTTGA]R: AGGATACTAGAACCTCATGGATTTGAC
Caspase-9	F: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA R: CCACAGCTCCGCGACTTGCA
Beta-actina	F: GCGTCCACCCGCGAGTACAA R: ACATGCCGGAGCCGTTGTC

- Extração do RNA

A extração do RNA foi iniciada adicionando-se, a cada amostra, 1 mL do reagente Trizol²⁷, e realizando-se a homogeneização em aparelho Tissue Lyser II²⁸ na frequência de 20s por 4 minutos. Para separação de fases, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C para formação de três fases distintas. Para isolamento do RNA, a fase superior (aquosa) contendo o RNA foi transferida cuidadosamente para um novo tubo ao qual adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico para precipitação do RNA, procedeu-se a incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e realizou-se centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartando-se todo o sobrenadante. Para lavagem e ressuspensão do RNA, adicionou-se 1,0 mL de etanol 75% e procedeu-se a centrifugação a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Todo o sobrenadante foi descartado, procedeu-se a secagem à temperatura ambiente por 10 minutos, realizou-se a ressuspensão do *pellet* de RNA em 80 µL de água ultra-pura RNase-free²⁹ e incubação em banho-maria a 55°C por 5 minutos. Utilizou-se uma amostra de 1,0 µL para quantificação de RNA no aparelho Nanovue plus³⁰, e o restante foi congelado a – 80 ° C para síntese do DNA complementar (cDNA).

²⁷ Trizol – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

²⁸ Tissue Lyser II- Qiagen.

²⁹ Água ultra-pura DEPC – Thermo Fiser, São Paulo, SP, Brasil.

³⁰ Nanovue plus- GE Lifescience.

- Síntese do cDNA

Para síntese do DNA complementar, foi feita solução “mix” contendo, para cada amostra, 10µL de 2xRT Reaction e 2 µL da enzima RT (transcriptase reversa). Adicionou-se volume de cada amostra estimado para 500 ng de RNA, de acordo com quantificação prévia, e adicionou-se água até volume final de 8 µL com o RNA.

Seguindo recomendação do fabricante, as amostras, que totalizaram uma solução final de 20 µL, foram submetidas a ciclos de 25° C por 10 minutos, 50°C por 30 minutos, 85° C por 5 minutos e resfriamento a 13° C em termociclador. Após adição de 1 µL de *Escherichia coli* RNAse H, as amostras foram incubadas no mesmo aparelho por 20 minutos a 37°C e, posteriormente, congeladas a – 20°C para realização de qRT-PCR em tempo real.

Realizou-se a diluição dos primers, gerando soluções de estoque de 100 µM, que foram congeladas a – 20°C *overnight*.

- Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real

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

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

3.14 Análise estatística

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico IBM SPSS Statistics 20. A normalidade dos dados foi avaliada por meio de teste de aderência de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Tukey. Adotou-se nível de significância de 95% nas análises ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelo experimental de trauma medular agudo

O emprego do aparelho estereotáxico Mascis Impactor determinou alterações deambulatorias nos animais, classificados por escala de BBB como score de 0 a 2, sendo considerado trauma medular agudo de intensidade moderada a grave de acordo com Santos et al. (2011). Além disso, a ausência de observação de déficits de movimentação nos animais pertencentes ao grupo CN, submetidos apenas ao procedimento cirúrgico, indica que a laminectomia, conforme esperado, não gerou lesão importante ao tecido medular.

A utilização do aparelho estereotáxico indutor de trauma medular contusivo com queda livre de haste à altura de 25 mm se baseou nos trabalhos de Silva et al. (2008) e Agrawal et al. (2010), que referem lesão medular moderada a grave com emprego da altura de queda de 25 mm. Postula-se que a aplicação de trauma medular discreto a moderado permita uma menor entrada de cálcio nas células e manutenção da função mitocondrial, possibilitando maior ocorrência de apoptose ao invés de necrose (Lu et al., 2000) e, assim, permitindo a avaliação de estratégias de neuroproteção.

Não foram observados comportamentos indicativos de dor como autofagia, alteração do apetite ou diminuição na ingestão de água. Além disso, alterações decorrentes da cirurgia como infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica não foram constatadas.

4.2 Tratamentos

A escolha das doses a serem empregadas se baseou nos estudos de Rigo et al. (2013) e Tonello et al. (2014), que obtiveram resultados satisfatórios quanto ao efeito anti-nociceptivo devido ao bloqueio de canais de cálcio em avaliações de dor, com aplicação intratecal de, respectivamente, 100 pmol da toxina nativa e 30 pmol da forma recombinante. Além disso, Diniz (2012) relatou redução dos níveis de glutamato e EROs no líquido com aplicação de 100 pmol da toxina nativa por via intratecal após indução de dor visceral em camundongos. Utilizou-se dosagem de 200 pmol em um rato deste estudo, tendo levado animal à óbito após manifestação de intensas alterações clínicas logo após sua aplicação, como tremores graves, agitação e dispnéia. Tal dose, no entanto, foi referida por Souza et al. (2008) como segura e eficaz na redução de nociceção em modelos de dor aguda e persistente em camundongos.

A administração intratecal foi de fácil execução e segura, após treinamento. Quando se punccionou o espaço sub-aracnóideo, alguns animais demonstraram movimento de cauda, assim como aumento seguido de redução da resistência à agulha, o que permitia a confirmação de que o procedimento foi realizado corretamente. A via de aplicação intratecal é amplamente utilizada em avaliações de analgesia e neuroproteção após LM por sua ação direta no tecido nervoso, sendo menos invasiva que a via de aplicação intralésional (Vanický et al., 2002; Souza, et al., 2008; Diniz, 2012). Foi adotada baseada no estudo de Oliveira (2014), que observou melhor efeito neuroprotetor de outro bloqueador de canais de cálcio, ômegaconotoxina-MVIA, quando administrado por meio de aplicação intratecal, em comparação com a via intramedular. As toxinas Ph α 1 β nativa e recombinante foram aplicadas por via intratecal por Castro e Silva et al. (2002), Souza et al. (2008), Diniz (2012), Diniz et al. (2014), sem a observação de efeitos colaterais.

A aplicação de volume total de 10 µL foi considerada segura quanto à geração de alterações hemodinâmicas em ratos e empregado sem intercorrências por Mestre et al., (1994), Arnolda (2000), Erdivali (2013) e Oliveira (2014).

A seleção do tempo de aplicação da toxina Phα1β recombinante se baseou nos dados de influxo temporal de cálcio após LM, que tem início minutos após o insulto mecânico (Young et al., 1982), com primeiro pico aos 45 minutos, concentração máxima em oito horas (Happel et al., 1981) e manutenção em concentrações elevadas por 24 a 48 horas (Fineman et al., 1993), ou mesmo por semanas (Oyinbo, 2011). Deste modo, a aplicação intratecal da toxina uma hora após TMA visou impedir a ocorrência do máximo influxo de cálcio devido ao bloqueio de CCVD.

O período de avaliação de 48 horas após TM permitiu analisar os efeitos colaterais e de neuroproteção da toxina Phα1β recombinante por meio de avaliações de toxicidade clínica e laboratorial, e avaliação da expressão gênica de fatores relacionados à apoptose, quantificação de ERO e peroxidação lipídica. Sabe-se que a toxina nativa em aplicação intratecal é capaz de gerar efeito anti-alodinia por até 24 horas, com ação máxima três horas após aplicação (Souza et al., 2008). Além disso, os picos de apoptose secundária ao trauma inicial ocorrem nos tempos de oito e 24 horas e aos sete dias após lesão medular. Outro fator relevante é que eventos como o aumento exacerbado do cálcio intracelular com consequente disfunção mitocondrial, formação de espécies reativas de oxigênios, peroxidação lipídica 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).

4.3 Avaliação clínica e laboratorial dos efeitos colaterais da Phα1β recombinante

A avaliação dos efeitos colaterais foi realizada através de observação de sinais clínicos de toxicidade e análises laboratoriais.

A avaliação clínica dos efeitos colaterais foi de fácil execução e demonstrou ser eficaz para determinar a toxicidade das doses empregadas da toxina. Entre os animais tratados com 100 pmol da toxina, 33,3% (2/6) apresentaram alterações de intensidade moderada. Os efeitos tiveram início poucos minutos após a aplicação, desaparecendo após, no máximo, 2 horas. Entre os animais controle e tratados com 25 e 50 pmol da toxina, não foram observadas alterações indicativas de toxicidade (Tabela 2). O único animal tratado com 200 pmol da toxina Phα1β recombinante apresentou, poucos minutos após a aplicação, tremor generalizado e de cauda de intensidade grave, vindo à óbito em aproximadamente uma hora.

Tabela 2 - Relação da apresentação de efeitos colaterais com diferentes doses de aplicação da Ph α 1 β recombinante 1 hora após o trauma medular agudo em ratos

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	% AFETADA
CN	6	0/6
CP	6	0/6
PH25	6	0/6
PH50	6	0/6
PH100	6	2/6 (33,3%)
PH200	1	1/1(100%)

A realização de exame hematológico é importante nos estudos com emprego de toxinas, uma vez que permite verificar possíveis alterações causadas por essas substâncias no organismo e sua gravidade. Além disso, neste exame pode-se observar efeitos tóxicos sobre a medula óssea, que é responsável pela formação de todos os elementos sanguíneos (Faro et al., 2008). Os valores das avaliações hematológicas (quantidade de hemácias, concentração de hemoglobina, quantidade de leucócitos totais) não apresentaram diferença em relação aos padrões fisiológicos para a espécie (Giknis e Clifford, 2008) ou entre os diferentes grupos experimentais (Figura 5). A manutenção de tais valores nos padrões fisiológicos sugere que os tratamentos não ocasionaram qualquer distúrbio na produção ou consumo das células sanguíneas, nas 48 horas seguintes à aplicação intratecal de 25, 50 e 100 pmol da toxina.

