

SANDRO COELHO DE AZEVEDO

**ÔMEGA CONOTOXINA MVIC NO TRATAMENTO DO TRAUMA
MEDULAR AGUDO EM RATOS WISTAR**

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 Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária - UFMG
2018

A994o Azevedo, Sandro Coelho de, 1972-
Ômega conotoxina MVIIC no tratamento do trauma medular agudo em ratos Wistar/ Sandro
Coelho de Azevedo. – 2018.
56 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. Traumatismos da medula espinhal – Teses.
3. Medicamentos – Administração – Teses. 4. Estresse oxidativo – Teses. 5. Apoptose – Teses.
I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.

CDD – 636.089 7

FOLHA DE APROVAÇÃO

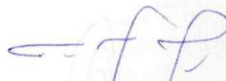
SANDRO COELHO DE AZEVEDO

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

Aprovada em 19 de Março de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador



Prof. Vitor Márcio Ribeiro
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC Minas



Prof. Benito Soto Blanco
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Pablo Herthel de Carvalho
Centro Universitário de Belo Horizonte - UNI-BH

“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo, por me dar saúde para eu caminhar a cada dia, com fé e perseverança, perseguindo meus objetivos com dignidade, honestidade e amor ao próximo.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, apoiando, orientando e dando todo suporte emocional necessário para chegar ao fim da caminhada. Ao meu Pai Barão, guerreiro, maior exemplo de amor e honestidade que uma pessoa pode ter, minha Mãe Lúcia, obrigado pelo apoio, pelo carinho. Meus irmãos Ramon e Thayana, pela energia, vibração e torcida que tiveram.

Às minhas maiores riquezas, Laura e Marcela, vivo pra vocês e por vocês, SEMPRE.

Um agradecimento mais que especial a minha esposa Luciana, sem a qual eu jamais teria chegado até aqui, companheira de todas as horas, não me deixou desistir nunca.

Agradeço à professora Eliane Gonçalves de Melo por ter acreditado em mim, por ter me orientado, ajudado a realizar muitos dos meus sonhos, por ter “puxado a minha orelha”, e sempre que necessário me recolocado na direção correta.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez e equipe do IEP - Santa Casa de BH , em especial ao Cláudio Antônio e ao Fernando Rubatino pela parceria e apoio ao desenvolvimento desse trabalho.

Àos Doutorandos Sebastian Gutierrez e Maria Paula Rajão, vocês são demais, agradeço de coração pela ajuda fundamental para execução dos trabalhos, pela amizade e carinho que tiveram comigo. Ao companheiro Pablo Herthel, pela paciência, dedicação, disponibilidade e ensinamentos.

Aos alunos de iniciação científica, por ter disponibilizado todo tempo do mundo para acompanhar os trabalhos , sempre com boa vontade e paciência . Deixo aqui toda minha gratidão a Marina Pinto Marlière por estar sempre presente desde o início .

Ao Professor Paulo Ricardo de Oliveira Paes e toda equipe de Laboratório de Análises Clínicas, em especial o residente Marco Túlio Gomes Campos pelo auxílio a execução das análises clínicas no laboratório.

À Professora Érica de Azevedo Costa e equipe da Preventiva, por disponibilizarem tudo que foi necessário para as avaliações do PCR-RT

Agradecimento especial ao CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE GRÁFICOS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE QUADROS.....	8
LISTA DE ANEXOS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 FISIOPATOGENIA DO TRAUMA MEDULAR AGUDO.....	14
2.1.1 EVENTOS PRIMÁRIOS.....	14
2.1.2 EVENTOS SECUNDÁRIOS.....	14
2.1.2.1 ISQUEMIA E DESEQUILÍBRIO DA HOMEOSTASE.....	14
2.1.2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA.....	15
2.1.2.2 TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E EXCITOTOXICIDADE.....	15
2.1.2.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
2.1.2.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	19
2.1.2.6 APOPTOSE E NECROSE CELULAR.....	20
2.2 BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO.....	21
2.2.1 CONOTOXINA MVHC.....	22
2.2.2 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 ANIMAIS.....	23
3.2 OBTENÇÃO CONOTOXINA MVHC.....	24
3.3 GRUPOS.....	25
3.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO E CIRÚRGICO.....	26
3.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA EM CAMPO ABERTO.....	29
3.6 AVALIAÇÃO SISTÊMICA E DOS EFEITOS COLATERAIS.....	30
3.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	31
3.7.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	31
3.7.2 QUANTIFICAÇÃO RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO.....	31
3.8 DETECÇÃO FATORES DE APOPTOSE CELULAR.....	31
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 TRAUMA.....	34
4.2 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	35
4.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E PROTEINOGRAMA.....	36
4.4 AVALIAÇÃO MOTORA.....	38
4.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	40
4.5.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	41
4.5.2 QUANTIFICAÇÃO RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO.....	41
4.6 DETECÇÃO DE FATORES DE APOPTOSE CELULAR.....	42
5 CONCLUSÕES.....	45
6 REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Rotas de entrada de cálcio nos neurônios após lesão medular.....	17
FIGURA 2 - Reação de Fenton e Haber-Weiss.....	19
FIGURA 3 - Fotografia dos animais acondicionados em caixas plásticas.....	23
FIGURA 4 - Fotografia do aparelho indutor de trauma mecânico MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study).....	27
FIGURA 5 - Representação esquemática MASCIS Impactor (A) ; Parâmetros gráficos (B)..	28
FIGURA 6 - Fotografia do procedimento anestésico experimental realizado em ratos Wistar tratados com MVIIC.....	28
FIGURA 7 - Fotografia do procedimento cirúrgico de laminectomia.....	29
FIGURA 8 - Fotografia do Rato Wistar recebendo aplicação de MVIIC por via intratecal com auxílio da seringa de Hamilton de 10 μ L e agulha de 30G.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores hematócrito, hemácias, hemoglobina e leucócitos de ratos Wistar submetidos ao TMA e tratados com MVIIC nas doses de 20 pmol e 40 pmol 30 minutos e 2 horas após lesão.....	35
GRÁFICO 2 – Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores séricos de uréia, creatinina, AST, ALT e FA de ratos Wistar submetidos ao TMA e tratados com MVIIC nas doses de 20 pmol e 40 pmol 30 minutos e 2 horas após lesão.....	37
GRÁFICO 3 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de Albumina, Globulina e Proteína Total de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com MVIIC nas doses de 20 pmol e 40 pmol 30 minutos e 2 horas após lesão.....	38
GRÁFICO 4 - Gráfico da avaliação da capacidade motora mostrando as medianas dos escores diários de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω -conotoxina MVIIC.....	39
GRÁFICO 5 - Representação gráfica de médias e desvio-padrão dos níveis de MDA dos grupos submetidos à laminectomia ao trauma medular espinhal, e tratados com conotoxina MVIIC. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais estudados.....	40
GRÁFICO 6 - Representação gráfica de médias e desvio-padrão dos níveis de RLO dos grupos submetidos à laminectomia ao trauma medular espinhal, e tratados com conotoxina MVIIC.....	41
GRÁFICO 7 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica do fator antiapoptótico Bcl-xl em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC.....	42
GRÁFICO 8 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica do fator proapoptótico caspase-8 em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC.....	42

GRÁFICO 9 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change (2- $\Delta\Delta$ CT) referentes à expressão gênica do fator proapoptótico Bax em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC.....	42
GRÁFICO 10 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change (2- $\Delta\Delta$ CT) referentes à expressão gênica do fator proapoptótico caspase -3 em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC.....	44
GRÁFICO 11 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change (2- $\Delta\Delta$ CT) referentes à expressão gênica do fator proapoptótico caspase -9 em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC.....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Genes e seqüências de nucleotídeos dos primers iniciadores para qRT-PCR em tempo real.....	33
--	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Representação esquemática da distribuição dos grupos com respectivos tratamentos.....	25
QUADRO 2 - Escala de avaliação avaliação de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) com descrição dos escores para avaliação locomotora em campo aberto	29

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.....	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - Micrograma
 µL – Microlitro
 ADP – Difosfato de adenosina
 AMP – Monofosfato de adenosina
 ALT – Alanina aminotransferase
 ANOVA - Análise de variância
 APAF- 1 – Protease ativadora da apoptose- 1
 AST – Aspartato aminotransferase
 ATP – Trifosfato de adenosina
 BBB - Basso, Beattie e Bresnaham
 Ca²⁺ - Cálcio
 CCVD - Canais para cálcio voltagem dependentes
 cDNA- DNA complementar

CEPA - Centro Experimental de Pequenos Animais
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
Cm - Centímetro
CTL (-) Grupo experimental submetido a laminectomia apenas
CTL (+) Grupo experimental submetido a laminectomia e recebeu placebo
CT- *Threshold*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EFC - Embolia fibrocartilaginos
EV - Escola de veterinária
FA – Fosfatase alcalina
FC - *Fold change*
FIA – Fator indutor de apoptose
g - Grama
HDIV - Hérnia de disco intervertebral
IEP - Instituto de Ensino e pesquisa Santa casa BH
IL-1 - Interleucina 1
IL-6 - Interleucina 6
IM – Intramuscular
IP3R - Inositol trifosfato
IT - Intratecal
PL - Peroxidação Lipídica
Mg - Miligrama
Mm - Milímetro
MASCIS – Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
MDA – Malondialdeído
MVIIC - ω -conotoxina MVIIC
MP - Membro pélvico
NMDA – N-Metil-D-aspartato
NOX - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
PMN - Polimorfonucleares
RE – Retículo endoplasmático
RyR - Receptor rianodina
RT PCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RLO - Radicais livres de oxigênio
RNA - Ácido ribonucléico
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD - Superóxido dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TMA - Trauma medular agudo
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TOX 20 pMOL Grupo experimental que recebeu dose de 20 pmol da conotoxina MVIIC
TOX 40 pMOL Grupo experimental que recebeu 40 pmol da conotoxina MVIIC
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

O influxo de cálcio é um mecanismo importante de lesão secundária do trauma medular agudo (TMA). Pesquisas com bloqueadores de canais para cálcio vêm sendo desenvolvidas com intuito de estabelecerem novas terapias para reduzir lesões secundárias ao trauma medular. Toxinas oriundas de veneno de caramujo marinho se mostram como terapia promissora por inibirem seletivamente os canais para cálcio e impedirem o influxo desse íon, o que reduziria a progressão da lesão. Dentre essas toxinas, a ω -conotoxina MVIIC, do caramujo *Conus magus*, tem sido utilizada por inibir seletivamente canais para cálcio, impedindo a progressão da lesão e atuando de forma benéfica no tratamento do TMA. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da ω -conotoxina MVIIC na medula de ratos submetidos a TMA por meio da análise de fatores de neuroproteção como estresse oxidativo e apoptose celular, efeitos sistêmicos da ω -conotoxina MVIIC, além da função locomotora. Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, adultos, pesando em média 450g, distribuídos aleatoriamente em seis grupos de seis animais: controle positivo (CTL+), controle negativo (CTL -), TOX 20 pMOL 30', TOX 20 pMOL 2h, TOX 40 pMOL 30', TOX 40 pMOL 2h. Todos os animais foram submetidos a laminectomia da vértebra T12 e TMA, sendo que o grupo CTL - não foi submetido ao trauma após laminectomia. As lesões foram produzidas obedecendo ao protocolo internacional MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), com a liberação em queda livre de haste de impacto de peso de 10 g, com altura pré-determinada de 12.5 mm sobre a dura-máter por três segundos. Após 30 minutos e duas horas do trauma inicial, o CTL+ recebeu injeção intratecal de 10 μ L de PBS estéril e os grupos TOX, volume equivalente de solução de toxina MVIIC na concentração preconizada para cada grupo. Foram observadas recuperação locomotora, redução da expressão gênica de fatores proapoptóticos e aumento da expressão gênica de fator anti apoptótico, além de redução de estresse oxidativo em ratos tratados com MVIIC pós TMA, o que sugere efeito neuroprotetor dessa toxina na medula espinhal.

Palavras chave : Trauma medular agudo, MVIIC, conotoxina, qRT-PCR, Mascis impactor, apoptose, peroxidação lipídica, estresse oxidativo

ABSTRACT

Calcium influx is an important mechanism of secondary injury to acute medullary trauma (TMA). Studies with calcium channel blockers have been developed in order to establish new therapies to reduce lesions secondary to spinal cord trauma. Toxins derived from marine snail venom are shown as promising therapy by selectively inhibiting the calcium channels and preventing the influx of this ion, which would reduce the progression of the lesion. Thus, ω -conotoxin MVIIC has been used by selectively inhibiting calcium channels, preventing the progression of the lesion and may have a beneficial effect for the treatment of acute medullary trauma. The objective of this study was to evaluate neuroprotection factors such as lipid peroxidation, oxidative stress and cellular apoptosis, systemic effects of ω -conotoxin MVIIC, as well as the locomotor function of rats submitted to TMA and treated with MVIIC conotoxin. **METHODS:** 36 male Wistar rats weighing 450g were randomly assigned to six groups of six animals: positive control (CTL +), negative control (CTL -), TOX 20 pMOL 30', TOX 20 pMOL 2h, TOX 40 pMOL 30', TOX 40 pMOL 2h. All the animals underwent laminectomy of the T12 vertebra and TMA, except for the CTL group - who did not suffer the trauma. The lesions were produced according to the international protocol MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), with the release in free drop of 10 g weight impact, with a predetermined height of 12.5 mm on the dura mater for 3 seconds. After 30 minutes and 2 hours of initial trauma, CTL + received intrathecal injection of 10 μ L of sterile PBS and TOX groups, equivalent volume of MVIIC toxin solution at the recommended concentration for each group. It was observed that locomotor recovery and neuroprotection mediated by reduction of the gene expression of pro-apoptotic factors and increased gene expression of anti-apoptotic factor by means of the qRT-PCR technique in addition to reduction of oxidative stress in rats treated with MVIIC after acute medullary injury.

Keywords: Acute medullary trauma, spinal cord, MVIIC, conotoxin, qRT-PCR, Mascis impactor, apoptosis, lipid peroxidation, oxidative stress

1 INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinhal tornou-se uma epidemia na sociedade moderna. Apesar dos avanços feitos na compreensão da patogênese e das melhorias no reconhecimento precoce e no tratamento, continua sendo um evento devastador, que muitas vezes produz incapacidade motora grave e permanente (Sekhon et al., 2001; Hansebout et al., 2016).

Os gastos financeiros com pacientes humanos com lesão medular foram estimados em mais de US\$ 4 bilhões anualmente (Stripling, 1990). Apesar desse enorme impacto econômico, deve se reconhecer a perda incalculável da qualidade de vida observada nesses pacientes, que muitas vezes são jovens, saudáveis e com perspectiva de muitos anos produtivos em suas vidas (McDonald et al, 2002, Kwon et al., 2004).