A análise de bioquímica sérica é uma importante fonte de avaliação nos estudos com toxinas por refletir o funcionamento hepático e renal, uma vez que grande parte das toxinas são metabolizadas pelo fígado e eliminadas por excreção renal. Os valores plasmáticos das provas hepáticas de ALT e AST e renais de ureia e creatinina não apresentaram diferença em relação aos padrões fisiológicos ou entre os grupos experimentais (Giknis e Clifford, 2008) (Figura 6). Na análise de FA plasmática, os três grupos tratamento apresentaram valores inferiores àqueles dos grupos controle, havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os valores, no entanto, se mantiveram dentro do intervalo fisiológico em todos os grupos. Sabe-se que a FA se trata de enzima de indução sintetizada em diversos tecidos corporais, entre eles o fígado (Thrall, 2004). Dessa forma, redução dos níveis de FA sem alteração concomitante de enzimas hepáticas mais específicas, como ALT e AST, não indicam doença hepática.

Na avaliação dos níveis plasmáticos de cálcio, observou-se redução estatisticamente significante deste íon ($p < 0,05$) nos animais tratados com 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante em relação ao grupo CP (Figura 7). Os valores, no entanto, se mantiveram no intervalo fisiológico para a espécie. Os valores de cálcio na urina não apresentaram diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais (Figura 7). Sabe-se que o influxo exacerbado de cálcio pode se manter por até 48 horas após lesão medular (Fineman et al., 1993), e que a toxina Ph α 1 β nativa, quando empregada na dose de 100 pmol, apresentou efeito antialodínico máximo devido ao bloqueio CCVD do tipo N duas horas após aplicação intratecal (Souza et al., 2011). Desse modo, a aplicação da toxina 1 hora após lesão medular não seria capaz de manter o bloqueio de CCVD durante todo o período em que se observa influxo de cálcio exacerbado após TMA. Sugere-se que, após fim do bloqueio de CCVD por ação da toxina, possa ter havido influxo de cálcio rebote, com movimentação desse íon para dentro da célula, o que geraria menores níveis plasmáticos 48 horas após LM em relação ao grupo que não recebeu o tratamento.

Não foram encontrados relatos na literatura de avaliações laboratoriais de hemograma, perfil bioquímico e urinálise associadas ao emprego da toxina Ph α 1 β recombinante. Os achados do presente estudo sugerem que esta toxina não gera anemia, hemólise, interferências na eritropoiese e lesão hepática ou renal nas doses utilizadas, quando aplicada pela via intratecal.

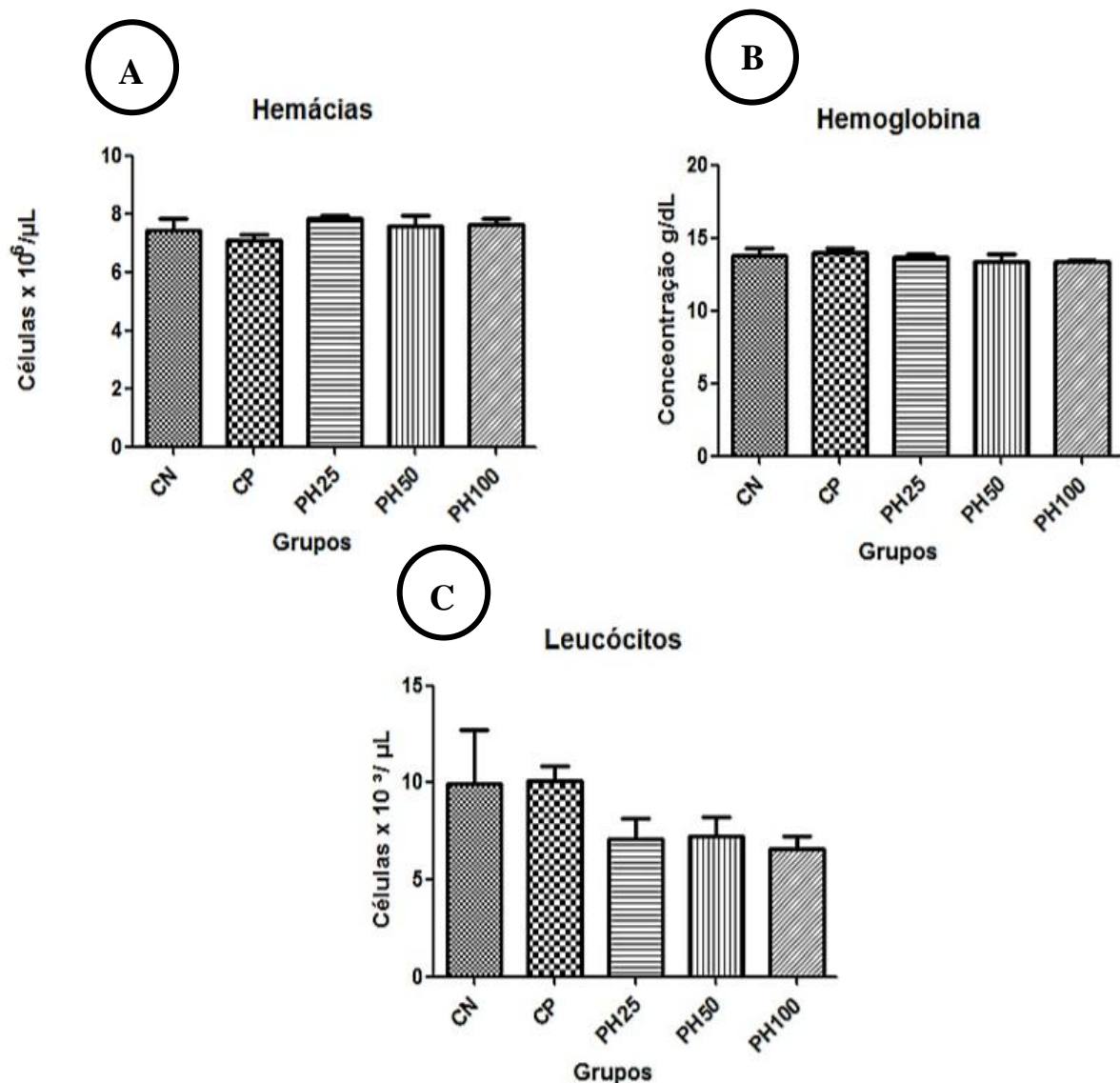


Figura 5 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos valores de hemácias (A), hemoglobina (B) e leucócitos totais (C) de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinal (demais grupos), tendo sido tratados com placebo (CN, CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (teste de tukey, $p > 0,05$). (A) Quanto à quantidade de hemácias, no grupo CN observou-se média de 7,43 e desvio padrão de 0,74; no grupo CP, observou-se média de 7,30 e desvio padrão de 0,30; no grupo PH25, observou-se média de 7,83 e desvio padrão de 0,29; no grupo PH50, observou-se média de 7,85 e desvio padrão de 0,28; no grupo PH100, observou-se média de 7,55 e desvio padrão de 0,52. (B) Quanto à concentração de hemoglobina, no grupo CN observou-se média de 138,00 e desvio padrão de 8,66; no grupo CP, observou-se média de 139,00 e desvio padrão de 8,41; no grupo PH25, observou-se média de 136,29 e desvio padrão de 6,80; no grupo PH50, observou-se média de 134,50 e desvio padrão de 5,60; no grupo PH100, observou-se média de 134,67 e desvio padrão de 4,08. (C) Quanto à quantidade de leucócitos totais, no grupo CN observou-se média de 1022,01 e desvio padrão de 324,33; no grupo CP, observou-se média de 1087,5 e desvio padrão de 254,00; no grupo PH25, observou-se média de 553,14 e desvio padrão de 240,87; no grupo PH50, observou-se média de 689,00 e desvio padrão de 147,01; no grupo PH100, observou-se média de 601,00 e desvio padrão de 281,71.

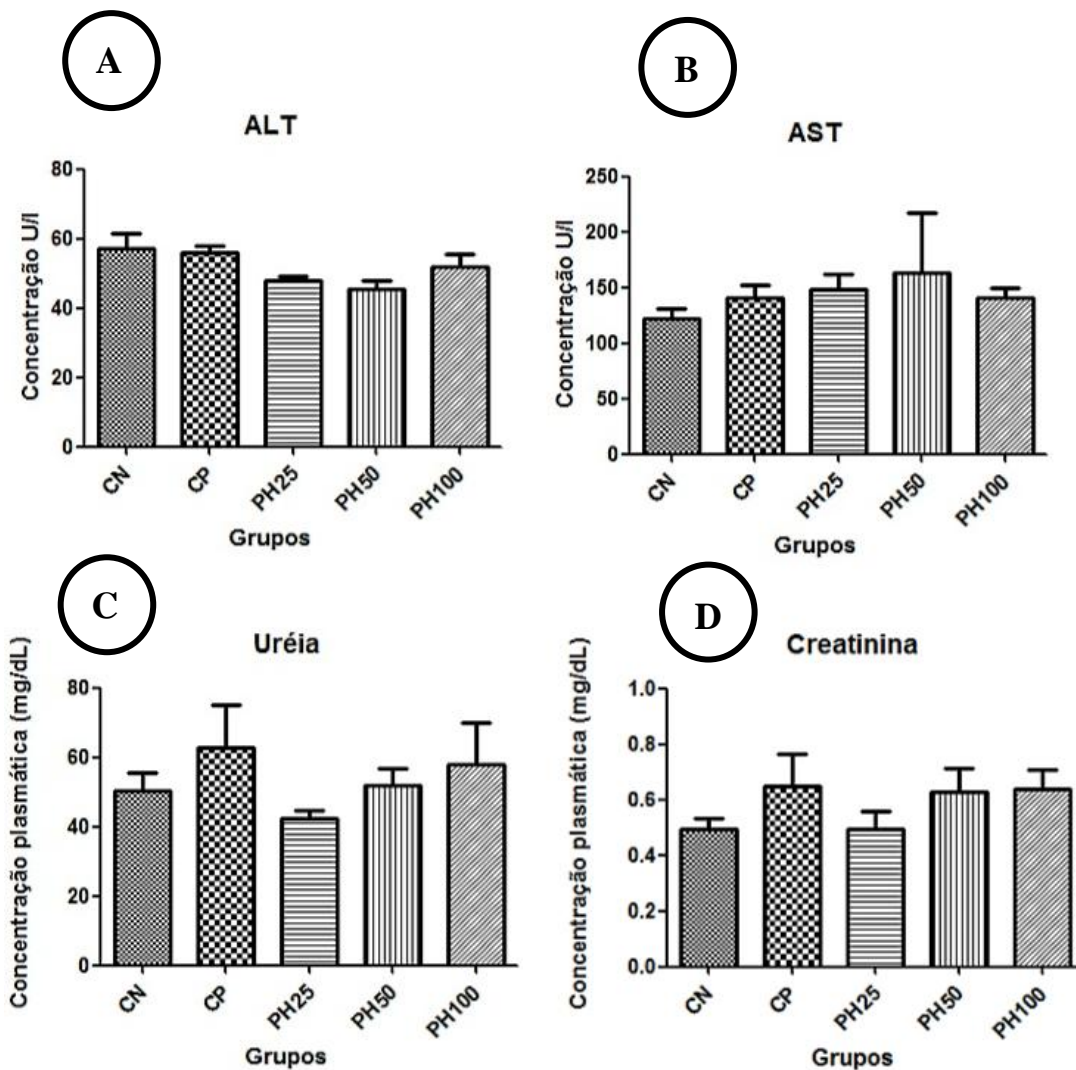


Figura 6 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de ALT (A), AST (B), uréia (C) e creatinina (D) de ratos Wistar submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinal (demais grupos), tendo sido tratados com placebo (CN,CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (teste de tukey, $p > 0,05$). (A) Quanto aos níveis plasmáticos de ALT, no grupo CN observou-se média de 57,16 e desvio padrão de 9,45; no grupo CP, observou-se média de 55,98 e desvio padrão de 4,67; no grupo PH25, observou-se média de 47,80 e desvio padrão de 3,38; no grupo PH50, observou-se média de 48,97 e desvio padrão de 7,50; no grupo PH100, observou-se média de 47,80 e desvio padrão de 8,75. (B) Quanto aos níveis plasmáticos de AST, no grupo CN observou-se média de 122,16 e desvio padrão de 19,72 ; no grupo CP, observou-se média de 141,43 e desvio padrão de 25,87; no grupo PH25, observou-se média de 148,71 e desvio padrão de 36,24; no grupo PH50, observou-se média de 175,50 e desvio padrão de 90,45; no grupo PH100, observou-se média de 138,39 e desvio padrão de 28,06. (C) Quanto aos níveis plasmáticos de ureia, no grupo CN observou-se média de 49,88 e desvio padrão de 9,78; no grupo CP, observou-se média de 62,74 e desvio padrão de 29,74; no grupo PH25, observou-se média de 49,09 e desvio padrão de 7,33; no grupo PH50, observou-se média de 48,76 e desvio padrão de 13,78; no grupo PH100, observou-se média de 42,62 e desvio padrão de 16,11. (D) Quanto aos níveis plasmáticos de creatinina, no grupo CN observou-se média de 0,49 e desvio padrão de 0,09; no grupo CP, observou-se média de 0,65 e desvio padrão de 0,28; no grupo PH25, observou-se média de 0,50 e desvio padrão de 0,16; no grupo PH50, observou-se média de 0,62 e desvio padrão de 0,19; no grupo PH100, observou-se média de 0,76 e desvio padrão de 0,33.

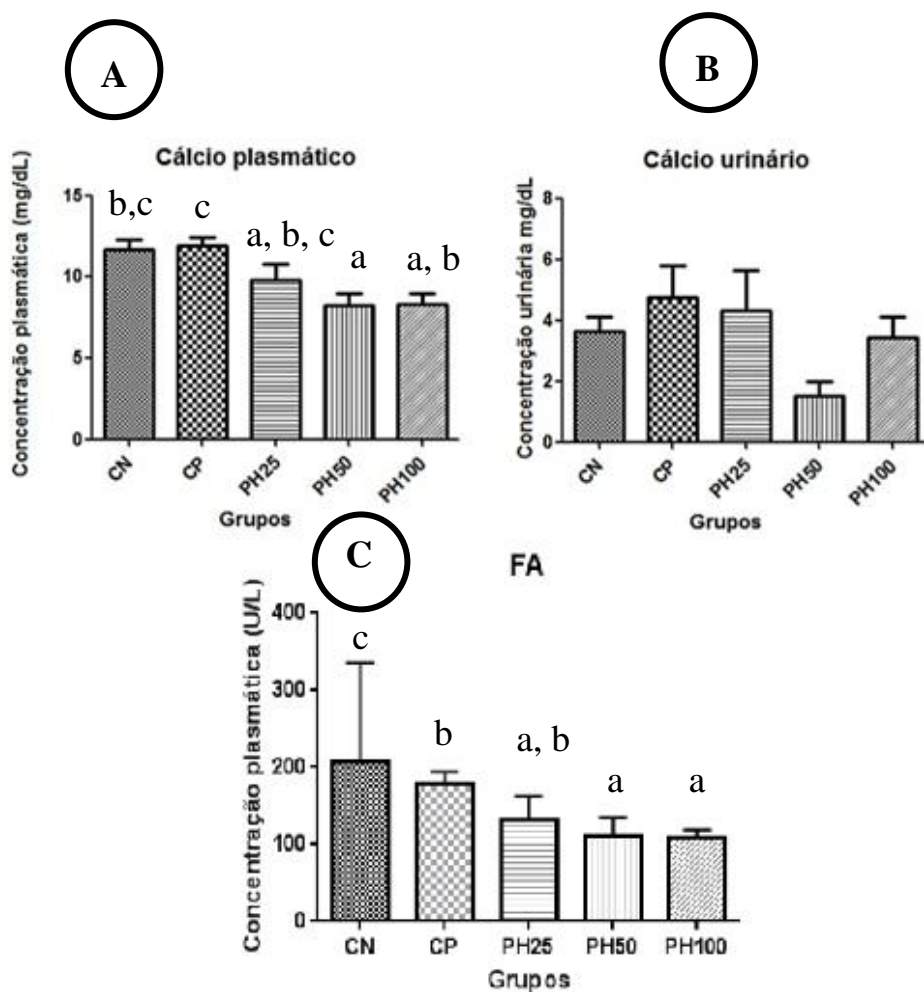


Figura 7 – Representação gráfica de médias e desvio-padrão das concentrações plasmáticas (A) e urinárias (B) de cálcio e da concentração plasmática de FA (C) de ratos submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinal (demais grupos), tendo sido tratados com placebo (CN,CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante. Letras minúsculas diferentes, em gráficos diferentes, expressam diferença estatística (teste de tukey, $p < 0,05$). (A) Quanto aos níveis de cálcio plasmático, no grupo CN observou-se média de 11,68 e desvio padrão de 1,11; no grupo CP, observou-se média de 11,89 e desvio padrão de 1,29; no grupo PH25, observou-se média de 9,81 e desvio padrão de 2,57; no grupo PH50, observou-se média de 8,15 e desvio padrão de 1,67; no grupo PH100, observou-se média de 8,51 e desvio padrão de 1,42. Os grupos tratados com 50 e 100 pmol da toxina apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). (B) Quanto aos níveis de cálcio na urina, no grupo CN observou-se média de 3,84 e desvio padrão de 0,67; no grupo CP, observou-se média de 4,80 e desvio padrão de 1,29; no grupo PH25, observou-se média de 4,50 e desvio padrão de 1,54; no grupo PH50, observou-se média de 2,49 e desvio padrão de 0,87; no grupo PH100, observou-se média de 3,11 e desvio padrão de 0,98. Não se observou diferença estatística entre os grupos, porém repetiu-se a tendência observada na avaliação plasmática de apresentação de menores índices nos grupos PH50 e 100 ($p > 0,05$). (C) Quanto aos níveis plasmáticos de FA, no grupo CN observou-se média de 209,65 e desvio padrão de 59,98; no grupo CP, observou-se média de 178,86 e desvio padrão de 15,53; no grupo PH25, observou-se média de 132,52 e desvio padrão de 29,73; no grupo PH50, observou-se média de 105,28 e desvio padrão de 19,68; no grupo PH100, observou-se média de 107,67 e desvio padrão de 10,99. Os grupos tratamento apresentaram índices inferiores de FA plasmática, com diferença estatisticamente significante em relação aos grupos controle ($p < 0,05$).

4.4 Avaliação da capacidade motora em campo aberto

A avaliação da capacidade motora em campo aberto teve início no período que antecedeu a intervenção cirúrgica para condicionamento dos animais, o que foi importante para reduzir o estresse durante a avaliação e garantir ausência de déficits anteriores. Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram deambulação normal, com escore máximo de 21 pontos pela escala BBB (Basso et al., 1996). Os animais submetidos à trauma medular apresentaram, imediatamente após indução da lesão, déficits neurológicos decorrentes da contusão inicial, com redução grave ou ausência de função motora nos membros pélvicos, sendo classificados em escores que variaram de 0 a 2 pontos (Tabela 3). Além disso, observou-se ausência de déficits neurológicos motores nos animais submetidos apenas à laminectomia (CN). Dessa forma, as condições para inclusão no estudo eram ausência de qualquer déficit neurológico na escala de BBB anterior à cirurgia, manutenção de escores máximos nos animais pertencentes ao grupo CN e redução grave ou ausência de função motora nos animais submetidos à trauma medular. A ausência de déficits neurológicos motores garantiu que a laminectomia não causou lesão medular importante, como relatado por Scheff et al. (2003), Ghazemlou et al. (2005) e Torres et al. (2010).

Tabela 3 – Valores médios de escores de deambulação por escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) de ratos submetidos à trauma medular agudo contusivo, avaliados imediatamente, em média 10 horas (dia 1) e 30 horas (dia 2) após indução do trauma medular. Os animais foram submetidos à avaliação anterior ao procedimento cirúrgico, em que apresentaram escore máximo de 21 pontos

AVALIAÇÃO	GRUPO				
	CN	CP	PH25	PH50	PH100
IMEDIATA	21	1	0	1	2
DIA 1	21	1	0	1	1
DIA 2	21	2	1	1	2

Segundo Sedý et al. (2008) e Fukushima (2013), a avaliação clínica de ratos após trauma medular agudo pode ser realizada de forma acurada utilizando-se, como teste único, a deambulação em campo aberto e classificação segundo a escala BBB.