A lesão da medula espinhal ocorre em todo o mundo com uma incidência anual de 15 a 40 casos por milhão de habitantes. Suas causas variam desde acidentes com veículos motorizados e violência comunitária até atividades recreativas e lesões relacionadas ao local de trabalho (Sekhon et al., 2001), registrando mais de 130.000 novos casos de trauma medular a cada ano na medicina humana (Thuret et al., 2006). Na medicina veterinária, os dados não estão bem descritos, pacientes com sinais graves são mais propensos a serem encaminhados a serviços especializados ao invés de serem gerenciados na prática de primeiro atendimento, o que pode superestimar esses dados, ao passo que pacientes com prognóstico desfavorável, muitas vezes são eutanasiados precocemente, subestimando essas informações (Granger et al., 2014).

Nos cães, as causas mais comuns de lesão medular são hérnias de disco intervertebral (HDIV), embolia fibrocartilaginosa (EFC) e traumas (Olby, 2010). A HDIV é a principal causa de lesão medular, com 34% dos casos, seguido de acidentes com veículos motorizados com 7% (Fluehmann, 2006; Jeffery, 2010; Jeffery, 2013; Granger et al., 2014).

O mecanismo primário que envolve a lesão medular está relacionado com a deformação local devido a transferência da energia mecânica à medula, enquanto o mecanismo secundário abrange uma cascata de eventos bioquímicos e processos celulares iniciados pelo trauma inicial primário e pode causar danos celulares até a morte celular (Sekhon et al., 2001).

A lesão primária geralmente ocorre com deslocamento de vértebras, fraturas e lesões agudas de discos intervertebrais. Além disso, lesão da medula espinhal por fragmentos ósseos ou projéteis de arma de fogo podem produzir laceração, contusão, compressão ou concussão da medula espinhal (Sekhon et al., 2001, Granger et al., 2014), o que pode resultar em ruptura de vasos sanguíneos, corpos neuronais, axônios e demais células neurais, interrompendo a passagem dos impulsos nervosos (Delamanter et al., 1995; Kraus, 1996; Hulsebosch, 2002).

Esse mecanismo inicia uma cascata de eventos neurodegenerativos secundários ao trauma inicial, incluindo alterações vasculares, isquemia, choque neurogênico, hemorragia, edema, distúrbios em processos celulares ATP dependentes e distúrbios iônicos, como aumento da concentração intracelular de cálcio, sódio e extracelular de potássio (Sekhon et al., 2001, Granger et al, 2014).

A reperfusão do tecido medular, posterior a fase isquêmica, pode agravar as lesões produzidas por esse processo, principalmente devido à produção exacerbada de RLO, apesar de o retorno

de aporte sanguíneo a um órgão ser essencial para favorecer a reversão da lesão (Rowland et al., 2008).

Dessa forma, o dano tecidual progressivo adjacente ao epicentro da lesão, acompanhado pela produção de radicais livres e opióides endógenos, assim como o acúmulo de neurotransmissores, intensificam a reação inflamatória e ativam os mecanismos de apoptose celular (Hall e Springer, 2004; Arias et al., 2007; Severo et al., 2007).

A medula espinhal possui canais para cálcio voltagem dependente (CCVD) dos tipos N, P e Q, localizados nas lâminas dorsais da substância cinzenta (Diaz e Dickenson, 1997). Eles são essenciais para a regulação da liberação de neurotransmissores em uma grande variedade de neurônios e transduzem a atividade elétrica em outras funções celulares e regulam a homeostase do cálcio (Liu, 1996; Adams et al, 2013).

O nível de Ca^{2+} intracelular controla muitos processos celulares, incluindo a liberação do glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), além da atividade de canais iônicos e enzimas (Olivera, 1994). Por isso, agentes bloqueadores de canais para cálcio se apresentam com grande potencial na redução de lesões cerebrais e medulares, impedindo o influxo exacerbado de cálcio para o espaço intracelular, e assim, prevenindo a progressão dos eventos secundários ao trauma inicial (Choi, 1992; Lanz et al, 2000).

As toxinas de caramujos marinhos do gênero *Conus* têm sido estudadas por sua alta afinidade e seletividade para tipos específicos de canais de cálcio e representam poderosas ferramentas farmacológicas para bloquear a liberação de neurotransmissores (Adams et al, 2013; Dolphin, 2013). A toxina *Conus* é composta por pequenos peptídeos, denominados conopeptídeos, variando o tamanho de oito a 31 aminoácidos, enriquecida com pontes de dissulfeto (Shen et al., 2000).

As ômega-conotoxinas são um subconjunto dessas toxinas que inibem CCVD, enquanto a alfa- e a psi-conotoxinas bloqueiam receptores nicotínicos levando ao bloqueio neuromuscular, e a mu- e delta-conotoxinas são seletivas para canais de potássio voltagem dependentes, os quais aumentam a excitabilidade neuronal (Olivera et al., 1994; Oliveira, 2014).

Como a MVIIC inibe múltiplos CCVD, se torna possível o estudo desses peptídeos para a neuroproteção e manejo da dor, configurando-se como um promissor agente de proteção neuronal e possuindo melhor perspectiva que as conotoxinas bloqueadoras de canais específicos (McDonough et al, 1996; Maroto et al., 1996).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes doses da ω -conotoxina MVIIC administrada em diferentes tempos, no tratamento de ratos submetidos a lesão medular, por meio da avaliação da toxicidade, recuperação da função motora, mensuração do estresse oxidativo e da expressão gênica de fatores relacionados a apoptose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FISIOPATOGENIA DO TRAUMA MEDULAR AGUDO

Os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares que compõem a fisiopatogenia do trauma medular agudo (TMA) não estão completamente elucidados (Çolak et al., 2009). Portanto, é primordial conhecer esses mecanismos intracelulares decorrentes do trauma e a compreensão sobre o modo de ação dos medicamentos, para posteriormente avaliar o seu uso (Lee et al., 2008).

2.1.1. EVENTOS PRIMÁRIOS

Lesões primárias associadas ao TMA ocorrem com a transferência da energia mecânica e envolvem a interrupção física de estruturas da medula espinhal, vértebras e estruturas de apoio que ocorre no momento do impacto. As principais forças mecânicas envolvidas em traumas neurológicos incluem concussão, compressão, cisalhamento, laceração, tração e contusão (Kwon et al, 2004; Hansebout et al, 2016). Essas forças conferem o principal insulto à medula espinhal, que em sua forma mais suave causa uma concussão medular com déficits neurológicos transitórios discretos (Zwimpfer et al, 1990) e na sua forma mais grave, incapacidade locomotora permanente (Lee, 2015).

O trauma mecânico inicial acarreta ruptura das membranas celulares, lesão direta dos elementos neurais e vasos sanguíneos, causando hemorragia e consequente isquemia, lesões ganglionares e gliais disseminadas, axônios interrompidos e membranas celulares neurais lesionadas, além de edema compressivo na medula espinhal (Olby, 2010; Winter e Pattani, 2011). A compressão afeta a perfusão da medula espinhal através da limitação arterial, fornecimento de energia e oclusão de drenagem venosa, causando danos diretos à mielina e aos axônios (Shi, 1996). No caso de fraturas da coluna vertebral, a lesão primária pode causar completa transecção física da medula espinhal, com resultados muito graves, mas a transecção medular é um evento raro (Smith, 2006; Olby, 2010).

2.1.2. EVENTOS SECUNDÁRIOS

A despolarização desordenada iniciada por processos como isquemia e secreção de substâncias tóxicas por neurônios lesados iniciam uma cascata de eventos bioquímicos e celulares que dão origem a injúria secundária. Além disso, múltiplos fatores sistêmicos podem potencializar a lesão secundária, as mais importantes são hipóxia e hipotensão, e em segundo plano hipercapnia, hipocapnia, hiperglicemia, hipoglicemia, distúrbios ácido-base, anormalidades eletrolíticas, hipertermia e inflamação sistêmica (Mortazavi et al., 2015; Stein et al., 2016).

2.1.2.1. ISQUEMIA E DESEQUILÍBRIO DA HOMEOSTASE

Existe uma relação estreita entre a perfusão da medula espinhal lesionada e as consequências deletérias pós-injúria inicial, destacando a importância central de manter o fluxo sanguíneo para a região do trauma. Danos primários causam hemorragia e isquemia, petéquias continuam sendo formadas durante as primeiras 24 horas após a lesão, frequentemente resultando em grandes áreas de hemorragia (Olby, 2010).

A isquemia determina a falha da auto regulação do fluxo sanguíneo e liberação adicional de toxinas de células neurais e, devido a hipóxia e hipoglicemia, instala-se então o metabolismo anaeróbico, com acidose láctica concomitante. A diminuição da disponibilidade de adenosina-trifosfato (ATP), em função da redução do aporte energético, gera perda da regulação de processos ATP dependentes, como a bomba de sódio e potássio, responsável pela preservação da homeostase celular (Chacón et al, Corona et al, 2005).

A homeostase iônica é perdida imediatamente após o TMA. Falha das bombas ATP-dependentes transmembranares causam perda de regulação das concentrações extracelulares de sódio, glutamato e outras moléculas. Posteriormente, a membrana mitocondrial sofre ruptura e vários receptores se tornam ativados, resultando em mudanças na regulação de genes e produção de radicais livres (Fleming et al, 2006; Mataliotakis, 2016).

Os altos requisitos metabólicos dos neurônios tornam a substância cinzenta extremamente sensível à lesão por isquemia, podendo ser agravada pela perda dos mecanismos de autorregulação. Além disso, durante o processo de reperfusão, ocorre um aumento significativo de radicais livres de oxigênio (RLO) que podem realmente agravar ainda mais a lesão secundária (Basu et al, 2001; Kwon et al, 2001).

2.1.2.2. RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA

A medula espinhal não é exposta à inflamação, como outros tecidos, que frequentemente sofrem processo de cicatrização. As células endoteliais normalmente formam uma barreira que exclui componentes sanguíneos do SNC. Dessa forma, macrófagos, linfócitos e poli-morfonucleares (PMN) são raramente observados na medula espinhal normal e as células do SNC são raramente expostas a citocinas inflamatórias (Fleming et al, 2006; Mortazavi et al., 2015).

Após o trauma mecânico na medula espinhal, inicia-se infiltração de células inflamatórias e ativação da microglia. Essas células, em associação com astrócitos reativos, respondem à lesão no local do trauma, liberam grande número de citocinas pró-inflamatórias e neurotoxinas acarretando morte celular e degeneração tecidual. Esses efeitos secundários estimulam a formação de mais cicatrizes gliais, que consistem principalmente em astrócitos reativos e proteoglicanos e criam uma barreira física e química para qualquer regeneração axonal (Beattie, 2004; Goldshmit, 2015).

A lesão do endotélio celular é o principal evento que inicia a cascata de inflamação após o trauma inicial. Lacunas endoteliais promovem influxo de fluidos e proteínas, produzindo edema. Eventos subsequentes promovem ativação microglial e infiltração de leucócitos e as lâminas basais são degradadas. Dessa forma, esses eventos agravam ainda mais a perda da integridade endotelial, aumento da permeabilidade vascular e influxo de leucócitos (Fleming et al, 2006).

As citocinas mais descritas no TMA incluem IL-1, IL-6, TNF- α e TGF-1. Expressão precoce de TNF- α e IL-1 pela microglia aumenta o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão (Fleming et al, 2006; Mortazavi et al., 2015).

2.1.2.3. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E EXCITOTOXICIDADE

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos e está presente na substância cinzenta. Uma vez liberado, se liga a receptores metabotrópicos mediados por

proteína G e ionotrópicos associados a canal iônico, o N-metil-d-aspartato (NMDA), 2-amino-3- (3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-il) propionato (AMPA), além do receptor kainato. A ativação dos receptores ionotrópicos leva a aumento na permeabilidade aos íons de sódio, potássio e cálcio e a ativação dos receptores metabotrópicos libera cálcio dos compartimentos internos (Arundine, et al, 2003).

Excitotoxicidade está relacionada com a exposição excessiva ou prolongada ao glutamato pós-TMA, com consequente influxo exacerbado de cálcio para o citoplasma celular, que resultam em morte neuronal por necrose ou apoptose (Doble, 1999). Os íons cálcio são importantes mensageiros intracelulares, responsáveis por funções celulares distintas, possuem mecanismos homeostáticos especializados e controlam níveis de cálcio intracelular por meio de uma interação complexa entre influxo e efluxo de Ca^{2+} , além de seu armazenamento em compartimentos internos (Choi, 1988).

No entanto, influxo excessivo de Ca^{2+} ou liberação intracelular pelos compartimentos internos podem elevar suas concentrações a níveis que excedem a capacidade dos mecanismos regulatórios, o que determina a ativação inapropriada de processos cálcio dependentes que normalmente operam em níveis baixos, causando distúrbios metabólicos e eventual morte celular (Tymianski et al., 1996; Sattler et al., 2000).

Elevações excessivas de cálcio intracelular podem ativar proteases, lipases, fosfatases e endonucleases que danificam diretamente a estrutura celular ou induzem a formação de radicais livres oxidativos que medeiam a morte celular. O aumento de cálcio intracelular também estimula a produção de metabólitos do ácido araquidônico (Dumuis et al., 1988). Finalmente, a elevação do cálcio intracelular pode resultar na ativação não específica de muitas enzimas e proteólise, o que pode causar descontrole das vias de sinalização e diminuição da integridade dos elementos do citoesqueleto e apoptose celular (Nicotera et al,1998). FIGURA 1.

Embora seja improvável que a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular seja o único mecanismo responsável pela morte neuronal, várias evidências mostram uma estreita relação entre seu influxo excessivo e a lesão do tecido nervoso (Sattler et al 2000; Arundine, et al, 2003).

Esse influxo exagerado de cálcio leva à produção excessiva de óxido nítrico e outros RLO que causam peroxidação lipídica (Bredt et al, 1989; Coyle et al, 1993; Beal, 1995). Grandes aumentos no cálcio intracelular podem também causar disfunção mitocondrial, resultando em formação local de radicais livres nas mitocôndrias (Gunter et al., 1994; Dugan et al., 1995).