No modelo de trauma medular empregado no referido estudo, buscou-se causar uma lesão de intensidade moderada a grave, confirmada pela avaliação funcional da capacidade motora. Desse modo, os animais submetidos à trauma medular apresentaram, imediatamente após indução da lesão, déficits neurológicos decorrentes da contusão inicial, com redução grave ou ausência de função motora nos membros pélvicos, classificados em escores que variaram de 0 a 2 pontos.

Durante as avaliações seguintes até a eutanásia, os animais submetidos apenas à laminectomia mantiveram seus escores máximos. Os animais submetidos à injúria medular não apresentaram qualquer tipo de evolução da função motora nas avaliações subsequentes à intervenção cirúrgica, mantendo valores médios semelhantes àqueles apresentados imediatamente após o trauma (Tabela 3). A avaliação foi realizada com objetivo primordial de garantir inexistência de indução de lesão medular nos animais submetidos à laminectomia e indução efetiva de trauma moderado à grave nos demais animais (Figura 8). A observação de ausência de recuperação de função era esperada no presente estudo, uma vez que a eutanásia foi realizada precocemente com 48 horas e o retorno de função motora após TMA em avaliações por escala de BBB foi referido por Costa (2010), Drummond, (2010) e Martins, (2012) a partir do quinto dia seguinte à indução de lesão.

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

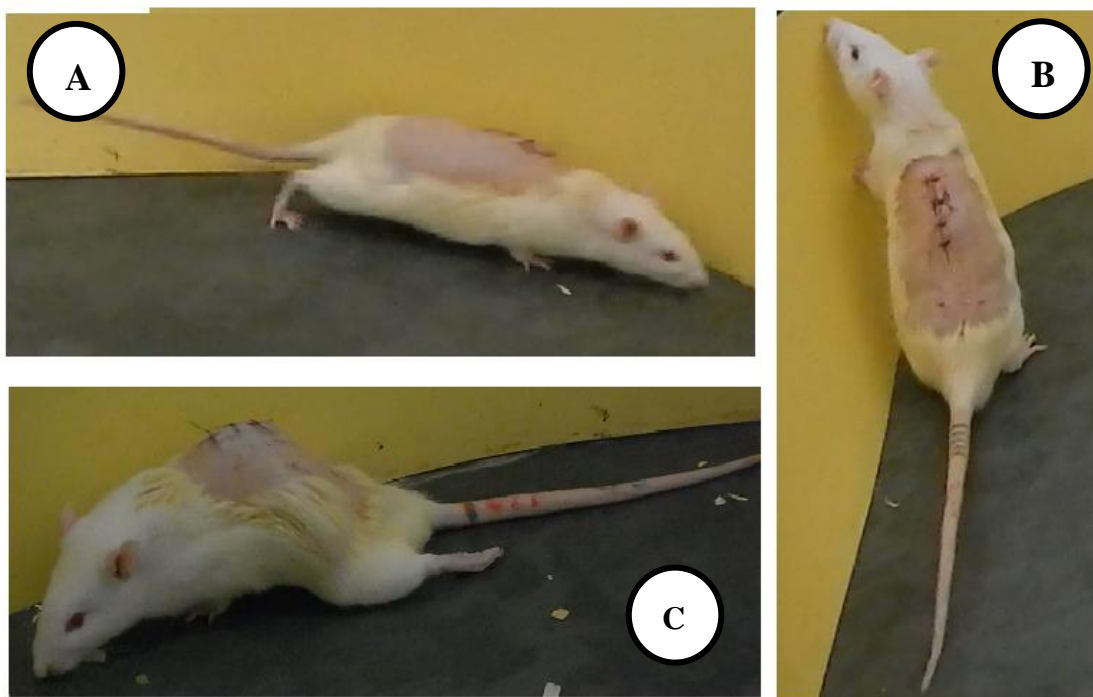


Figura 8 – Avaliação da função motora em campo aberto por escala de BBB em ratos Wistar. Figuras 7 **A)** e **B)** Animais do grupo controle negativo, avaliados após procedimento cirúrgico de laminectomia, classificados no escore 21. **A)** Animal com sustentação de peso nos quatros membros e cauda elevada. **B)**Animal com comportamento de investigação do ambiente e sustentação de peso sobre os membros pélvicos. **C)** Animal do grupo controle positivo após trauma medular agudo contusivo em que observa-se ausência de movimento a movimento de duas articulações (extenso de uma e discreto de outra) de membros pélvicos, sendo classificados na escala de 0 a 2.

4.5 Efeito da Ph α 1 β recombinante sobre níveis de ERO após lesão medular

A utilização da toxina Ph α 1 β recombinante não gerou diferença estatística nos níveis de EROs em relação ao grupo CP (Figura 9). A utilização de 25 pmol da toxina apresentou tendência de redução dos níveis de ERO em comparação aos grupos controle, o que, provavelmente, estaria relacionado à redução dos eventos patogênicos devidos ao acúmulo intracelular de cálcio pelo bloqueio de CCVD.

Outro fator observado foi tendência à apresentação de maiores níveis de ERO com aplicação de 100 pmol da toxina. Em conjunto com os efeitos colaterais clínicos observados em 33,3% dos animais que receberam esta dose, tal tendência pode estar relacionada à toxicidade dessa dosagem, em que haveria bloqueio excessivo dos canais de cálcio, podendo prejudicar o metabolismo de células saudáveis do tecido nervoso após lesão inicial.

A inibição da formação e a eliminação de EROs estão relacionadas à melhora na reocupação funcional após lesões do sistema nervoso central, sugerindo que a produção excessiva dessas substâncias contribui para lesão ao tecido e disfunção neurológica após TMA (Anderson et al., 1988; Hall et al., 1992). Segundo Donnelly e Popovich (2008), a detecção de picos de ERO já ocorre aproximadamente doze horas após lesão medular aguda e os níveis permanecem elevados por uma semana, retornando à quantidade basal em quatro a cinco semanas. Altos níveis de EROs iniciam reações oxidativas em cadeia, lesando moléculas, contribuindo para a progressão de lesão medular secundária e podendo levar à morte especialmente de neurônios, as células mais sensíveis ao estresse oxidativo do sistema nervoso central (Anderson e Hall, 1993).

Sabe-se que o aumento de cálcio intracelular ativa vias de produção de radicais livres. Assim, o bloqueio de CCVD, que é capaz de reduzir o influxo exacerbado de cálcio nas células após lesão medular, tem potencial para reduzir a produção de radicais livres, atenuando também as reações de peroxidação lipídica e a progressão da lesão medular secundária (Ates et al., 2007).

Diniz (2012) realizou aplicação de 100 pmol da toxina Ph α 1 β nativa por via intratecal anterior à indução experimental de dor visceral, tendo observado diminuição na quantificação de ERO no líquido cerebrospinal por método de diclorofluoresceína em comparação com grupos controle ou tratados com a ômega-conotoxina MVIIA. Não foram encontrados dados na literatura de avaliação de produção de ERO com utilização da Ph α 1 β recombinante.

Desse modo, apesar de ter demonstrado tendência à redução dos níveis medulares com 25 pmol e aumento com 100 pmol, a aplicação da toxina Ph α 1 β recombinante 1 hora após lesão medular não foi capaz de gerar alterações estatisticamente significantes nos níveis de ERO em avaliação 48 horas pós-TMA.

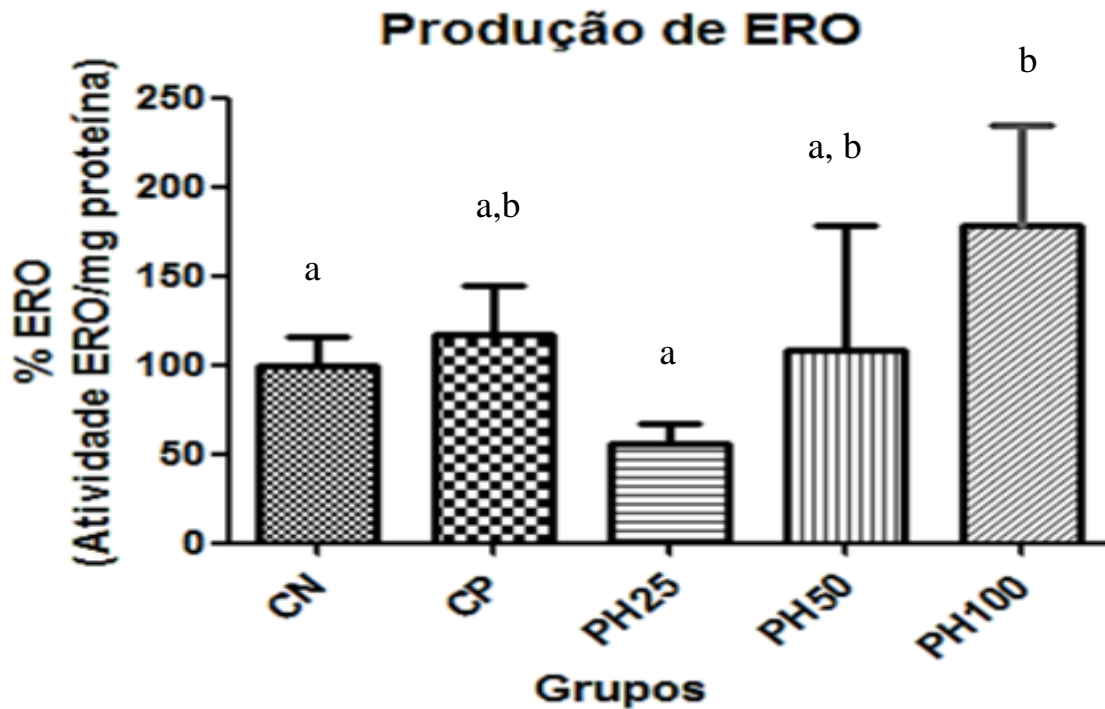


Figura 9 – Efeito da toxina Ph α 1 β recombinante sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) 48 horas após trauma medular. Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos níveis de ERO dos grupos submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinal, sendo tratados com placebo (CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste de tukey, $p < 0,05$). No grupo CN, observou-se média de 100,00 e desvio padrão de 16,13; no grupo CP, observou-se média de 117,46 e desvio padrão de 26,55; no grupo PH25, observou-se média de 55,70 e desvio padrão de 11,76; no grupo PH50, observou-se média de 108,54 e desvio padrão de 56,17; no grupo PH100 observou-se média de 170,45 e desvio padrão de 65,45.

4.6 Efeito da Phα1β recombinante sobre peroxidação lipídica após lesão medular

O grupo CN diferiu estatisticamente quanto aos níveis medulares de malondialdeído do grupo CP, reforçando os achados de Lavor (2013) e Oliveira (2014). Além disso, os grupos tratados com as três dosagens da toxina Phα1β recombinante apresentaram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos níveis de malondialdeído em relação ao grupo CP ([Figura 10](#)).

Sabe-se que, em excesso, os radicais livres sobrecarregam as defesas antioxidantes, desestabilizam a homeostase mitocondrial e levam à formação de mais EROs através de reação com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, tornando-se um ciclo vicioso de geração destas moléculas (Lander, 1997; Liu et al., 1998; Wu et al., 2009; Bains e Hall, 2012). Sua ação tóxica sobre os lipídeos de membranas celulares (peroxidação lipídica) configura um dos efeitos mais importantes das EROs, tendo sido observada por até cinco dias após lesão medular aguda em ratos (Christie et al., 2008). A peroxidação lipídica gera aumento da permeabilidade e fluidez da membrana plasmática a íons e outras substâncias, o que afeta a função e sobrevivência celular (Farooqui e Horrocks, 2001). Neste processo, a oxidação dos lipídeos gera dois principais produtos, que podem ser mensurados como sinalizadores do estresse oxidativo: malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Ayla et al., 2014).

Silva (2014) avaliou a ação da toxina Phα1β nativa no estresse oxidativo em ratos com cistite hemorrágica induzida experimentalmente e observou redução do estresse oxidativo pela aplicação da toxina, avaliado por quantificação de malondialdeído. Assim como a formação de EROs, não foram encontrados dados que correlacionem a aplicação da Phα1β recombinante a níveis de estresse oxidativo após lesão medular.

A atenuação da produção ou da ação de ERO está diretamente relacionada com o decréscimo da peroxidação lipídica. A redução da peroxidação lipídica com utilização de 25 e 50 pmol da toxina Phα1β recombinante corroborou com a tendência de redução dos níveis de ERO apresentada anteriormente. A dose de 100 pmol da toxina, apesar de não ter sido capaz de reduzir os níveis de EROs, gerou menores índices de MDA na avaliação de peroxidação lipídica. O mecanismo exato para entendimento desse fenômeno só seria possível pela avaliação de sistema anti-oxidante por meio de quantificação de seus componentes enzimáticos, como superóxido dismutase, catalases e glutatona. A indução de ação anti-oxidante, ainda que acompanhada de altos níveis de EROs, poderia gerar atenuação da peroxidação lipídica, por remoção ou neutralização dessas moléculas (Fernandes et al., 2012; Oliveira, 2014). Sugere-se que, por não ter sido capaz de reduzir a formação de EROs, porém ter apresentado índices inferiores de peroxidação lipídica, a toxina Phα1β recombinante tenha sido capaz de estimular o sistema anti-oxidante.

Tais achados indicam que a lesão medular primária contusiva foi capaz de induzir estresse oxidativo secundário de maneira eficiente. Além disso, o emprego da toxina Phα1β recombinante uma hora após trauma medular foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica 48 horas após indução da lesão, com possível participação do sistema anti-oxidante.

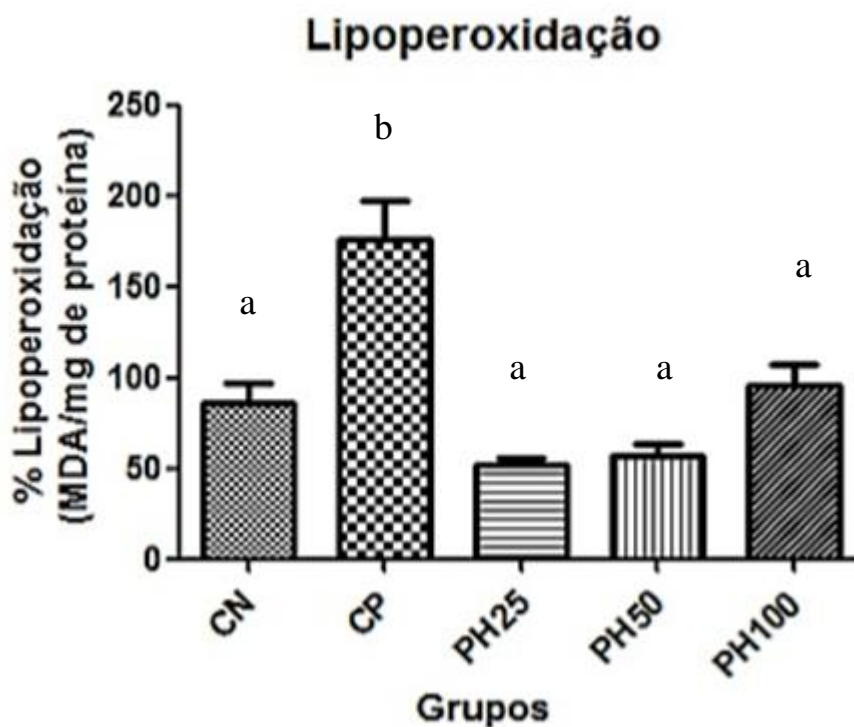


Figura 10 - Efeito da toxina Ph α 1 β recombinante sobre a peroxidação lipídica avaliada pelos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido medular 48 horas após trauma medular. Representação gráfica de médias e desvio-padrão dos níveis de MDA dos grupos submetidos à laminectomia dorsal (CN) e ao trauma medular espinhal, sendo tratados com placebo (CP) e 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (teste de tukey, $p < 0,05$). No grupo CN, observou-se média de 100,00 e desvio padrão de 41,12; no grupo CP, observou-se média de 176,00 e desvio padrão de 50,66; no grupo PH25, observou-se 51,91 e desvio padrão de 11,26; no grupo PH50 observou-se média de 57,25 e desvio padrão de 16,01; no grupo PH100, observou-se média de 95,57 e desvio padrão de 28,38.

4.7 Efeito da Ph α 1 β recombinante sobre expressão gênica de fatores relacionados à apoptose após lesão medular

Avaliou-se o efeito da aplicação da toxina Ph α 1 β recombinante sobre expressão gênica de fatores relacionados à apoptose Bax, Bcl-x1, Caspase-3,-6 e -9 por qRT-PCR, após indução de lesão medular contusiva experimental em ratos.

Os resultados foram expressos por meio de expressão gênica relativa, através de transformação fold change dada por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Figura 11).

Quanto à expressão de Bax, não foi observada diferença estatística 48 horas após lesão medular entre os grupos controle e grupos tratados com 25 e 50 pmol da Ph α 1 β recombinante. O grupo tratado com 100 pmol da toxina apresentou expressão gênica deste fator estatisticamente superior ao grupo CP, o que sugere tendência à geração de apoptose nesta dosagem.

Na avaliação de expressão de Bcl-x1, não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e grupos tratados com 25 e 50 pmol da toxina em avaliação 48 horas após lesão medular. No grupo tratado com 100 pmol da toxina, observou-se expressão deste fator estatisticamente superior aos demais grupos, inclusive o grupo CN.

Quanto à expressão de caspase-8, não foi notada diferença estatística entre os grupos. Tal proteína está relacionada à via extrínseca de apoptose, com acionamento de fatores como TNF- α ou Fas L, que se ligam à receptores “de morte” na membrana plasmática (Boldin et al., 1996; Portt et al., 2011). Relata-se que EROs possam aumentar a expressão desses receptores de morte celular, Fas L, colocando em ação a caspase-8 (Devadas et al., 2002; Wang et al., 2008), o que corrobora os achados do presente estudo, em que não houve diferença estatística quanto à produção de EROs e caspase-8 entre os grupos experimentais.

Quanto à expressão de caspase-9, não se observou diferença estatística entre os grupos, inclusive entre os grupos CN e CP. 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 encontraram diferença no momento 48 horas, ora não, o que corrobora os achados do estudo.

A ausência de diferença estatística entre os grupos quanto à expressão de caspases 8 e 9 corrobora a observação de que não houve, também, alteração quanto à expressão de caspase-3 entre os grupos. A caspase-3, efetuidora, é ativada por clivagem por caspases iniciadoras, como a 8 e 9. Assim, a expressão gênica da caspase-3 estaria diretamente relacionada à expressão das caspases 8 e 9 (Springer et al., 2000).

Sabe-se que a apoptose é regulada por cascata proteolítica intracelular, mediada principalmente por membros da família caspase (Keane et al., 2001). Foram descritos três diferentes mecanismos de sinalização para indução deste evento: via extrínseca (via receptores de morte), via intrínseca (mitocondrial) e via caspase-independente (Los et al., 1999; Nakagawa et al., 2000). O primeiro envolve a ligação de receptores de morte, que ativa a pró-caspase-8 e, possivelmente, outras caspases iniciadoras como -7 e -9. O segundo mecanismo é controlado pela mitocôndria, que diante de estímulo apoptogênico libera o citocromo C para o citoplasma, que se liga à Apaf-1 e à pró-caspase-9, que se torna ativa. A ativação das caspases iniciadoras -8 e -9, após estímulo extra ou intracelular resulta em ativação da caspase efetora (caspase-3), que

cliva proteínas necessárias à sobrevivência, determinando ocorrência de apoptose. O terceiro mecanismo, que envolve ativação da caspase-12 mediada pelo retículo endoplasmático foi proposto por Nakagawa et al. (2000).

A família de proteínas proto-oncogénica Bcl-2 tem papel central no controle da via mitocondrial de apoptose (intrínseca), com proteínas pró- (Bax, Bak) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl) que exercem sua função por meio de regulação de permeabilidade da membrana externa mitocondrial (Pitkanen et al., 2005; Portt et al., 2011). Sob condições apoptogénicas, proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, se translocam do citoplasma para as membranas mitocondriais (Saikumar et al., 1999), aumentando sua permeabilidade e promovendo liberação do citocromo C do compartimento mitocondrial intermembrana (Jurgensmeier et al., 1998). Por outro lado, as proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-xl, agem por mecanismos diversos, entre eles a ligação competitiva aos sítios de ligação das proteínas pró-apoptóticas e impedimento da passagem dessas substâncias por membranas celulares (Billen et al. 2008). O equilíbrio entre essas classes de proteínas é determinante para morte ou sobrevivência da célula.