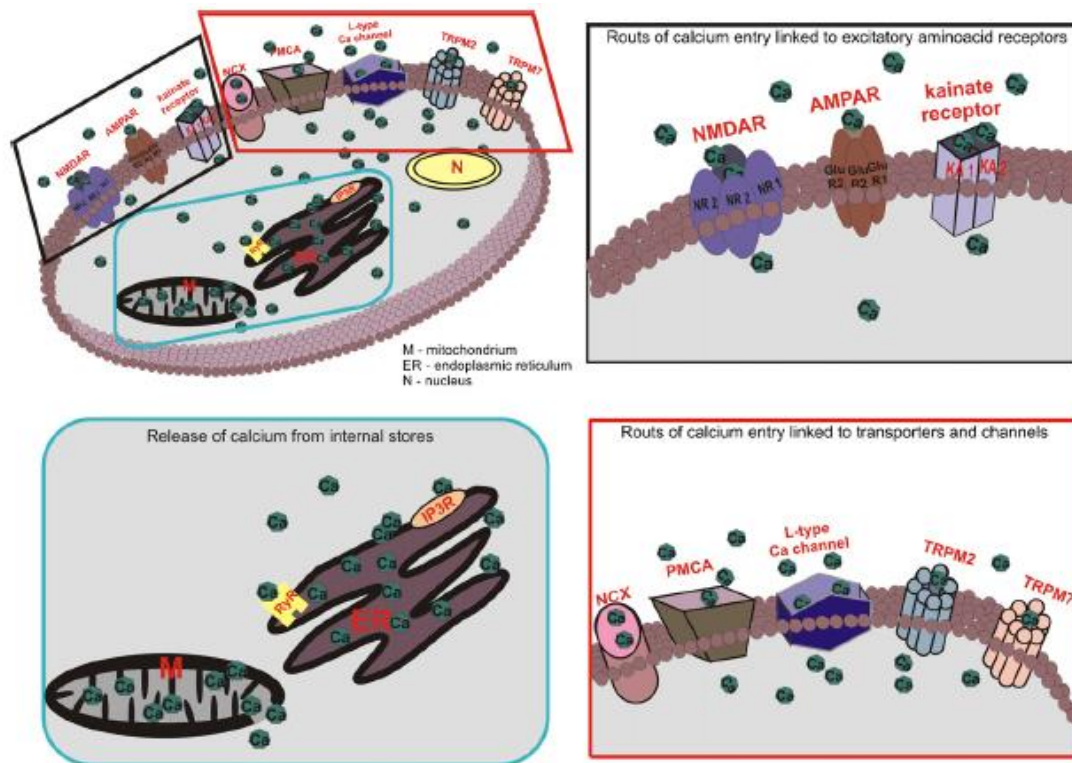


FIGURA 1 - Rotas de entrada de cálcio nos neurônios após lesão medular. Existem várias vias de entrada de cálcio nos neurônios após lesão. O cálcio pode entrar nos neurônios através receptores: receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores de 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metilisox-azol-4-il) propionato (AMPA) e receptor de cainato (KA). No entanto, concentrações elevadas de cálcio também podem surgir de um armazenamento interno, especialmente no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias. Estes podem liberar cálcio no citoplasma após a degradação da membrana ou por mau funcionamento de seus próprios canais de íons de membrana, incluindo a rianodina (RyR) ou receptor de inositol trifosfato (IP3R).

FONTE: Szydlovskaa et al., 2010.

2.1.2.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Excitotoxicidade induzida por glutamato envolve a formação de espécies reativas de oxigênio (RLO) nas mitocôndrias quando o metabolismo energético é comprometido após lesão isquêmica e traumática no sistema nervoso central (SNC). A produção excessiva de RLO gera estresse oxidativo, por meio da produção de metabólitos de oxigênio, o que leva a aumento na concentração de Ca^{2+} e resulta em lesão celular, apoptose ou necrose (Szydlovskaa et al., 2010). Em condições fisiológicas, essas espécies reativas são inativadas por agentes eliminadores de RLO, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona (GSH). A ativação compensatória de SOD e GSH ocorre mais tardiamente que a produção de RLO pós-traumática (Azbill et al., 1997).

Dessa forma, o TMA desencadeia a produção de RLO, que possuem importantes efeitos fisiopatológicos tanto na injúria medular aguda quanto na injúria crônica (Bains e Hall, 2012; Bastani et al., 2012; Ordonez et al., 2013). A formação de RLO supera as defesas antioxidantes e causa dano oxidativo (Hall, 2011; Qin et al; 2013).

O TMA também induz a produção de RLO em macrófagos ativados e microglia (Fleming et al., 2006) e essa produção é facilitada através da regulação positiva da NOX2, um dos sete membros da família de enzimas NOX (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase). (Brandes et al., 2014).

Dependendo do seu fenótipo e status de ativação, os macrófagos podem iniciar mecanismos de lesões secundários e ou promover regeneração e reparo em TMA. Os macrófagos "M1" pró-inflamatórios são neurotóxicos, liberam proteases e moléculas pró-inflamatórias, e causam retração do axônio. Enquanto os macrófagos "M2" anti-inflamatórios não são neurotóxicos, liberam citocinas anti-inflamatórias e promovem regeneração axonal (Horn et al., 2008; Kigerl et al., 2009; Kroner et al., 2014).

O estresse oxidativo geralmente é definido como um desequilíbrio que favorece a produção de RLO sobre as defesas antioxidantes. A redução de um elétron de oxigênio molecular produz um produto intermediário estável, o ânion superóxido (O_2^-), que serve como precursor da maioria dos RLO (Zhang et al., 2015a). A dismutação de ânions superóxido por superóxido dismutases resulta em Produção de H_2O_2 . Interação subsequente de H_2O_2 e O_2^- em uma reação de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2^- \rightarrow OH^- + O_2 + OH$) ou uma clivagem com Fe^{2+} (ou Cu^{2+}) ou a participação de H_2O_2 em uma reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + Fe^{3+} + OH$), pode gerar o radical hidroxila (OH) altamente reativo. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial contém vários centros redox que podem doar elétrons ao oxigênio molecular, servindo como a principal fonte de produção de superóxido na maioria dos tecidos (Andreyev et al, 2005). A liberação de Fe^{2+} e H_2O_2 , ingredientes das reações de Haber-Weiss e Fenton, também pode resultar em geração do poderoso radical hidroxílico, que pode oxidar proteínas mitocondriais, DNA e lipídios, ampliando assim O_2^- e o dano oxidativo iniciado (Chen et al., 2005; Martin et al., 2007) FIGURA 2.

Apesar da presença de vários antioxidantes como ubiquinona, vitamina E e enzimas antioxidantes, a mitocôndria parece ser a fonte intracelular mais poderosa de RLO. A concentração de O_2^- no estado estacionário na matriz mitocondrial é cerca de cinco a 10 vezes maior do que no citosol ou no núcleo (Cadenas et al., 2000), portanto, a mitocôndria também pode ser um alvo primário para os efeitos deletérios de RLO. A interação de diversas macromoléculas com RLO pode prejudicar a função dessas organelas e pode influenciar diretamente a viabilidade da célula e estimular o início da cascata de apoptose celular (Martin et al., 2007).

Além disso, os RLO iniciam e perpetuam os danos nos tecidos, contribuindo com a insuficiência metabólica, degradação de macromoléculas e oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A produção descontrolada de RLO pode também contribuir para outros processos de lesões secundárias, incluindo excitotoxicidade, inflamação e disfunção mitocondrial, o que leva a danos celulares irreversíveis e morte celular (Bains e Hall, 2012).

Além da ativação potencial de cascatas de morte celular dependentes de caspases mitocondriais e caspase independentes, a disfunção mitocondrial é responsável pela interrupção da função

sináptica, pois as mitocôndrias sinápticas são mais suscetíveis do que as mitocôndrias não sinápticas. A interrupção da função mitocondrial é precedida por aumento de RLO e danos oxidativos mediados por lipoperoxidação, o que pode potencializar a disfunção neuronal e morte celular (Azbill et al, 1997; Sullivan et al., 2005)

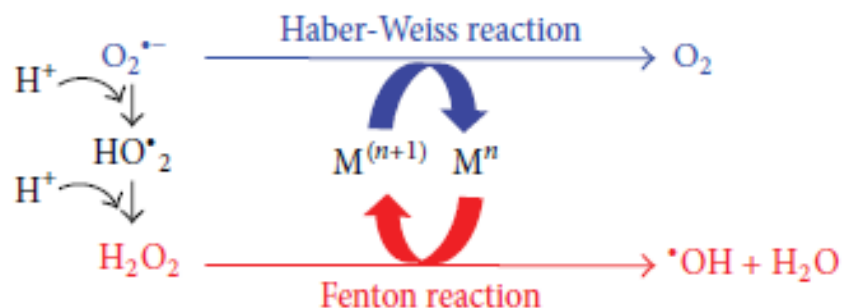


FIGURA 2 : Reação de Fenton e Haber-Weiss: Forma reduzida de Metais de transição (MT) reagem por meio da reação de Fenton com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), levando à geração de $\bullet OH$. Superóxido radical ($O_2^{\bullet -}$) também podem reagir com a forma oxidada de metais de transição na reação de Heaber-Weiss que novamente afeta o ciclo redox.

Fonte: Ayala et al., 2014.

2.1.2.5. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lipídeos são classicamente divididos em dois grupos: Apolares e Polares. Triglicerídeos (apolares), armazenados em várias células, em especial no tecido adiposo, geralmente são a principal forma de armazenamento de energia em mamíferos (Frühbeck et al., 2001; Frayn, 1998). Os lípidos polares são estruturais e componentes das membranas celulares, onde participam da formação da barreira de permeabilidade de células e organelas celulares na forma de uma bicamada lipídica. O principal tipo de lipídeo que define a bicamada em quase todas as membranas é baseado em fosfolípido de glicerol (Vance et al, 2002). A importância do estado físico da membrana lipídica é evidenciada pelo fato de que os lipídeos podem controlar o estado fisiológico da membrana de uma organela modificando seus aspectos biofísicos, como a polaridade e permeabilidade (Massey et al, 2011; Massey et al, 2013).

A principal forma de dano oxidativo induzido por RLO envolve o ataque oxidativo a ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular desencadeando o processo de PL que possui três fases químicas distintas: iniciação, propagação e término. O início da PL é desencadeado quando um radical de oxigênio altamente reativo ($\bullet OH$, $\bullet NO_2$, $\bullet CO_3$) reage com ácidos gordurosos poli insaturados de membrana, como ácido araquidônico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico ou ácido docosa-hexaenoico resultando em rupturas de células e da

integridade da membrana (Vaishnav et al., 2010; hall et al., 2015). Uma das consequências do desequilíbrio entre os níveis pró oxidante e antioxidante é a lesão de células, tecidos e órgãos causada por processos oxidativos. Reconheceu-se há muito tempo que altos níveis RLO podem causar danos diretos aos lipídeos (Moldovan e Moldovan, 2004).

As principais fontes de produção endógena de RLO são a mitocôndria, a membrana plasmática, o retículo endoplasmático e os peroxissomos, por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo reações enzimáticas e ou auto-oxidação de vários compostos, tais como catecolaminas e hidroquinona. As duas RLO mais prevalentes que podem afetar os lipídeos são radical hidroxila ($\text{HO} \cdot$) e hidroperóxil ($\text{HO} \cdot 2$) (Bielski et al., 1983; Browne e Armstrong, 2000).

Em resposta à PL da membrana, as células podem sobreviver ou induzir sua morte. Sob PL fisiológica, as células estimulam sua manutenção e sobrevivência através da defesa de sistemas antioxidantes constitutivos ou ativação de vias de sinalização que auto regulam proteínas antioxidantes resultando em uma resposta de estresse adaptativa. Em contraste, sob taxas de PL média ou alta, a extensão do dano oxidativo supera a capacidade de reparo e as células sofrem necrose ou apoptose (Volinsky e Kinnunen, 2012; Kinnunen e Mahalka 2013).

Os principais produtos primários de PL são os hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Entre os muitos aldeídos diferentes que podem ser formados como produtos secundários durante a PL, o malondialdeído (MDA), propanal, hexanal e 4-hidroxinonal (4- HNE) são os mais estudados (Esterbauer et al., 1982; Esterbauer et al., 1991).

O MDA pode ser o produto mais mutagênico da PL, enquanto o 4-HNE é o mais tóxico. O MDA tem sido amplamente utilizado como um biomarcador para PL de omega-3, omega-6 e ácidos graxos devido à facilidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Schauenstein, 1967; Pryor, 1989; Esterbauer et al., 1991). MDA é um produto final gerado pela decomposição de ácido araquidônico e PUFA, através de processos enzimáticos ou não enzimáticos, mais estável quimicamente e permeável à membrana do que RLO e menos tóxico do que 4-HNE e metilglioxal (Esterbauer et al, 1990; Ayala et al 2014).

2.1.2.6. NECROSE E APOPTOSE CELULAR

Embora necrose e apoptose sejam descrições morfológicas de morte celular, elas ocorrem mecanicamente por meio de vias distintas (Nicholson et al, 1997). Ambas são iniciadas por muitos dos mesmos insultos, como isquemia, estresse oxidativo, excitotoxicidade, RLO, citocinas e processos inflamatórios (Beattie et al.,2000; Lu et al., 2000)

Morte celular por necrose ocorre de forma passiva, sem controle celular, após a ruptura mecânica das células a partir de uma lesão celular grave durante o trauma inicial, o que torna a membrana celular frágil com subsequente tumefação e lise (Lou et al.,1998).

Em contraste, a morte celular por apoptose é considerada uma morte celular fisiológica ou programada, uma resposta ativamente regulada por células induzidas por um estímulo específico (Nicholson et al, 1997). Células adjacentes ao epicentro das lesões, poupadas do trauma inicial podem sofrer um estímulo bioquímico secundário suficiente para iniciar um programa apoptótico de autodestruição efetuado pela subsequente ativação de caspases (Emery et al, 1998; Springer et al, 1999). Essa ativação ocorre por meio de um processo bioquímico

que envolve as vias intrínseca (mitocôndria-dependente), extrínseca (mediada por receptores transmembranais) e caspases independente (Kawaguchi et al., 2005).

Há também uma comunicação entre essas duas vias 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 do fator indutor da apoptose (FIA) pela mitocôndria que determina a ativação da apoptose (Zheng et al., 2003).

A apoptose é essencial para a manutenção da homeostase celular e em certas condições patológicas do organismo (Elmore, 2007). A regulação da apoptose, fisiológica ou patológica, no SNC, é caracterizada pelo equilíbrio entre proteínas anti (Bcl-xl) e pró-apoptóticas (Bax, Caspase-8, Caspase-9) que ativam as caspases efetoras (caspase-3) pelas vias intrínsecas e extrínsecas (Yuan e Yankner, 2000).

O que caracteriza a via intrínseca da apoptose é o desequilíbrio dos fatores apoptóticos (Bax) e antiapoptóticos (Bcl-2) e liberação de citocromo C da mitocôndria quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores pró. O citocromo C forma um complexo chamado apoptossoma, juntamente com apaf-1 e pro caspase-9. O apoptossoma ativa a caspase-9, através de reação que requer hidrólise do ATP, que por sua vez ativa caspases efetoras, principalmente caspase-3 (Green, 1998; Kawaguchi et al., 2005; Portt et al., 2011).