Embora sejam poucos os estudos que investiguem o perfil de expressão gênica e proteica dos fatores pró- e antiapoptóticos em modelos *in vivo* de TMA, já foi demonstrado que os membros da família caspase e da família Bcl-2 estão suprarregulados na fase aguda da lesão medular (Springer et al., 2000; Kuwana e Newmeyer, 2003; Springer et al., 2009; Kotipatruni et al., 2011). Oliveira (2014) observou redução da expressão dos fatores pró-apoptóticos Bax, caspase-3 e 8 e aumento da expressão do fator anti-apoptótico Bcl-xl após aplicação de outro bloqueador de CCVD, a ômega-conotoxina MVIIA, no tratamento do TMA em ratos. A escolha de segmento caudal ao epicentro ou região de laminectomia para avaliação de expressão gênica de fatores relacionados à apoptose se deu baseada nos achados de Citron et al. (2000), Dasari et al. (2007) e Torres (2014), que demonstraram que os segmentos caudais ao epicentro da lesão exibiram maior quantidade de células apoptóticas em relação aos segmentos craniais. Não foram encontradas referências na literatura de tal avaliação associada à utilização da toxina Ph α 1 β nativa ou recombinante após lesão medular.

Os achados do presente estudo indicam que, apesar de ter sido eficaz na redução da peroxidação lipídica, a toxina Ph α 1 β recombinante não foi capaz de gerar efeito anti-apoptótico em aplicação uma hora após trauma medular agudo experimental em ratos.

No grupo tratado com 100 pmol da toxina, ainda que tenha havido expressão gênica estatisticamente superior do fator anti-apoptótico Bcl-xl, o aumento estatisticamente significativo da expressão de Bax e a tendência à superioridade da expressão das caspases iniciadoras 8 e 9 podem sugerir toxicidade desta dosagem no tecido medular, provavelmente devido ao bloqueio excessivo de CCVD.

Sugere-se que, apesar de não ter sido notada redução na expressão gênica de fatores relacionados à apoptose, a toxina Ph α 1 β recombinante pode apresentar efeito neuroprotetor, devido à sua capacidade de reduzir peroxidação lipídica.

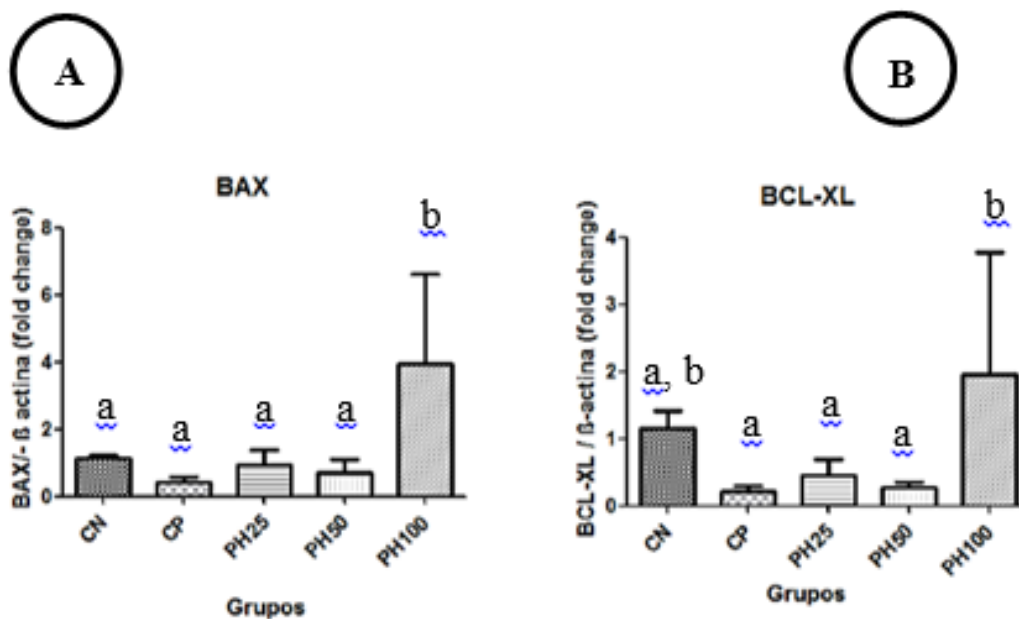


Figura 11 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados á apoptose Bax (A) e Bcl-xl (B). Letras minúsculas diferentes, em gráficos distintos, expressam diferença estatística (teste de tukey, $p < 0,05$). (A) Quanto à expressão gênica de BAX, o grupo CN apresentou média de 1,13 e desvio padrão de 0,12; o grupo CP apresentou média de 0,44 e desvio padrão de 0,15; o grupo PH25 apresentou média de 0,93 e desvio padrão de 0,44; o grupo PH50 apresentou média de 0,71 e desvio padrão de 0,40; o grupo PH100 apresentou média de 3,96 e desvio padrão de 2,40. (B) Quando à expressão gênica de BCL-XL, o grupo CN apresentou média de 1,16 e desvio padrão de 0,25; o grupo CP apresentou média de 0,22 e desvio padrão de 0,07; o grupo PH25 apresentou média de 0,46 e desvio padrão de 0,24; o grupo PH50 apresentou média de 0,27 e desvio padrão de 0,10; o grupo PH100 apresentou média de 1,95 e desvio padrão de 1,81.

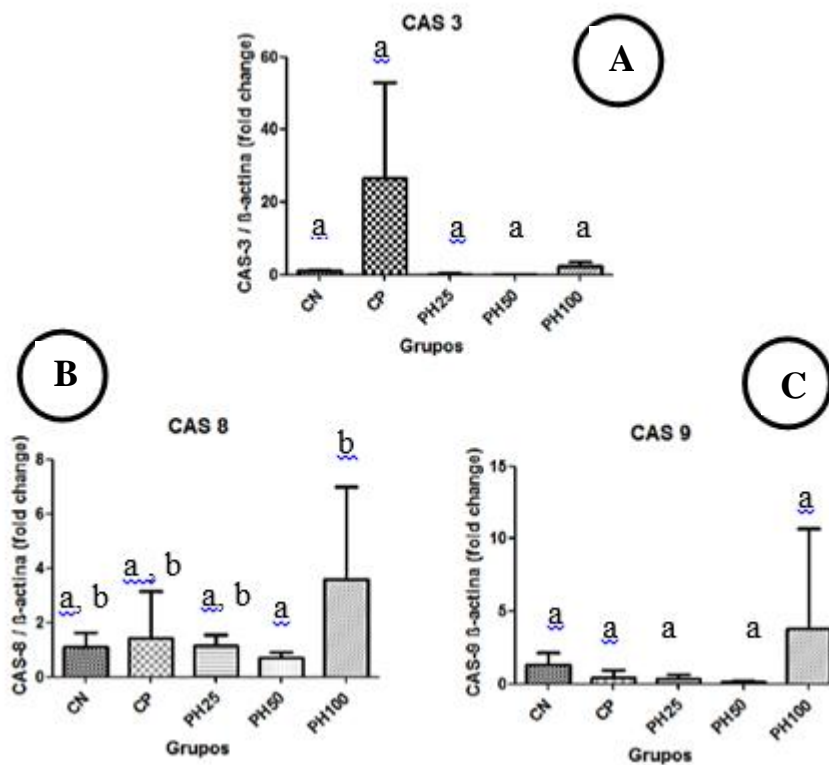


Figura 12- Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica dos fatores relacionados á apoptose Caspase-3(A), Caspase-8 (B) e Caspase-9 (C). Letras minúsculas diferentes, em gráficos distintos, expressam diferença estatística (teste de tukey, $p < 0,05$). (A) Quanto à expressão de caspase-3, no grupo CN observou-se média de 1,21 e desvio padrão de 0,65; no grupo CP observou-se média de 25,43 e desvio padrão de 20,46; no grupo PH25 observou-se média de 0,28 e desvio padrão de 0,19; no grupo PH50 observou-se média de 0,24 e média de 0,15; no grupo PH100 observou-se média de 2,37 e desvio padrão de 1,97. (B) Quanto à expressão de caspase-8, no grupo CN observou-se média de 1,11 e desvio padrão de 0,51; no grupo CP observou-se média de 1,43 e desvio padrão de 1,25; no grupo PH25 observou-se média de 1,13 e desvio padrão de 0,44; no grupo PH50 observou-se média de 0,71 e desvio padrão de 0,21; no grupo PH100 observou-se média de 3,58 e desvio padrão de 2,14. (C) Quando à expressão de caspase-9, no grupo CN observou-se média de 1,35 e desvio padrão de 0,80; no grupo CP observou-se média de 0,46 e desvio padrão de 0,40; no grupo PH25 observou-se média de 0,38 e desvio padrão de 0,16; no grupo PH50 observou-se média de 0,14 e desvio padrão de 0,04; no grupo PH100 observou-se média de 3,77 e desvio padrão de 3,01.

5. CONCLUSÕES

A queda de haste de 10 g a 25 mm de altura por meio de aparelho estereotáxico indutor de trauma à medula Mascis Impactor foi capaz de produzir lesão medular aguda em ratos Wistar de intensidade moderada à severa, confirmada por avaliação da capacidade motora por escala de BBB.

A toxina Ph α 1 β recombinante empregada nas doses de 25 e 50 pmol por via intratecal é segura, não tendo apresentado efeitos colaterais clínicos ou laboratoriais. Quando empregada na dosagem de 100 pmol pela mesma via, gerou alterações clínicas em 33,3% dos animais. Tais alterações, no entanto, não foram relacionadas à ocorrência de alterações laboratoriais.

O emprego de 25, 50 e 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante não gerou alteração nos níveis de EROs no tecido medular, mas teve ação anti-oxidante, havendo redução dos níveis de malondialdeído, demonstrando efeito neuroprotetor na lesão de peroxidação lipídica.


O emprego de 25 e 50 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante não foi capaz de gerar estímulo anti-apoptótico, em avaliação de expressão gênica de Bax, Bcl-x1, caspase-3, caspase-8 e caspase-9.