A via extrínseca independe do apoptossoma para se desenvolver. pode ser iniciada com a ativação de receptores transmembranais, como o FasL e TNF- α , que resulta na clivagem e ativação da procaspase-8 em caspase-8 que por sua vez as quais ativam a caspase-3. A via comum ocorre por meio da liberação do fator pró-apoptótico Bid, iniciada pela caspase-8, que sinaliza a liberação de citocromo c pela mitocôndria e ativa a via intrínseca (Boldin et al., 1996; Matsushita et al., 2000; Wu et al., 2014).

A caspase-3 é considerada a proteína efetora mais importante para a apoptose, sendo um importante biomarcador para esse evento, além disso, a avaliação da caspase-8, caspase 9, Bax e Bcl-xl, permite verificar qual das duas vias, intrínseca ou extrínseca, é ativada (Elmore, 2007).

Acreditava-se que a injúria secundária estava relacionada apenas à morte celular por necrose, mas sabe-se que uma série de eventos celulares e moleculares pode induzir a morte celular ativa, minutos a dias após a lesão inicial por mecanismos apoptóticos (Beattie et al., 2000).

O conhecimento da cascata da apoptose, que ocorre posteriormente à lesão aguda da medula espinhal, pode revelar-se um importante meio de melhorar a sobrevivência das células neuronais, ao passo que a morte celular por necrose é de difícil intervenção pela impossibilidade de reversão dos efeitos da lesão traumática inicial (Lou et al., 1998).

2.2 BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

Os Canais de Cálcio Voltagem Dependentes (CCVD) possuem diversas propriedades fisiológicas e farmacológicas, além de uma nomenclatura para as distintas classes de canais de Ca²⁺ (Tsien et al., 1988). Os CCVD tipo N, P/Q e R exigem uma forte despolarização para serem ativados (Tsien et al., 1991) e são bloqueados por determinadas toxinas polipeptídicas de caramujos e aranhas específicas (Miljanich e Ramachandran, 1995). Os CCVD N e P/Q são encontrados principalmente nos neurônios (Catterall, 2000; Dunlap et al., 1995; Olivera et al., 1994).

A ativação do CCVD é uma das vias mais importantes do influxo de cálcio intracelular e é fundamental na regulação de processos celulares e de excitabilidade. Eventos que caracterizam as lesões secundárias têm início minutos após o trauma mecânico inicial e pode durar dias ou semanas pós-trauma. Esses eventos resultam da liberação excessiva e da recaptação inadequada do glutamato, levando a uma transmissão sináptica excitatória prolongada com influxo excessivo de Na^+ e Ca^{2+} por ativação de receptores ionotrópicos, metabotrópicos e CCVD durante a despolarização da membrana (Oliveira, 2014).

2.2.1 ω - CONOTOXINA MVIIC

As ω -conotoxinas, por sua especificidade em canais de cálcio, atualmente são alvos para terapias direcionadas contra dores crônicas, danos isquêmicos cerebrais, algumas formas de epilepsia e ataxia. Com o bloqueio desses canais, previne-se a liberação excessiva de neurotransmissores, atuando como protetores da hiperexcitabilidade e supressores da atividade epileptiforme (Rajendra et al., 2004). Atualmente, conhece-se cerca de 10 superfamílias de conotoxinas, sendo que cada uma possui alta seletividade para um alvo molecular específico como canais iônicos ou receptores (Olivera e Cruz, 2001).

A ω -conotoxina MVIIC, identificada a partir do DNA da glândula venenosa do caramujo *Conus magus* (Hillyard et al., 1992) bloqueia CCVD por meio da membrana de corpos celulares neuronais mediados por esses canais (Hillyard et al., 1992; Wheeler et al., 1994). A MVIIC promove a inibição seletiva dos diferentes tipos de canais para cálcio N, P/Q, bloqueando a liberação de neurotransmissores de alguns terminais nervosos pré-sinápticos relacionados ao desenvolvimento da lesão medular secundária (Olivera et al., 1994; Uchitel, 1997; Minami et al., 2001).

Estudos em isquemias cerebrais (Liu et al., 1996; Uchitel, 1997; Pinheiro et al., 2009) e medulares (Wright et al., 1999; Imaizumi et al., 1999) *in vitro* demonstraram que a MVIIC reduziu significativamente o influxo do cálcio através dos CCVD do tipo N e P/Q. Além disso, Turner e colaboradores (1995) relatam uma expressiva diminuição na liberação do glutamato.

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

A MVIIC inibe seletivamente CCVD tipo N, P/Q que são essenciais para a liberação de neurotransmissores associados ao desenvolvimento de lesão secundária (Oliveira, 2014). A ômega-conotoxina MVIIC, administrada intralesional, foi avaliada no trauma medular, sendo verificada preservação de corpos neuronais e redução de apoptose no tecido medular (Oliveira, 2012). Também Lozano, (2017) observou discreta recuperação de função motora em ratos tratados com MVIIC via intratecal após indução do TMA.

2.2.2. OBJETIVO GERAL

Avaliação dos efeitos da ômega-conotoxina MVIIC do caramujo *Conus magus* na neuroproteção de ratos Wistar submetidos ao trauma agudo experimental da medula espinhal.

2.2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a recuperação deambulatória e a capacidade motora dos animais após o tratamento, avaliar o efeito anti oxidante e anti apoptótico da ω -conotoxina MVIIC na medula espinhal após o trauma medular agudo, avaliar efeitos sistêmicos da MVIIC através de exames hematológicos e bioquímicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi desenvolvido nas dependências físicas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFMG e no Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (IEP), respeitando os critérios para utilização de animais para pesquisa estabelecidos pelo CEUA – UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais) (Certificado de aprovação 105/2017. Anexo 1).

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, com aproximadamente cinco meses de idade, pesando em média 450 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os animais foram mantidos no Centro Experimental de Pequenos Animais (CEPA) da EV/UFMG, acondicionados em caixas plásticas com três ratos em cada (FIGURA 3) submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Os ratos foram submetidos a um período de 14 dias antes do início da fase experimental, para aclimação ao local e desverminação com tiabendazol (100 mg/kg, VO) . Durante todo o período experimental receberam ração comercial para roedores¹ e água *ad libitum*.



FIGURA 3- Fotografia dos animais acondicionados em caixas plásticas: três ratos em cada caixa, submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) mantidos no Centro Experimental de Pequenos Animais da EV/UFMG.

3.2 OBTENÇÃO DA ω -CONOTOXINA MVIIC

A ω -conotoxina MVIIC² foi fornecida pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Marcus Vinícius Gomez do Laboratório de Neurociência da Faculdade de Medicina da UFMG, com apresentação comercial liofilizada 100 μ g. A toxina foi suspensa em solução de PBS estéril, centrifugada para dissolução completa. A concentração foi ajustada para 40pMol/ μ L, em tubos de plástico siliconizados estéreis, sendo conservada em freezer (-20°C) até o momento da aplicação.

3.3 GRUPOS

Após o fim do período de adaptação, os 36 animais foram divididos, de forma aleatória, em seis grupos experimentais (QUADRO 1):

G1: CTL(-) : Grupo controle negativo (n=6) – os animais foram submetidos à laminectomia no segmento T12 e a medula espinhal foi mantida exposta durante 5 minutos.

G2: CTL(+) : Grupo controle positivo (n=6) - os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguido de trauma medular contusivo por meio do dispositivo de trauma MASCIS Impactor³. Trinta minutos e duas horas após o trauma, os animais receberam 10 μ L de PBS estéril por via intratecal.

G3: Grupo 20 pmol de MVIIC 30 minutos (n=6) - os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo por meio do dispositivo de trauma MASCIS Impactor³. Trinta minutos após o trauma, os animais receberam 20 pmol da ω -conotoxina MVIIC² diluídos em PBS estéril em um volume final de 10 μ L por via intratecal.

G4: Grupo 20 pmol de MVIIC 2 horas (n=6) - os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo por meio do dispositivo de trauma MASCIS Impactor³. Duas horas após o trauma, os animais receberam 20 pmol da ω -conotoxina MVIIC² diluídos em PBS estéril em um volume final de 10 μ L por via intratecal.

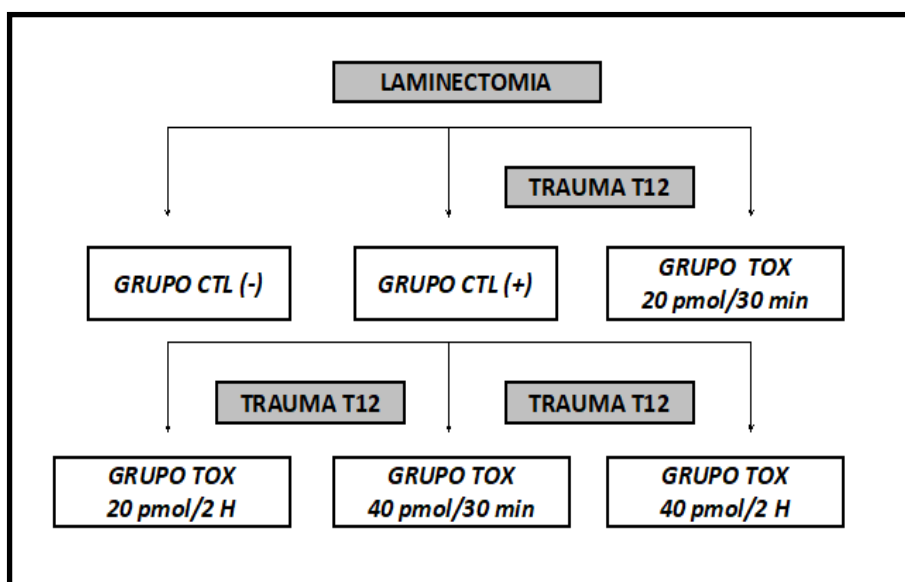
G5: Grupo 40 pmol de MVIIC 30 minutos (n=6) - os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo por meio do dispositivo de trauma MASCIS Impactor³. Trinta minutos após o trauma, os animais receberam 40 pmol da ω -conotoxina MVIIC² diluídos em PBS estéril em um volume final de 10 μ L por via intratecal.

G6: Grupo 40 pmol de MVIIC 2 horas (n=6) - os animais foram submetidos à laminectomia no segmento medular T12, seguida de trauma medular contusivo por meio do dispositivo de trauma MASCIS Impactor³. Duas horas após o trauma, os animais receberam 40 pmol da ω -conotoxina MVIIC² diluídos em PBS estéril em um volume final de 10 μ L por via intratecal.

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

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

A eutanásia dos animais foi realizada sete dias após o procedimento cirúrgico com sobredose de tiopental (100mg/kg) associado a lidocaína (10mg/kg) por via intraperitoneal em conformidade com a Resolução N° 1000/2012 que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). A definição do tempo da eutanásia foi baseada no critério de picos de apoptose celular secundária ao trauma, que ocorrem nos tempos de oito, 24 horas e sétimo dia após o trauma medular (Li et al., 1996; Lu et al., 2000).



QUADRO 1- Representação esquemática da distribuição dos grupos com respectivos tratamentos. CTL(-): laminectomia, CTL(+) :laminectomia/trauma medular em T12/10 µL solução PBS estéril, **TOX 20 pmol 30 min**: laminectomia/trauma medular em T12/10 µL solução MVIIC concentração 20 pmol 30 minutos após o trauma, **TOX 20 pmol 2 h**: laminectomia/trauma medular em T12/10 µL solução MVIIC concentração 20 pmol 2 h após o trauma, **TOX 40 pmol 30 min**: laminectomia/trauma medular em T12/10 µL solução MVIIC concentração 40 pmol 30 minutos após o trauma, **TOX 40 pmol 2h**: laminectomia/trauma medular em T12/10 µL solução MVIIC concentração 40 pmol 2h após o trauma.

A escolha das doses de 20 pmol e 40 pmol de MVIIC foi baseada no estudo de Oliveira (2012), que empregou 15, 30, 60 e 120 pmol, em dose única, pela via intralésional. Nessas doses a MVIIC mostrou-se segura quando avaliado parâmetros hematológicos e bioquímicos. Quando administrada em 15 pmol, pela mesma via, apresentou uma melhor recuperação da capacidade motora e preservação de corpos neuronais no segmento cranial, o que sugere que a dose de 15 pmol possua ação neuroprotetora, quando aplicado pela via intralésional (Oliveira 2012).

A definição dos tempos de aplicação da MVIIC foi realizada em função dos momentos de maximização de influxo de cálcio (45 min/8h), dos picos de apoptose (8h/24h/7dias pós trauma) assim como, o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (1h), aumento do RLO (24h/48h) após o TMA. O influxo de cálcio tem início após o trauma inicial, com primeiro pico aos 45 minutos, atingindo sua concentração máxima após oito horas da injúria inicial. A

manutenção de concentrações elevadas de cálcio intracelular permanecem por 24 a 48 horas até semanas. Deste modo, a administração intratecal da toxina 30 minutos e duas horas após TMA visou impedir o influxo de cálcio devido ao bloqueio de CCVD (Happel et al., 1981; Young et al., 1982; Fineman et al., 1993; Oyinbo, 2011).

O volume total de 10 µL de solução de MVIIC utilizado nesse experimento foi testado com segurança em ratos, não sendo observadas quaisquer alterações hemodinâmicas que contraindicassem esse volume (Mestre et al., 1994; Oliveira 2014).

3.4 PROTOCOLOS ANESTÉSICO E CIRÚRGICO

Os animais receberam antimicrobianoprofilaxia com cefalotina sódica⁴ (60mg/kg) e analgesia preemptiva com sulfato de morfina⁵ (5mg/kg), por via subcutânea, 10 minutos antes do início da cirurgia. A indução anestésica foi realizada em câmara fechada com isoflurano⁶ e o plano anestésico cirúrgico mantido por máscara facial com o mesmo agente anestésico. Durante o procedimento, os ratos foram mantidos aquecidos a 38°C por meio de uma plataforma aquecida, sendo monitorada a temperatura corporal através de termometria retal.

Após a tricotomia, realizou-se a anti-sepsia da região dorsal do tronco com clorexidina 2% solução com tensoativos⁷ e clorexidina 0,5% solução alcoólica⁸. Os ratos foram posicionados no dispositivo indutor de trauma medular espinhal MASCIS Impactor³. Realizou-se a incisão longitudinal de pele e tecido subcutâneo na topografia das vértebras torácicas T7 a T12, a divulsão da musculatura epaxial com secção de suas inserções nos processos espinhosos T11-T13 e subsequente exposição desses processos espinhosos. Foi realizada a ostectomia do processo espinhoso da vértebra T12, seguida da remoção da lâmina dorsal com *drill* pneumático⁹ neurológico para exposição da porção medular.

O trauma mecânico foi causado por queda da haste de impacto de 10 g a 12,5 mm de Altura (FIGURA 4), caracterizando uma lesão leve segundo Santos et al.(2011). O sítio da lesão foi irrigado com solução fisiológica NaCl 0,9%¹⁰ à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se aproximação dos músculos seccionados e redução do espaço morto, empregando-se sutura padrão simples contínua com fio inabsorvível sintético 3-0¹¹. A dermorrafia foi realizada com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio.