O emprego de 100 pmol desta toxina gerou aumento da expressão gênica de fator pró-apoptotico Bax e do fator anti-apoptótico BCL-XL.

Após emprego de 100 pmol da toxina Ph α 1 β recombinante, a observação de aumento dos níveis de EROs e da expressão do fator pró-apoptótico Bax, em conjunto com a ocorrência de efeitos colaterais, demonstra toxicidade desta dosagem.

6. ANEXO

6.1 Anexo 1- Protocolo de aprovação pelo CEUA- UFMG

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 124 / 2015, relativo ao projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA TOXINA Ph α 1 β NO TRATAMENTO DO TRAUMA MEDULAR AGUDO EM RATOS", 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 31/08/2015. Este certificado espira-se em 31/08/2020.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 124 / 2015, related to the Project entitled "AVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF Ph α 1 β TOXIN 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 31/08/2015. This certificates expires in 31/08/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 31/08/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMAR, A.P.; LEVY, M. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord. *Neurosurg.*, v. 44, p. 1027-1039, 1999.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 420-430, 2002.

ASLAN, A.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M.E. et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. *Eur. Spine J.*, v. 18, p. 1442-1451, 2009.

BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J. Neurotrauma*, v. 23, p. 318-334, 2006.

BARTHOLDI, D.; SCHWAB, M. E. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord in mouse: an in situ hybridization study. *Eur. J. Neurosc.*, v. 7, p. 1422-1438, 1997.

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, DM; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAM , J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*, v. 1, p. 1-21, 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.

BEATTIE, E. C.; STELLWAGEN, D.; MORISHITA, W.; BRESNAHAN, J. C.; HA, B. K. Control of synaptic strength by glial TNF- α . *Science*, v. 295, p.2282-2285, 2002.

BEATTIE, M. S.; FAROOGUI, A. A.; BRESNAHAM , J. C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 10, p. 915-925,2000.

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.

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.

BOWERSOX, S.S.; SINGH, T.; LUTHER, R.R. Selective blockade of N-type voltagesensitive calcium channels protects against brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.*, v. 747, p. 343347, 1997.

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.

BRITO, L. M. O; CHEIN, M. B. C.; MARINHO, S. C.; DUARTE, T. B. Avaliação epidemiológicas dos pacientes vítimas de traumatismo raquimedular. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 38, p. 304-309, 2011.

BROUNS, R.; DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin. Neurol. Neurosur.*, v. 11, p. 483-495, 2009.

BUCHERL, W. *Invertebrados: as aranhas*. Ed. Edart, São Paulo, 158 p., 1972.

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

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.

CAMPOS, M. F.; RIBEIRO, A. T.; LISTIK, S.; PEREIRA, C. A. B.; SOBRINHO, J. A.; RAPOPORT, A. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 35, p. 88-93, 2008.

CANDÉ, C.; COHEN, I.; DAUGAS, E.; RAVAGNAN, L.; LAROCLETTE, N.; ZAMZAMI, M.; KROEMER, G. Apoptosis-inducing factor: a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, v. 84, p. 215-222, 2002.

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 E SILVA JR., O.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico, *Acta Cir. Bras.*, v. 17, p. 96-100, 2002.

CASTRO-JUNIOR, C. J.; MILANO, J.; SOUZA, A. H.; SILVA, J. F.; RIGO, F. K.; DALMOLIN, G.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; BARROS, A. G.; GOMEZ, R. S.; SILVA, M. A.; KUSHMERICK, C.; FERREIRA, J.; GOMEZ, M. V. Ph α 1 β toxin prevents capsaicin-induced nociceptive behavior and mechanical hypersensitivity without acting on TRPV1 channels. *Neuropharmacology*, v. 71, p. 237-246, 2013.

CHACÓN, S.C.; NIETO-SAMPEDRO, M. Pathophysiology of spinal Cord injury. A review. *Vet. Mex*, v.36, n.1, p. 75-86, 2005.

CHOI, D. W.; ROTHMANN, S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosc.*, v. 13, p. 171-182, 1990.

CHOI, D.W. Excitotoxicity cell death. *J. Neurobiol.*, n. 23, p. 1261-1276, 1992.

COLTER, S.; RUCKER, N. C. Acute injury to the central nervous system. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.18, n.3, p.545-563, 1988.

CORDEIRO MDO, N.; de FIGUEIREDO, S. G.; VALENTIM, A. C.; DINIZ, C. R.; VON EICKSTED, V. R.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, v. 31, p.35-42, 1993.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D. P.; CAPUTI, A. P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, v. 53, p.135-59, 2001.

DASARI, V. R; SPOMAR, D. G.; GONDI, C. S.; SLOFFER, C. A.; SAVING, K. L.; GUJRATI, M.; RAO, J. S.; DINH, D. H. Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, v. 24, p. 391-410, 2007.

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.

de SOUZA, A.H.; CASTRO Jr C.J.; RIGO, F.K.; de OLIVEIRA, S.M.; GOMEZ, R.S.; DINIZ, D.M. An evaluation of the antinociceptive effects of Ph α 1 β , a neurotoxina from the spider *Phoneutria nigriventer*, and ω -conotoxin MVIIA, a cone snail *Conus magus*

toxin, in a rat model of inflammatory and neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 33, p.58-67, 2013.

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

DINIZ, D. M.; DE SOUZA, A. H.; PEREIRA, E. M. R.; DA SILVA, J. F.; RIGO, F. K.; ROMANO-SILVA, M. A.; BINDA, N. ; CASTRO, C. J.; CORDEIRO, M. N. ; FERREIRA, J. ; GOMEZ, M. V. Effects of the calcium channel blockers $Pha1\beta$ and ω -conotoxin MVIIA on capsaicin and acetic acid-induced visceral nociception in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 126, p. 97-102, 2014

DINIZ, D.M. *Ação farmacológica da toxina $Pha1\beta$ isolada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em modelos de dor visceral em camundongos*. 2012. Dissertação (pós-graduação em Medicina e Biomedicina)- Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte.

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.*, v. 81, p. 163221, 1999

DOHRMANN, G. J. Spinal cord trauma: a historical review. *Arch. Neur.*, v. 27, p468-473, 1972.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, v. 209, p. 378-88, 2008.

DRUMMOND, B.L. Subfração PnTx 3-6 do veneno da aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*) 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.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as a new lead to CNS drugs. *Nat. Prod. Rep.*, v. 24, p.145-161, 2007.

FEHLINGS, M. G.; VACCARO, A.; WILSON, J. R.; SINGH, A. W.; CADOTTE D.; HARROP, J. S.; AARABI, B.; SHAFFREY, C.; DVORAK, M.; FISHER, C.; ARNOLD, P.; MASSICOTTE, E. M.; LEWIS, S.; RAMPERSAUD, R. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PLoS One*, v. 7, e32037. doi: 10.1371/journal.pone.0032037, 2012.

FEHLINGS, M.G.; NGUYEN, D.H. Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *J Clin Immunol*, v.1, p. S109–S112, 2010. Fehlings et al., 2008,

- 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
- FLEMING, J. C.; NORENBURG, M. D.; RAMSAY, D. A.; DEKABAN, G. A.; MARCILLO, A. E.; SAENZ, A. D.; PASQUALE-STYLE, M.; DIETRICH, W.D.; WEAVER, L. C. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, v. 129, p. 3249-69, 2006.
- FORD, R. W. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J Neurosurg*, v. 59, p. 268-275, 1983.
- FUKUSHIMA, F.B. Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol e etomidato em ratos submetidos ao trauma medular espinhal. 2012. 85p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, v. 25, p. 4798–4811, 2006.
- GHOSH, A.; GREENBERG, M. E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, v. 14, p. 239-47, 1995.
- GOMEZ M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M.A. Phoneutria nigriventer venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol*, v. 22, p.579-588, 2002.
- GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A.; PRADO, M.A.M. Effects of tityustoxin on central nervous system. *J. Toxicol. (Toxin Rev.)*, v. 14, p. 437-456, 1995.
- GREEN, D. R. Mitochondria and apoptosis. *Science*, v. 28, p.1309-1312, 1998.
- 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.
- GRUNER, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*. v. 9, p. 123-126, 1992.
- GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M. A.; CRUZ, J. S.; BEIRÃO, P. S.; KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; PRADO, M. A. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that

blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol*, v. 122, p. 591,597, 1997.

GURKAN, C.; ELLAR, D. J. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.*, v. 33, 2005.

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.

GWAK, Y.S.; CROWN, E. D.; UNABIA, G. C.; HULSEBOSCH, C. E. Propentofylline attenuates allodynia, glial activation and modulates GABAergic tone after spinal cord injury in the rat. *Pain*, v. 138, p 410–422, 2008.

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

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.

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

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v. 407, p.770-776, 2000.

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

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.

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

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.

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.
- JURGENSMEIER, J.M.; XIE, Z.; DEVERAUX, Q. et al. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 4997-5002, 1998
- KAWAGUCHI, M.; FURUYA, H.; PATEL, P. Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J. Anesth.*, v. 19, p. 150-156, 2005.
- 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.
- KLUSMAN, I.; SCHWAB, M. E. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 762, p. 173-184, 1997.
- KOCHEGAROV, A.A. Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutic application. *Cell Calcium*, v. 33, p. 145-162, 2003. Krajewski et al., 1999;
- KWON, B.K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J.N. et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.*, v. 4, p. 451-464, 2004.
- LANZ, O.; BERGMAN, R.; SHELL, L. Initial 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, 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.
- Levi et al., 1993
- 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.

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, 1999aLiu et al., 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, 201

LIVERMAN, T.C.; ALTEVOGT, M.B.; JOY, E.J. et al. (2005) Spinal cord injury: progress, promise, and priorities. Washington: *National Academy of Sciences*, 2005. 360 p.

LONJON, N.; KOUYOUMDJIAN, P.; PRIETO, M.; BAUCHET, L.; HATON, H.; GAVIRIA, M.; PRIVAT, A.; PERRIN, F. E. Early functional outcomes and histological analysis after spinal cord compression injury in rats. *J Neurosurg Spine*, v. 12, p. 106-113, 2010.

LOVE, S.; CRUZ-HOFLING, M.A. Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms which slow inactivation of sodium channels. *Acta Neuropathol.*, v. 70, p. 1-9, 1986.

LU, J.; ASHWELL, K. W.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury. *Spine*, v. 25, p. 1859-1866, 2000.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. *Toxicon*, v.26, p. 759-772, 1988.

MACIEL, I.S.; AZEVEDO, V.M.; PEREIRA, T.C.; BOGO, M.R.; SOUZA, A.H.; GOMEZ, M.V.; CAMPOS, M.M. The spinal inhibition of N-type voltage-gated calcium channels selectively prevents scratching behavior in mice. *Neuroscience*, v. 277, p. 794-805, 2014.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, v. 146, p. 3-15, 1995.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalininduced nociception. *J. Neurosci.*, v. 14, p. 4882-4890, 1994

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

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.

McADOO, D. J.; XU, G.Y.; ROBAK, G.; HUGHES, M. G. Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol.*, v. 159, p. 538-544, 1999.

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. 283285, 2000.

McDONOUGH, S. I.; SWARTZ, K. J.; MINTZ, I. M.; BOLAND, L. M.; BEAN, B. P. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by omega-conotoxin MVIIC. *J Neurosci*, v. 15, p. 2612-2623, 1996.

MEDEIROS, S. B.; PEREIRA, C. D. F. D.; RIBEIRO, J. L. S.; FERNANDES, L. G. G.; MEDEIROS, P. D.; TOURINHOS, F. S. V. Acidentes causados por phoneutria nigriventer: diagnósticos e intervenções de enfermagem. *J. res.: fundam. care. Online*, v. 5, p. 467-474, 2013.

MELO, E.G.; CARVALHO, P.H.; ROSADO, I.R.; MARTINS, B.D.C. Fisiopatologia e considerações terapêuticas no trauma medular agudo. *Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia*, n.69,p.84-95,2013.

MENDES, D.S.; ARIAS, M.V.B. Traumatismo da medula espinhal em cães e gatos: estudo prospectivo de 57 casos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, p. 1304-13012, 2012.

METZ, G. A.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; SCHWAB, M. E.; FOUAD, K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res*, v. 883, p. 165-177, 2000.

MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N.; BLEGGI-TORRES, L. F.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, p. 203-208, 2003.

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.

NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA, N. et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-b. *Nature*, v. 403, p.98-103, 2000.

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.

OLBY, N. J. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.13, p.399-407, 1999.

- OLBY, N.J.; MACKILLOP, E.; CERDAGONZALEZ, 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. O.; BINDA, N. S.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, C. M. O.; ROSADO, I. R.; TAGUCHI, T. M.; ALVES, E. G. L.; MELO, M. M.; GOMEZ, M. V.; MELO, E. G. ω -conotoxin MVIIA intralesional injection in spinal cord injury in rats, *Ciência rural*, v. 46, p. 150-156, 2016.
- OLIVEIRA, K. M. *ω -conotoxina MVIIA isolada ou associada ao dantrolene sódico no trauma medular agudo em ratos*. 2014. Tese (doutorado em Medicina Veterinária)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- ONOSE, G.; ANGHELESCU, A.; MURESANU, D. F.; PADURE, L.; HARAS, M. A.; CHENDREANU, C. O.; ONOSE, L. V.; MIREA, A.; CIUREA, A. V.; EL MASRI, W.S.; VON WILD, K. R. A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 47, p. 716-726, 2009.
- 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.
- PANJABI, M.M.; WRATHALL, J.R. Biomechanical analysis of experimental spinal cord injury and functional loss. *Spine*, v.13, p.1365-1370, 1988.
- PICKETT, G. E.; CAMPOS-BENITEZ, M.; KELLER, J. L.; DUGGAL, N. Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Canada. *Spine Journal*, v. 31, p.799-805, 2006.
- 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.
- POPOVICH, P. G.; WEI, P.; STROKES, B. T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*, v. 377, p. 443-464, 1997.

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

PRADO, M. A.M.; GUATIMOSIM, C.; GOMEZ, M.V. et al. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: The toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *J Biochem*, v.314, p.145–150, 1996.

RABCHEVSKY, A. G.; PATEL, S. P.; SPRINGER, J. E. Pharmacological interventions for spinal cord injury: where do we stand? How might be setp forward? *Pharm. and Therap.*, v. 132, p. 15-29, 2011.

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.

REZENDE, L.J.; CORDEIRO, M.N.; OLIVEIRA, E.B.; DINIZ, C.R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, v.29, p.1225–1233, 1991.

RIDGEWAY, B.; WALLACE, M.; GERAYLI, A. Ziconotide for the treatment of severe spasticity after spinal cord injury. *Pain*, v. 85, p. 287-295, 2000.

RIEDL, S.J.; SHI, Y. Caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 5, p. 897-907, 2004.

RIGO, F.K.; DALMOLIN, G.D.; TREVISAN, G.; TONELLO, R.; SILVA, M.A.; ROSSATO, M.F.; KLAFKE, J.Z.; CORDEIRO, M.N.; CASTRO Jr, C.J.; MONTIJO, D.; GOMEZ, M.V.; FERREIRA, J. Effect of ω -conotoxin MVIIA and Ph α 1 β on paclitaxel-induced acute and chronic pain. *Pharmac. Bioch. And behavior*, v.114-115, p.16-22, 2013

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

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

ROSA, F.; TREVISAN, G.; RIGO, F. K.; TONELLO, R.; ANDRADE, E. L.; CORDEIRO, MDO. N.; CALIXTO, J. B.; GOMEZ, M. V.; FERREIRA, J. Ph α 1 β , a peptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* shows antinociceptive effects after continuous infusion in a neuropathic pain model in rats. *Anesth. Analg.*, v. 119, p. 196-202, 2014.

- 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
- ROSENWEIG, E. S.; McDONALD, J. M. Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Current Opinion in Neurology*, v. 17, p. 121-131, 2004.
- ROUSSOS, I.; RODRÍGUEZ, M.; VILLÁN, D. et al. Development of a rat model of spinal cord injury and cellular transplantation. *Transplant. Proc.*, v.37, p.4127-4130, 2005.
- ROWLAND, J. W.; HAWRYLUK, G. W. J.; KWON, B.; FEHLINGS, M. G. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgery Focus*, v. 25, p. 2-17, 2008.
- SAELENS, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, v. 23, p. 2861-2874, 2004.
- SANTOS, G. B.; CRISTANTE, A. F.; MARCON, R. M.; SOUZA, F. I.; BARROS FILHO, T. E. P.; DAMASCENO, M. L. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta ortop. Bras.*, v. 19, n.2, 2011.
- SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M.G. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J. Neurosurg.*, v. 94, p. 245-256, 2001
- SEKHON, L.H.S.; FEHLINGS, M.G. Epidemiology, demographics, and Pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v. 26, p. S2-S12, 2001.
- SEVERO, M.S.; TUDURY, E.A.; ARIAS, M.V.B. Fisiopatologia do trauma e da compressão à medula espinhal de cães e gatos. *Med. Vet.*, v. 1, p. 78-85, 2007.
- SIEGENTHALER, M. M.; TU, M. K.; KEIRSTEAD, H. S. The extent of myelin pathology differs following contusion and transection spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 24, p. 1631-1646, 2007.
- SILVA, C.M.O. Condroitinase ABC e células tronco mesenquimais no tratamento de *Rattus norvegicus* submetidos a trauma da medula espinhal. 2013. 73p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, p. 641650, 2008.

SNUTCH, T.P.; SUTTON, K.G.; ZAMPONI, G.W. Voltage-dependent calcium channels – beyond dihydropyridine antagonists. *Cur. Opin. Pharmacol.*, v. 1, p. 11-16, 2001

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.; KENNEDY, S.E. et al. Rapid calpain I activation and cytoskeletal protein degradation following traumatic spinal cord injury: attenuation with riluzole pretreatment. *J Neurochemistry*, v.69, p. 1592-1600, 1997.

SPRINGER, J.E.; AZBILL, R.D.; KENNEDY, S.E. et al. Rapid calpain I activation and cytoskeletal protein degradation following traumatic spinal cord injury: attenuation with riluzole pretreatment. *J Neurochemistry*, v.69, p. 1592-1600, 1997.

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.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Neurobiol.*, v. 56, p. 341358, 1998.

TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, v. 75, p. 15-26, 1991.

TONELLO, R.; RIGO, F.; GEWEHR, C.; TREVISAN, G.; PEREIRA, E. M. R.; GOMEZ, M. V.; FERREIRA, J. Action of Pha1 β , a peptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the analgesic and adverse effects caused by morphine in mice. *The journal of pain*, v. 15, p. 619-631, 2014.

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.

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.

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.

VIEIRA, L. B.; KUSHMERICK, C.; HILDEBRAND, M. E.; GARCIA, E.; STEA, A.; CORDEIRO, M. N. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3.6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 314, p. 1370-1377, 2005.

VITAL-BRAZIL, O.; VELLARD, J. Contribuição no estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 2, p. 5-77, 1925.

WALCZAK, H.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res*, v. 256, p. 58-66, 2000.

WEBB, A. A.; NGAN, S.; FOWLER, D. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic Science. *Can Vet J*, v. 51, p. 485-492, 2010a.

WEBB, A. A.; NGAN, S.; FOWLER, D. Spinal cord injury II: Prognostic indicators, standards of care, and clinical trials. *Can Vet J*, v. 51, p. 598-604, 2010b.

WU, Y.; ZHENG, M.; WANG, S. et al. Spatiotemporal pattern of TRAF3 expression after rat spinal cord injury. *J. Mol. Hist.*, DOI 10.1007/s10735-014-95752, 2014.

XU, G.-Y.; HUGHES, M.G.; YE, Z. et al. Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord. *Exp. Neurol.*, v. 187, p. 329-336, 2004.

XU, W.; CHI, L.; XU, R. et al. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 43, p. 204-213, 2005.

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

YOSHIDA, M.; SAKAI, T. Dantrolene, a calcium-induced calcium release inhibitor, prevents the acquisition of amygdaloid kindling in rats, a model of experimental epilepsy. *Tohoku J. exp. Med*, v.209, n.4, p.303-310, 2006.

YOUNG, W. MASCIS spinal cord contusion model. In: CHEN, J.; XU, X.M.; XU, Z.C. *Animal models of acute neurological injuries*. Ed. Humana Press, p. 411-421, 2009.

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

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