3-MASCIS IMPACTOR

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

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

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

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

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

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

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

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

12-Microl, Model 701 LT SYR – Hamilton Company, Reno, NV, USA

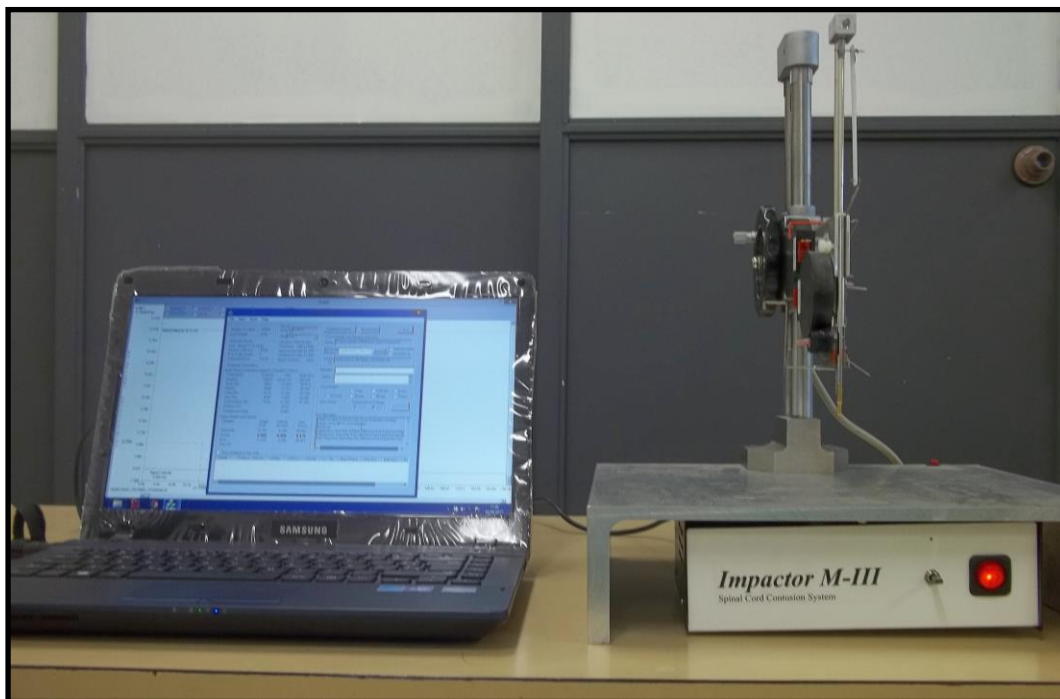


FIGURA 4 - Fotografia do aparelho indutor de trauma mecânico MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), modelo que realiza contusões raquimedulares em diferentes níveis. O dispositivo encontra-se conectado ao *Software Impactor 7.0* no computador

As lesões medulares foram produzidas obedecendo protocolo internacional MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), modelo que realiza contusões raquimedulares em diferentes níveis, o que determina o grau de gravidade. O dispositivo encontra-se conectado ao *Software Impactor 7.0* no computador, que exibe as curvas de trajetória de impacto medular por meio de sensores do aparelho, apontando possíveis erros de velocidade, tempo e altura de queda por meio de gráficos de controle de padronização (FIGURA 5) do trauma (Santos et al, 2011).

Após a cirurgia, todos os animais receberam solução de NaCl a 0,9% na taxa de manutenção (15ml/kg), via subcutânea. Decorridos 30 minutos do trauma, os grupos GIII e GIV receberam o tratamento específico, por via intratecal ou subaracnóidea, no espaço intervertebral L5/L6, com auxílio da seringa de Hamilton de 10 μ L e agulha de 30G. Para a realização correta da inoculação da MVIIC por via intratecal foi realizado treinamento prévio utilizando-se azul de metileno pela mesma via, em animais para descarte, e posterior verificação do espaço subaracnóideo para comprovação da eficácia da técnica utilizada durante a necrópsia. Os grupos GV e GVI receberam o mesmo tratamento após duas horas do trauma.

Os animais foram mantidos em caixas aquecidas com bolsa de água quente (38°C), até completa recuperação anestésica. No pós-operatório, foi realizada analgesia com sulfato de morfina (5 mg/kg, SC) a cada oito horas no dia da cirurgia e cloridrato de tramadol¹⁴ (5mg/kg, SC) a cada oito horas nos dias subsequentes. Antimicrobiano terapia com cefalexina¹⁵

(60mg/kg, VO) foi realizada a cada doze horas e massagem vesical, três vezes ao dia, até a eutanásia.

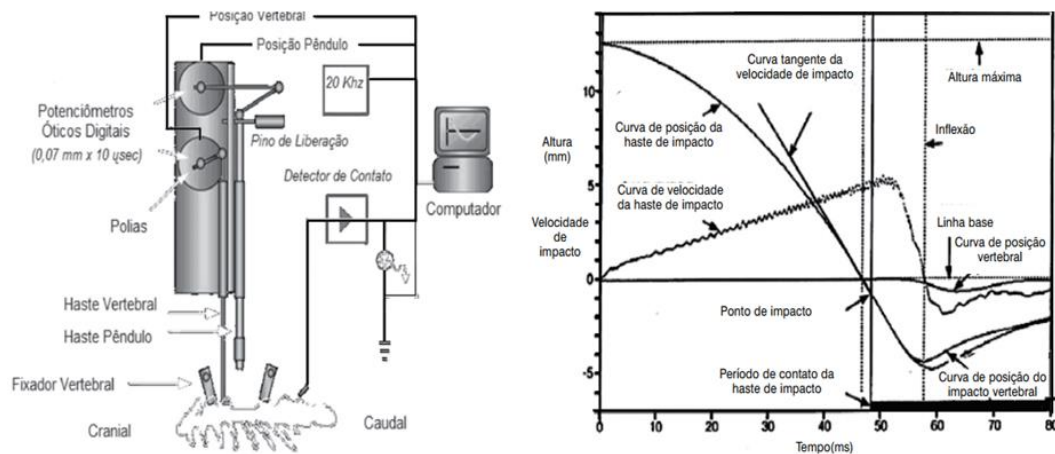


FIGURA 5 - Representação esquemática MASCIS Impactor (A) ; Parâmetros gráficos (B)
Fonte: Santos et al (2011)

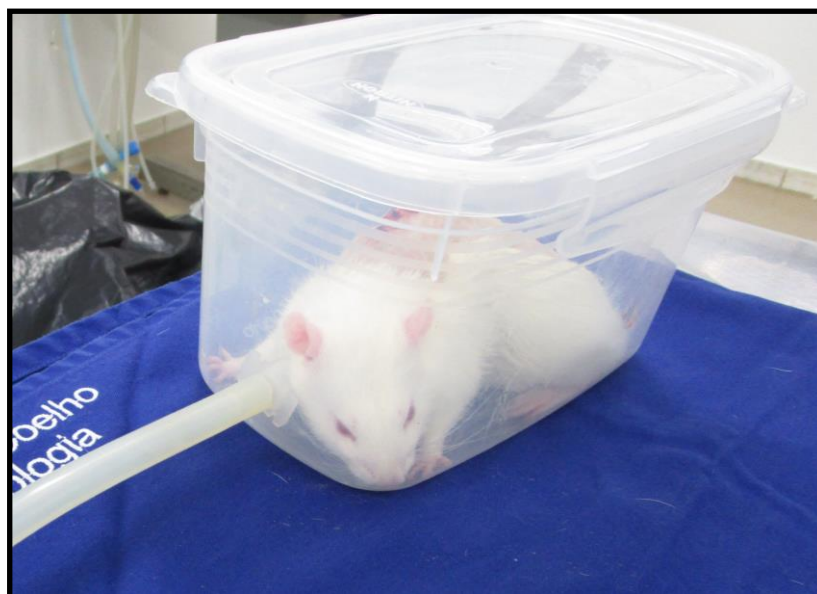


FIGURA 6 - Fotografia do procedimento anestésico experimental realizado em ratos Wistar tratados com MVIIC . Animal na câmara de indução anestésica com isofluorano.

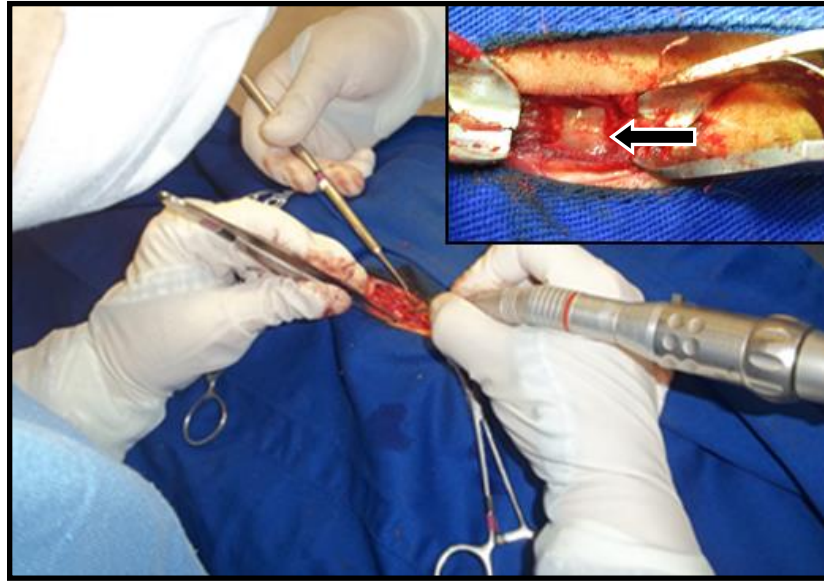


FIGURA 7 - Fotografia do procedimento cirúrgico de laminectomia - remoção da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico para exposição da porção medular realizado em ratos Wistar tratados com a ω -conotoxina MVIIC aplicada por via intratecal. No detalhe (seta), a medula exposta após



FIGURA 8 - Fotografia do Rato Wistar recebendo aplicação de MVIIC por via intratecal com auxílio da seringa de Hamilton de 10 μ L e agulha de 30G. Essa via de administração consiste na injeção de substâncias no canal raquideano, diretamente no espaço subaracnoide.

3.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA EM CAMPO ABERTO

Vinte e quatro horas antes do procedimento cirúrgico, todos os animais foram manejados para adaptação em um campo aberto, delimitado em uma área de circunferência de 1,0 m de diâmetro e 20 cm de altura, para reduzir o estresse da manipulação e facilitar as avaliações pós-operatórias. Após a adaptação, foi feita a primeira avaliação clínica/neurológica, repetida diariamente, em todos os grupos estudados, até a eutanásia dos animais. Todos os animais foram observados, avaliados clinicamente e filmados durante três minutos e, posteriormente os vídeos foram assistidos por dois avaliadores sem conhecimento do grupo a que os animais pertencem. De acordo com a escala proposta por Basso et al. (1996), cada animal recebeu um escore, que variou de 0 a 21 (Quadro 2).

Quadro 2 – Descrição dos escores para avaliação locomotora em campo aberto

Escores	Descrição
0	Nenhum movimento de membros pélvicos (MP) observado.
1	Movimento suave de uma ou duas articulações, geralmente quadril e joelho, menor que 50% da movimentação normal.
2	Movimento amplo de uma articulação ou movimento amplo de uma articulação e discreto de outra, maior que 50% da movimentação normal.
3	Movimento amplo de duas articulações do MP, geralmente quadril e joelho.
4	Movimento suave de três articulações do MP, geralmente quadril, joelho e tornozelo.
5	Movimento suave de duas articulações e amplo de uma terceira, geralmente tornozelo.
6	Movimento amplo de duas articulações e suave de uma terceira.
7	Movimento amplo de três articulações.
8	Movimentos suaves ou posicionamento plantar da pata sem suporte do peso.
9	Posicionamento plantar da pata com suporte do peso em um único momento ou suporte de peso na passada dorsal ocasional (<50%), frequente (51-94%) ou constante (95-100%) sem passada plantar.
10	Suporte de peso corporal ocasional (<50%) na passada plantar, sem coordenação dos membros torácicos (MT) e pélvicos.
11	Suporte de peso frequente (51-94%) a constante (95-100%) na passada plantar e sem coordenação dos MT e MP.
12	Suporte de peso frequente (51-94%) a constante (95-100%) na passada plantar e ocasional (<50%) coordenação dos MT e MP.
13	Suporte do peso frequente (51-94%) a constante (95-100%) na passada plantar e frequente (95-100%) coordenação dos MT e MP.
14	Suporte de peso constante (95-100%) na passada plantar e constante coordenação dos MT e MP; e predominante posição em rotação das patas (interna ou externa) no contato inicial com a superfície ou exatamente antes de levantá-la; ou passada plantar frequente (51-94%), constante (95-100%) coordenação dos MT e MP e passada dorsal ocasional (<50%).
15	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e frequente (51-94%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro.
16	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e frequente (51-94%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro; patas estão paralelas no contato inicial e rotacionadas ao se levantar.
17	Passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e frequente (51-94%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro; predominante posicionamento da posição das patas paralelas no contato inicial e ao levantar-se.

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

Fonte: Basso et al., 1996

3.6 AVALIAÇÃO SISTÊMICA E DA TOXICIDADE

No dia da eutanásia, foram coletadas amostras de sangue, por cardiopunção pós parada. A avaliação hematológica foi feita em contador eletrônico Diatron® - Abacus Junior Vet / CELM DA-500® - CELM, esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro, corados com May Grunwald/Giemsa – Doles® para contagem diferencial de leucócitos.

O volume globular foi avaliado pela técnica do microhematócrito e quantificação em tabela padrão e, após avaliação, o tubo capilar foi quebrado e uma gota de plasma depositada no refratômetro para dosagem de proteína.

As avaliações das funções hepática (fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), proteinograma (albumina, globulina e proteína total) e renal (uréia e creatinina) foi realizada utilizando-se o analisador bioquímico Cobas Mira® - Roche, seguindo protocolo de *kits* comerciais de diagnósticos Biosystems S.A. A avaliação hematológica (hematócrito, hemácia, hemoglobina e leucócitos totais) foi realizadas utilizando-se aparelho Diatron® - Abacus Junior Vet / CELM DA-500® - CELM, Cia., ambas no Laboratório de Análises Clínicas da EV/UFMG

A avaliação dos efeitos colaterais da aplicação da ω -conotoxina MVIIC, tais como tremor generalizado, andar em círculo ou fraqueza muscular (Dalmolin et al., 2011) foi realizada por observação e acompanhamento dos animais nas primeiras cinco horas após a aplicação da toxina e diariamente, no momento da avaliação locomotora em campo aberto, até o dia da eutanásia. Outros efeitos da MVIIC sobre déficit locomotor, paralisia flácida dos membros pélvicos ou diminuição da resposta de retirada da cauda, também descritos por Dalmolin e colaboradores (2011) não foram passíveis de avaliação pois são sinais clínicos semelhantes aos observados em pacientes submetidos ao trauma medular.

3.7 AVALIAÇÃO DA ESTRESSE OXIDATIVO

3.7.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para a avaliação da PL, foi coletado um segmento medular de 1,0 cm cranial ao epicentro, congelado imediatamente a -20°C para análise de MDA. O ensaio para avaliação da PL foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mihara e Uchiyama (1978), por meio da quantificação do conteúdo de MDA presente no sobrenadante do homogenato, por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico (TBA) em altas temperaturas.

Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi incubado com 500 µL de solução tampão de ácido acético pH 3.4, 200 µL de solução de SDS 8,1%, 100 µL de água e 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,8%; por 90 min a 95°C. O conteúdo de MDA foi medido no comprimento de onda de 532 nm. Após o resfriamento das amostras, foi realizada a leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro *Sherlab* para análise da absorbância.

3.7.2 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A mensuração das RLO foi realizada pela determinação dos níveis de diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA), um indicador da produção de peróxido pelos componentes celulares. Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCF-DA, e a sua oxidação subsequente por RLO, no interior da célula, gerando o DCF, um composto altamente fluorescente (Halliwell et al., 2007).

O fragmento coletado da medula espinhal, cranial ao epicentro da lesão, foi adicionado a 750 µL de solução tampão TRIS-HCl, e homogeneizado durante 2 minutos, centrifugado a 2.500 rpm a 4 °C por 10 minutos. Foi retirada uma alíquota de 20 µL e adicionada a 80µL DCF-DA 125 µM para quantificação de RLO. A placa foi incubada no escuro durante 1 h/37°C até o momento da mensuração da fluorescência (488/525 nm) no aparelho Victor X4 (Perkin-Elmer).

3.8 DETECÇÃO DOS FATORES DE APOPTOSE CELULAR

Segmento medular de 1,0 cm caudal ao epicentro da lesão foi coletado para a realização da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR), para avaliação da expressão gênica de Bax, Bcl-Xl, Caspase-3 Caspase-8 e Caspase-9, como forma de avaliar a ativação das vias de apoptose. A amostra foi coletada em criotubo livre de RNAase e DNAase e imediatamente congelada em nitrogênio líquido a -196 °C, armazenado, posteriormente, a -80 °C para realização da técnica de RT-PCR em tempo real.

Para avaliação da expressão dos genes e *primers* iniciadores e do gene normalizador da beta-actina, foram utilizados os segmentos medulares coletados e os *primers* iniciadores *Forward* (F) e *Reverse* (R) indicados na tabela 1.

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

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

Fonte: Coelho, 2016

O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante, realizando-se a homogeneização em aparelho Tissue Lyser II 28 na frequência de 20s por 4 minutos. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio e centrifugados a 12.000 rpm durante 15 minutos a temperatura de 4°C, sendo observada a formação de três fases distintas. A fase superior contendo o RNA foi transferida cuidadosamente para um tubo novo e adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico para precipitação do RNA e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Foi realizada nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e descartou-se todo o sobrenadante. Para lavagem e ressuspensão do RNA, foi adicionado 1,0 mL de etanol 75% e centrifugado a 7.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado, e secagem realizada à temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos contendo os *pellets* com o RNA, proveniente das duas centrifugações, receberam 1,0 mL de etanol 75% cada, sendo novamente centrifugados, o etanol descartado e os tubos colocados para secar. Após a secagem, o RNA foi homogeneizado adicionando-se 20 µL de água ultrapura seguido de incubação por 10 minutos a 55°C. Foi retirada uma amostra de 1,0µL para quantificação do RNA e sua mensuração foi realizada em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias 260/280 nm, e o restante foi congelado a -80°C.

As reações de PCR foram conduzidas com o *Kit SYBR Green* no aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Os *primers* iniciadores *forward* e *reverse* referentes aos genes para Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax e Bcl-XI, foram obtidos a partir de estudos anteriores (Fukushima, 2012).

As reações de amplificação do cDNA dos genes foram realizadas na plataforma de instrumentação *ABI Prism 7900*, com a utilização de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação da fita dupla, um minuto a 60°C para anelamento dos iniciadores dos respectivos genes, um minuto a 75°C para extensão dos amplicons e mais 10 minutos a 75°C para término da reação.

O *Software 7500 v.2.0.1 Applied Biosystems* apresentou os resultados em gráfico de fluorescência em relação ao número de ciclos, sendo o ciclo limiar, ou *threshold* (CT), o ciclo em que se inicia a amplificação da amostra. A expressão gênica relativa ou *fold change* (FC) de cada gene foi calculada utilizando-se o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$. Assim, o delta CT (ΔCT) foi determinado pela subtração do CT do gene pesquisado pelo CT do gene normalizador beta actina. O delta CT ($\Delta\Delta CT$) foi encontrado pela diferença entre o ΔCT e a média do ΔCT do grupo controle positivo. E a expressão gênica relativa foi dada pela fórmula: $FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Yuan et al., 2006).

3.9 ANALISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. A normalidade dos parâmetros foi analisada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), com comparação de médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK). As variáveis não paramétricas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (KW), para comparação das medianas entre grupos seguido de comparações múltiplas entre pares de tratamentos pelo teste de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote *Prism 5 for Windows, versão 5.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA*, sendo adotado como nível de significância 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TRAUMA

O modelo de lesão medular por haste compressiva, com a utilização do aparelho indutor de trauma Mascis Impactor provocou déficits locomotores nos animais com escore entre 12 e 15, segundo escala BBB, o que caracteriza trauma medular agudo de grau leve (Santos et al. 2011). Não foram observados comprometimentos deambulatórios nos animais do grupo CTL(-). Esse grupo foi submetido apenas a laminectomia, sem contudo, gerar lesão na medula espinhal.

A utilização desse modelo, permitiu a realização de TMA padronizado, o que possibilitou a avaliação do tratamento proposto e acompanhamento da evolução do processo clínico-patológico instaurado. A viabilidade deste modelo também foi observada por Coelho (2016), Milani (2016) e Lozano (2017).

Durante as avaliações clínicas e dos efeitos colaterais da administração da conotoxina MVIIC, não foi observada nenhuma alteração de parâmetros clínicos ou comportamentais que indicasse toxicidade das doses administradas. O mesmo foi observado por Oliveira (2014) em administração de MVIIC intralesional, quando utilizada a dose 15, 30, 60 e 120 pmol, por aplicação intralesional.

4.2 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Os valores plasmáticos das avaliações hematológicas não apresentaram diferença em relação aos padrões fisiológicos para espécie (Thrall, 2004; Kaneco et al., 2008) e nem entre os grupos (Gráfico 1). Os valores de concentração sérica de células sanguíneas ficaram dentro dos padrões fisiológicos, nos testes hematológicos realizados aos sete dias após a cirurgia. Esses resultados sugerem que os tratamentos com MVIIC não causaram qualquer distúrbio na produção ou consumo das células sanguíneas, nas doses 20 pmol e 40 pmol nos tempo 30 minutos e 2 horas, respectivamente.

Por outro lado, Oliveira (2012) observou aumento no número de hemácias, hematócrito (Ht) e concentração de hemoglobina, em ratos Wistar submetidos ao TMA e tratados com MVIIC por aplicação intralesional. Isso pode ser decorrente do estresse do pós-operatório e também da eutanásia no momento da contenção e anestesia, levando a uma contração esplênica com consequente liberação de hemácias oxigenadas. Todavia, mantiveram-se dentro os valores fisiológicos para espécie .

Foi importante a avaliação das alterações hematológicas porque corroboram os resultados relacionados a clínica, o que confirma que as doses empregadas nesse estudo não possuem toxicidade em ratos.

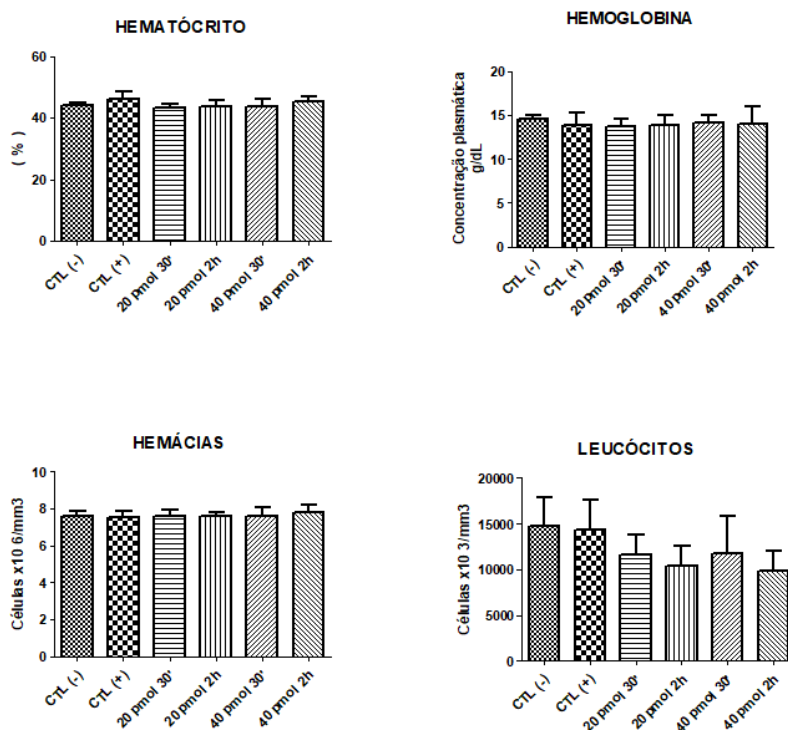


GRÁFICO 1 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos valores de hematócrito, hemácias , hemoglobina e leucócitos totais de ratos Wistar submetidos ao TMA e tratados com MVIIC nas doses de 20 pmol/40 pmol 30 minutos e duas horas após lesão. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (teste de SNK, $p > 0,05$).

4.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E PROTEINOGRAMA

Toxinas em geral são metabolizadas no fígado e excretadas pelos rins. Desta forma, a avaliação sérica do proteinograma (albumina, globulina, proteínas totais), das enzimas hepáticas (AST, ALT e FA) e renais (uréia, creatinina) tornam-se essenciais para avaliação do impacto da administração da MVIIC nesses órgãos.

Os resultados obtidos não apresentaram diferença em relação aos parâmetros fisiológicos para a espécie e nem entre os grupos estudados (Thrall, 2004; Hooper et al., 2007) (Gráficos 2 e 3), embora nesse estudo, um animal do grupo 40 pmol 30 minutos tenha apresentado retenção urinária, hematúria e valores séricos de uréia e creatinina acima dos valores de referência para a espécie. A massagem vesical realizada diariamente permitiu um efetivo esvaziamento da bexiga e contribuiu para a prevenção do acúmulo urinário pelo período estudado, (Ayas et al., 2006), no entanto, a incapacidade de esvaziamento vesical originado pelo TMA nesse animal levou a um quadro de uremia pós-renal, com aumento de compostos nitrogenados reabsorvidos da urina para a circulação sanguínea (Cowgill et al., 2000), porém a uremia observada não foi suficiente para gerar diferença estatística do grupo em questão em relação aos grupos controle.

Portanto, esses resultados sugerem que não houve alterações das funções hepática e renal nos animais submetidos ao tratamento com MVIIC pós trauma medular agudo, nas doses e tempos analisados corroborando assim com os trabalhos de Oliveira (2012) e Lozano (2017), que encontraram resultados semelhantes em seus estudos.

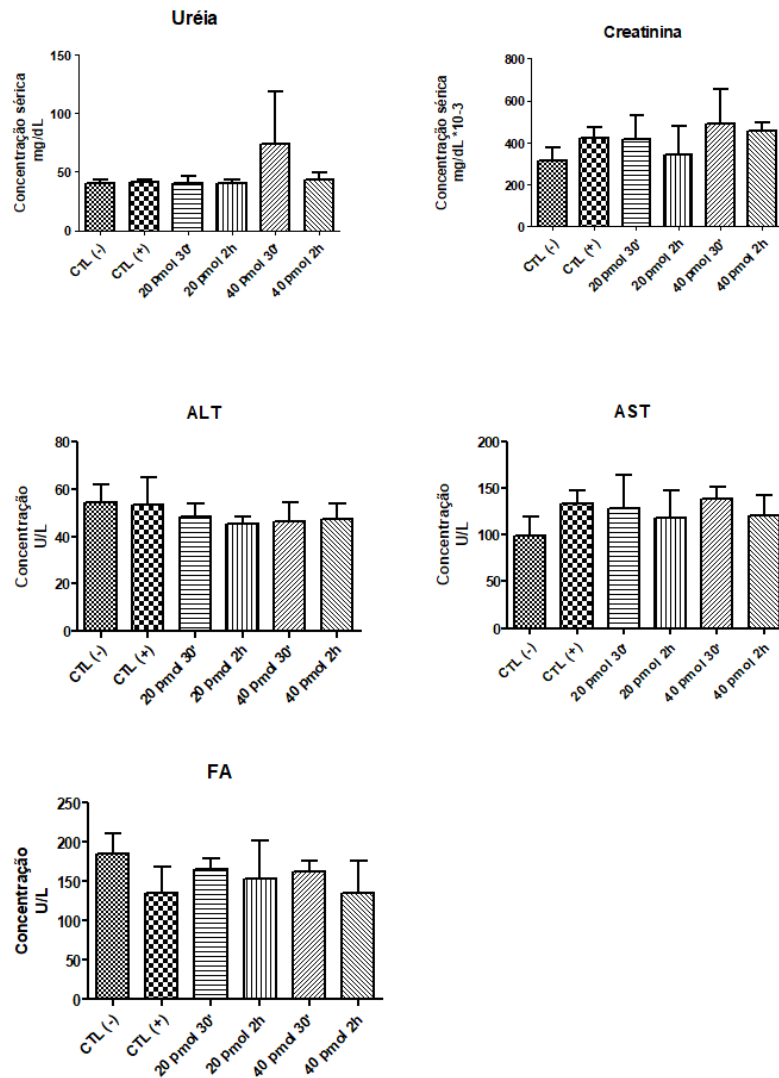


GRÁFICO 2 – Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores séricos de uréia, creatinina, AST, ALT e FA de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com MVIIC nas doses de 20 pmol e 40 pmol 30 minutos e 2 horas após lesão ($p \leq 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

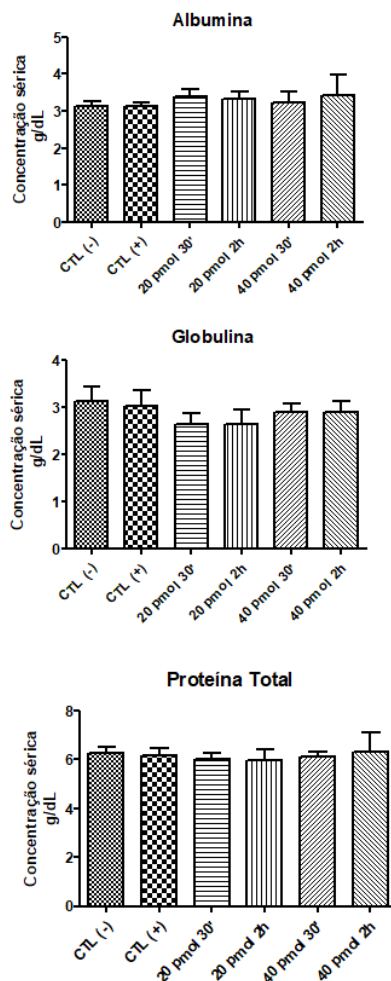


GRÁFICO 3 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de Albumina, Globulina e Proteína Total de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com MVIIC nas doses de 20 pmol e 40 pmol 30 minutos e 2 horas após lesão. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (SNK, $p > 0,05$).

4.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA EM CAMPO ABERTO

A avaliação da capacidade motora foi realizada utilizando-se a escala BBB (Basso et al., 1995). Foi realizado treinamento prévio em ambos avaliadores afim de evitar atribuição de escores com valores muito diferentes ao mesmo animal. Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica antes do procedimento cirúrgico e nenhum deles apresentou qualquer déficit neurológico em nenhum parâmetro avaliado. As demais avaliações foram realizadas nos dias subsequentes ao procedimento cirúrgico de indução do trauma medular e respectivos tratamentos com MVIIC por via intratecal.

Na primeira avaliação pós-cirúrgica, os animais submetidos ao trauma apresentaram paraparesia leve, caracterizada pela presença de passada dorsal ou plantar com apoio de peso ocasional, consistente ou frequente. Os animais do grupo CTL(-) não apresentaram nenhuma alteração motora, o que demonstrou que a realização da laminectomia não ocasionou danos motores aos animais.

Na última avaliação, realizada no sétimo dia após a cirurgia, todos os grupos submetidos ao trauma medular apresentaram escores médios mais elevados quando comparados aos seus respectivos escores na primeira avaliação. No entanto, os grupos TOX 40pmol 30 minutos e TOX 40pmol 2 horas não apresentaram diferença significativa ao CTL(-), e apenas o TOX 40 pmol 30 minutos mostrou diferença estatística do grupo CTL(+). Os animais desse grupo apresentaram passada plantar e coordenação dos MT e MP constantes (95-100%) durante o andar e constante (95-100%) arrastar dos dedos dos pés durante o avanço do membro; predominante posicionamento da posição das patas paralelas no contato inicial e ao levantar-se; e a cauda manteve-se caída parte ou todo o tempo. Sugere-se portanto, que o grupo TOX 40 pmol 30 min teve melhor recuperação motora comparada aos demais grupos submetidos ao trauma no intervalo de sete dias de avaliação, se igualando aos escores dos animais submetidos apenas a laminectomia (GRÁFICO 4).

Oliveira (2012) observou que o grupo submetido ao trauma no período de oito dias de avaliação e tratado com 15 pmol de MVIIC, por via intralesional, teve melhor recuperação motora comparado aos grupos 30/60 e 120 pmol. Lozano (2017) observou discreta melhora locomotora nos animais submetidos a dose de 15 pmol de MVIIC 48 h pós-trauma medular administrada por via intratecal.

A diferença observada na recuperação da função motora nos estudos citados pode ser devido às diferentes vias e tempos de aplicação da toxina, sugerindo que a administração intralesional requer menor dose de toxina que a intratecal em função de sua maior disponibilidade no local da lesão na medula.

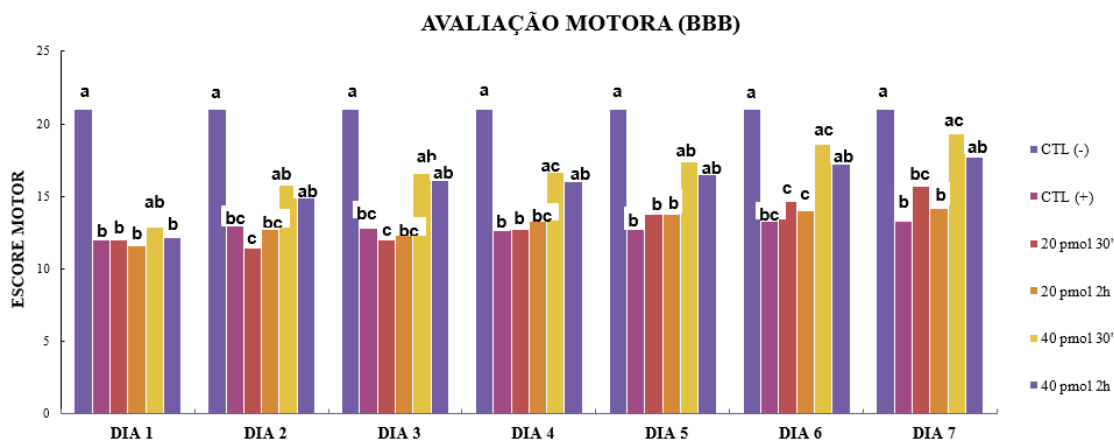


GRÁFICO 4 - Gráfico da avaliação da capacidade motora mostrando as medianas dos escores diários de ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo compressivo e tratados com a ω-conotoxina MVIIC (CTL (-) controle negativo; CTL(+) controle positivo; TOX 20 pmol MVIIC 30 min; TOX 20 pmol MVIIC 2h; TOX 40 pmol MVIIC 30 min; TOX 40 pmol MVIIC 2 h. Kruskal Wallis .Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística (p<0,05).

4.5 ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O SNC é uma fonte rica de gorduras polinsaturadas. A peroxidação destes ácidos graxos determina a formação de produtos de aldeído, contribuindo para o aumento dos efeitos deletérios do estresse oxidativo prejudicando as funções metabólicas das enzimas e levando a morte celular. Um dos principais produtos primários de peroxidação lipídica é o MDA (Esterbauer et al, 1991; Alexandrova et al., 2008).

Foi mensurado MDA das amostras e observou-se que os valores encontrados nos grupos tratados não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si e com os grupos controle, tanto negativo quanto positivo (GRÁFICO 5).

A MVIIC não foi capaz de reduzir a PL dos grupos tratados com 20pmol e 40 pmol, 30 minutos e 2 horas respectivamente, quando comparados com o grupo CTL (+) pós TMA. O conteúdo de MDA dos grupos tratados com 20 pmol foi discretamente menor que a dos grupos tratados com 40 pmol, no entanto não apresentaram diferença estatística entre si, nem com os grupos controle positivo ou negativo.

4.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

A quantidade de RLO nas amostras foi avaliada por desacetilação da sonda DCF-DA e os resultados expressos no gráfico 6.

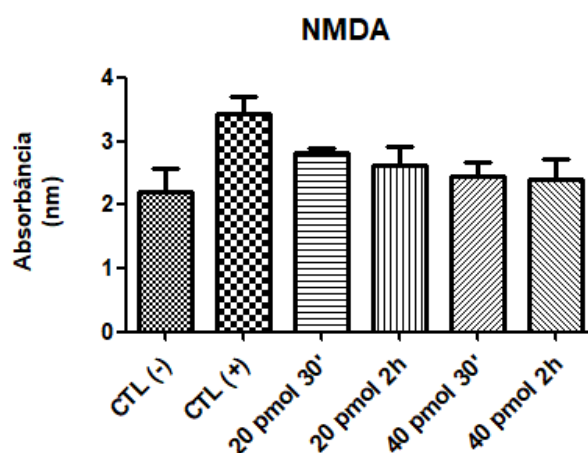


GRÁFICO 5 - Representação gráfica de médias e desvio-padrão dos níveis de MDA dos grupos submetidos à laminectomia ao trauma medular espinhal, e tratados com conotoxina MVIIC. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais estudados (Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

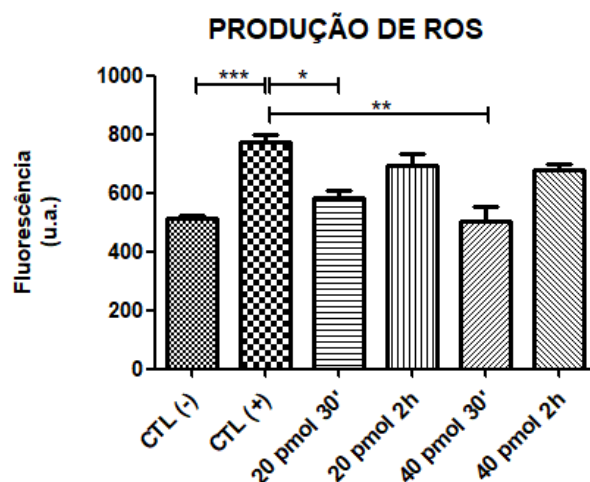


GRÁFICO 6 - Representação gráfica de médias e desvio-padrão dos níveis de RLO dos grupos submetidos à laminectomia ao trauma medular espinhal, e tratados com conotoxina MVIIC. Foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais controle positivo quando comparado com controle negativo, 20 pmol 30 minutos e 40 pmol 30 minutos (teste de Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

A MVIIC foi capaz de reduzir a produção de RLO quando administrada por via intratecal, 30 minutos após o TMA, tanto na dose de 20 pmol quanto 40 pmol. Portanto, observa-se que o tempo de 30 minutos foi determinante na redução de RLO.

Porém, apesar do estresse oxidativo ter início poucos minutos pós-impacto mecânico primário (Bains e Hall, 2012), com a PL ocorrendo uma hora após lesão da medula espinhal e o aumento de RLO somente 4 e 24 h após o trauma (Azbill et al, 1997), neste estudo não foi observada a redução da PL mas houve redução do RLO, mesmo com emprego aos 30 minutos

A diminuição dos níveis de RLO está diretamente relacionada com o decréscimo da peroxidação lipídica, no entanto, não houve redução nos níveis de PL. Dessa forma, a redução da produção de RLO pode estar ligada ao sistema antioxidante endógeno, composto principalmente pelas enzimas SOD, catalase e glutatona peroxidase. Essas enzimas exercem uma função importante na homeostase redox dos tecidos mantendo oxidantes em baixas concentrações (Chen et al., 2011; Oliveira et al., 2014).

Além das enzimas antioxidantes, existem moléculas presentes no tecido, como glutatona, ácido ascórbico e vitamina E que são capazes de eliminar os radicais livres do sistema (Chan, 2001). Sugere-se então a mensuração das enzimas antioxidantes endógenas SOD, catalase e glutatona peroxidase para melhor avaliação da ação da MVIIC no estresse oxidativo.

4.6 DETECÇÃO DE FATORES DE APOPTOSE CELULAR

Foi avaliado o comportamento da expressão gênica de fatores antiapoptóticos (Bcl-Xl) e de pró-apoptóticos (caspase-3, caspase-8, caspase-9 e Bax), após tratamento com MVIIC por qRT-PCR para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na morte de células neurais induzidas pela lesão medular. A expressão gênica relativa dos fatores anti-apoptótico Bcl-Xl e pró-apoptótico caspase-3, caspase-8, caspase-9 e Bax foram expressas em *fold change* dada por $2^{-\Delta\Delta CT}$. Na avaliação da expressão gênica relativa do fator anti-apoptótico Bcl-Xl, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os animais dos grupos tratados com MVIIC, nos tempos estudados, quando comparados com os grupos controle positivo e negativo.

Na expressão gênica relativa de Bcl-Xl (GRÁFICO 7), os grupos 40 pmol, tanto tratados 30 minutos pós- trauma medular quanto os tratados duas horas após a lesão apresentaram valores superiores aos demais grupos, contudo sem diferença estatística. Em seguida, foi realizada a mensuração da expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos (caspase-8, caspase-9, caspase-3 e Bax). Quando se avaliou a caspase-8 (GRÁFICO 8), observou-se redução significativa da expressão gênica apenas no grupo 20 pmol 30 minutos quando comparado ao grupo controle positivo ($p < 0,05$).

No entanto, a expressão gênica relativa desse fator nos demais grupos apresentaram valores muito próximos ao grupo controle negativo e inferiores ao grupo controle positivo, sem contudo apresentar diferença estatística.

A avaliação da expressão gênica de Bax (GRÁFICO 9), demonstrou não haver diferença estatística ($p > 0,05$) entre os animais dos grupos tratados com MVIIC, nos tempos estudados, quando comparados com os grupos controle positivo e negativo e nem entre os grupos controle.

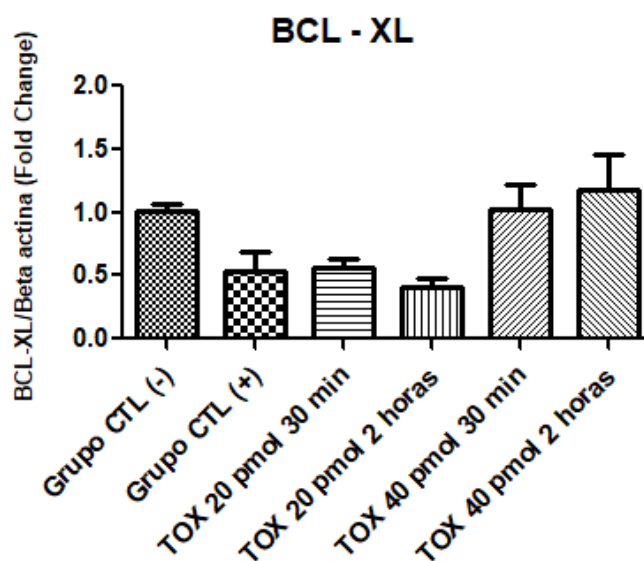


GRÁFICO 7 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica do fator antiapoptótico Bcl-xl em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais estudados (Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

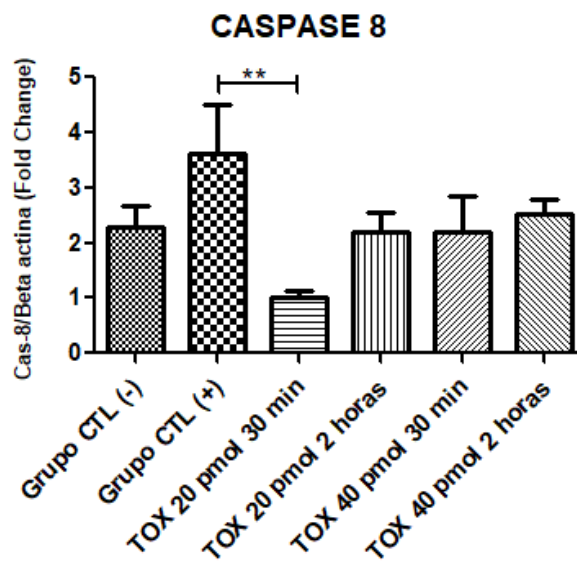


GRÁFICO 8 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica do fator proapoptótico caspase-8 em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC. Foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais controle positivo e 20 pmol 30 minutos (Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

A avaliação da expressão gênica de Bax demonstrou não haver diferença estatística ($p > 0,05$) entre os animais dos grupos tratados com MVIIC, nos tempos estudados, quando comparados com os grupos controle positivo e negativo e nem entre os grupos controle.

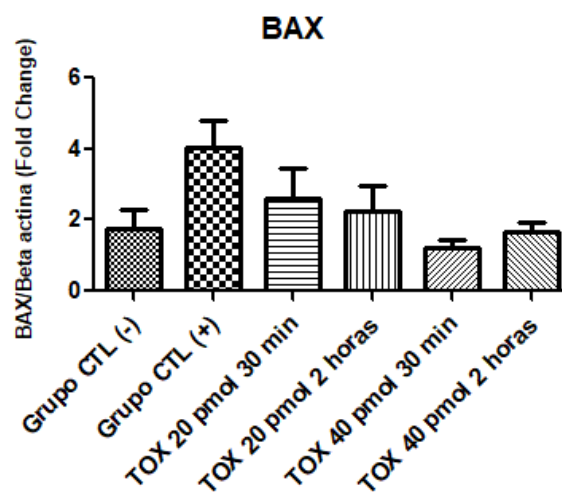


GRÁFICO 9 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica do fator proapoptótico Bax em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais estudados (teste de Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

Os grupos tratados 40 pmol de MVIIC, nos tempos 30 minutos e duas horas apresentaram menor expressão gênica relativa de Bax que os outros grupos estudados, inclusive quando comparados ao grupo controle negativo; no entanto, não foram suficientes para gerar diferença estatística.

Quanto à avaliação da caspase-3 (GRÁFICO 10), foi observada redução na expressão gênica relativa e diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com 20 pmol nos tempos 30 minutos e duas horas quando comparados com o grupo controle positivo.

A expressão gênica da caspase-9 (GRÁFICO 11) foi menor nos grupos tratados com MVIIC na dose 20 pmol nos tempos 30 minutos e duas horas em relação ao grupo controle positivo ($p < 0,05$), apresentando diferença estatística entre esses grupos. Ao mesmo tempo, observou-se que o grupo tratado com 40 pmol 30 minutos de MVIIC apresentou valor de expressão gênica relativa maior que o grupo 20 pmol 30 minutos ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos na quantificação da expressão genica relativa por RT-PCR sugeriram a redução de apoptose nos grupos tratados com MVIIC nas doses e tempos estudadas. A redução da expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos (caspase-8, Bax, caspase-9 e caspase-3), quando comparado ao grupo controle positivo sugere que a utilização intratecal da MVIIC pós TMA pode reduzir a apoptose neural tanto pela via extrínseca, devido a redução da expressão de caspase-8, como pela via intrínseca, pelo redução da expressão gênica da caspase-9 e caspase-3 nos grupos III e IV.

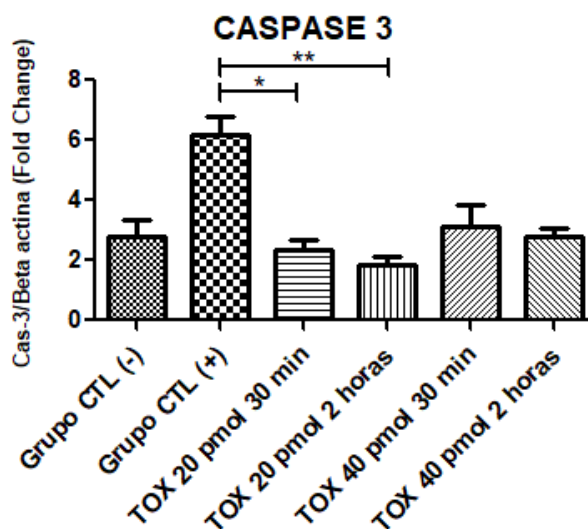


GRÁFICO 10 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica do fator propoptótico caspase -3 em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC. Foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais controle positivo e 20 pmol 30 minutos e 20 pmol 2 horas (Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

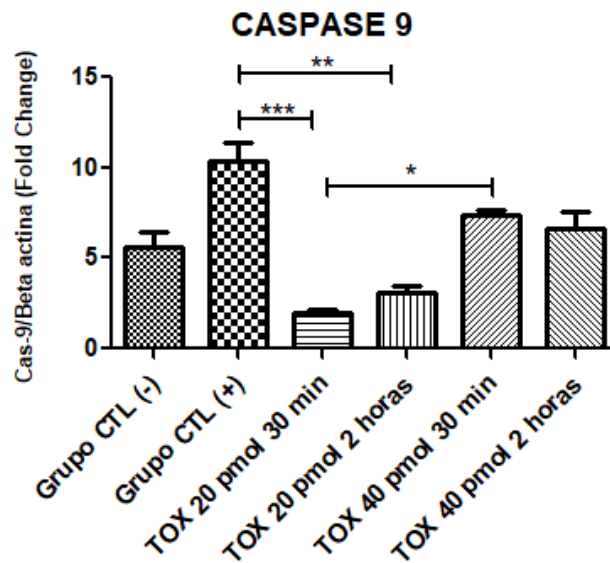


GRÁFICO 11 – Representação gráfica de médias e desvios-padrão do fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) referentes à expressão gênica do fator proapoptótico caspase -9 em ratos Wistar submetidos ao trauma medular agudo e tratados com conotoxina MVIIC. Foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais controle positivo e 20 pmol 30 minutos e 20 pmol 2 horas, também observada diferença estatística entre os grupos 20 pmol 30 minutos e 40 pmol 30 minutos (teste de Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

Os resultados obtidos na quantificação da expressão genica relativa por RT-PCR sugeriram a redução de apoptose nos grupos tratados com MVIIC nas doses e tempos estudadas. A redução da expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos (caspase-8, Bax, caspase-9 e caspase-3), quando comparado ao grupo controle positivo sugere que a utilização intratecal da MVIIC pós TMA pode reduzir a apoptose neural tanto pela via extrínseca, devido a redução da expressão de caspase-8, como pela via intrínseca, pelo redução da expressão gênica da caspase-9 e caspase-3 nos grupos III e IV.

O grupo tratado com MVIIC na dose de 20 pmol 30 minutos teve menor indução apoptótica com a redução na produção de caspases 3, 8 e 9. Esses resultados podem ser devido a redução de RLO que esse grupo apresentou. Porém, esses resultados não foram ratificados na avaliação motora, uma vez que esse grupo não se assemelhou ao grupo controle negativo, ao contrário do grupo 40 pmol 30 minutos. Isso pode ser devido a diferença entre os métodos de avaliação, visto que a avaliação motora é uma resposta fisiológica e a apoptose (PCR) é expressão gênica.

5 CONCLUSÕES

A toxina MVIIC nas doses 20 e 40 pmol, administradas por via intratecal não foi capaz de causar alterações nos padrões clínicos, hematológicos, bioquímicos e de proteinograma de ratos Wistars tratados com as respectivas doses nos tempos de 30 minutos e duas horas pós-trauma medular agudo .

A MVIIC para o tratamento de TMA em ratos, na dose 40 pMol 30 minutos promove a recuperação da função motora funcional dos animais submetidos ao espectivo tratamento.

Houve redução nos níveis de RLO na medula de Ratos Wistar submetidos ao TMA tratados com MVIIC nas doses 20 pmol e 40 pmol no tempo 30 minutos em relação ao grupo controle positivo, o que sugere neuroproteção por redução de estresse oxidativo nos respectivos grupos.

A MVIIC, quando administradas nas doses 20 pmol e 40 pmol por via intratecal em ratos submetidos ao TMA não foi capaz de influenciar na expressão gênica relativas de fatores antiapoptóticos Bax e Bcl-xl

O emprego de 20 e 40 pmol da MVIIC foi capaz de gerar neuroproteção por redução de expressão gênica relativa dos fatores proapoptóticos caspase-3, caspase-8 e caspase-9.

6 - REFERÊNCIAS

ADAMS, D.J., BERECKI, G. *Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type (Cav2.2) calcium channels* Biochimica et Biophysica Acta 2013.

ALEXANDROVA, A., PETROV, L., GEORGEVA, A. et al., *Effect of copper intoxication on rat liver proteasome activity: relationship with oxidative stress*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 22, no. 5, pp. 354–362, 2008.

ANDREYEV, A.Y., KUSHNARAEVA, Y.E., STARKOV, A.A. *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. *Biochemistry (Mosc)* 70:200–214, 2005.

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

ARUNDINE, M., TYMIANSKI, M. *Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity* *Cell Calcium* 34 325–337; 2003.

AYALA, A., MUÑOZ, M.F., ARGUELLES, S. *Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal* *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume , Article ID 360438, 2014.

AYAS, S.; LEBLEBICI, B.; SÖZAY, S. et al. *The effect of abdominal massage on bowel functional in patients with spinal cord injury*. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, v.85, n.12, p.951-955, 2006.

AZBILL, R.D. , MU, X., BRUCE KELLER, A.J., MATTSON, M.P., SPRINGER, J.E. *Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury* *Brain Research* . 283–290 765; 1997.

BAINS, M., HALL, E.D. *Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury*. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 675e684; 2012.

- BASTANI, N.E., KOSTOVSKI, E., SAKHI, A.K. KARLSEN, A., CARLSEN, M.H., HJELTNES, N., BLOMHOFF, R., IVERSEN, P.O. *Reduced antioxidant defense and increased oxidative stress in spinal cord injured patients*. Arch. Phys. Med. Rehabil. 93,2223e2228 ; 2012.
- BASSO, M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. *Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion the NYU weight-drop device versus transection*. Exp. Neurol., v.139, n.2, p.244-256, 1996.
- BASU, S., HELLBERG, A., ULUS, A.T., WESTMANN, J., KARACAGIL, S. *Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia*. FEBS Lett ;508(1):36–8; 2001.
- BEAL, M. F. *Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Ann. Neurol. 38, 357-366, 1995.
- BEATTIE, M.S.; FAROOQUI, A.A.; BRESNAHAN, J.C. *Review of Current Evidence for Apoptosis After Spinal Cord Injury*. J Neurotrauma, v.17, n.10, p. 915-925, 2000.
- BEATTIE, M.S. *Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury*. Trends Mol. Med. 10, 580–583; 2004.
- BIELSKI, B.H.J., ARUDI, R.L., SUTHERLAND, M.W., *A study of the reactivity of HO₂/O₂-with unsaturated fatty acids*. Journal of Biological Chemistry, vol. 258, no. 8, pp. 4759–4761, 1983.
- BOLDIN, M.P.; GONCHAROV, T.M.; GOLTSEV, Y.V. *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.
- BRANDES, R.P., WEISSMANN, N., SCHRODER, K. *Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation*. Free Radic Biol Med.76:208–226, 2014.
- BREDT, D.S., SNYDER, S.H., *Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum*, Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 86 9030–9033; 1989.
- BROWNE, R.W., ARMSTRONG, D. *HPLC analysis of lipid derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma*. Clinical Chemistry, vol. 46, no. 6, part 1, pp. 829–836, 2000.
- CADENAS, E., DAVIES, K.J. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. Free Radic Biol Med 29:222–230, 2000.
- CATTERALL, W.A. *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. Annu.Rev. Cell Dev. Biol. 16, 521–555; 2000.
- CHAN, P.H. *Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain*. J Cereb Blood Flow Metab 21: 2–14, 2001.
- CHACÓN, S.C.; NIETO-SAMPEDRO, M. *Pathophysiology of spinal cord injury*. A review. Vet. Mex., v.36, n.1, p.75-86, 2005.

CHEN, X.J., WANG, X., KAUFMAN, B.A., BUTOW, R.A. et al. *Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance*. *Science* 307:714–717, 2005.

CHEN, H., YOSHIOKA, H., KIM, G., JUNG, J. E., et al. *Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection*. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 8, 2011.

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

CHOI, D.W. *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*, *Neuron* 1 623–634, 1988.

COELHO, M.P.R.C. *Avaliação do efeito neuroprotetor da toxina PH-alfa 1 beta no trauma medular agudo em ratos*. UFMG, Dissertação defendida em 28 de janeiro de 2016.

CORONA, J.C.; TAPIA, R. *Mecanismos de neurodegeneración*. *Mensaje Bioquímico*, v.29, p.17-28, 2005.

ÇOLAK, A.; KAYA, M.; KARAOĞLAN; A., et al. *Calpain inhibitor AK 295 inhibits calpain-induced apoptoseis and improves neurologic function after traumatic spinal cord injury in rats*. *Neurocirugía*, v.20, p.245-254, 2009.

COYLE, J. T., PUTTFARCKEN, P. *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders*. *Science* 262, 689-695 1993.

COWGILL, L.D.; ELLIOTT, D.A. *Acute renal failure*. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2000. p.1615-1633.

DALMOLIN, G.D., SILVA, C.R., RIGO, F.K., et al. *Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain*. *Pain*, 152(10):2224–2332, 2001.

DELAMANTER, R.B.; SHERMAN, J.; CARR, J.B. *Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression*. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.77, n.7, p.1042-1049, 1995.

DIAZ, A.; DICKENSON, A. H. *Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurons produced by subcutaneous formalin inflammation*. *Pain*, v. 69, p. 93-100, 1997.

DOBLE, A. *The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy*. *Pharmacol. Ther.*, v. 81, p. 163-221, 1999.

DOLPHIN, A.C. *The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels*, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 1541–1549, 2013.

DUGAN, L. L., SENSI, S. L., CANZONIERO, L. M. T., et al. *Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate*. *J. Neurosci.* 15, 6377--6388, 1995.

DUMUIS, A., SEBBEN, M., HAYNES, L., et al. *NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons*. *Nature* 336, 68-70, 1988.

DUNLAP, K., LUEBKE, J.I., TURNER, T.J. *Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons*. *Trends Neurosci.* 18, 89–98; 1995.

EMERY, E., ALDANA, P., BUNGUE, M.B. *Apoptosis after traumatic human spinal cord injury*. *Journal Neurosurgery* 89(6):911–20; 1998.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H., DIANZANI, M.U. et al. *Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes*, *Biochemical Journal*, vol. 208, no. 1, pp. 129–140, 1982.

ESTERBAUER, H., SCHAUR, R.J., ZOLLNER, H. et al. *Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 11, no. 1, pp. 81–128, 1991.

FINEMAN, I.; HOVDA, D.A.; SMITH, M. et al *Concussive brain injury is associated with a prolonged accumulation of calcium: a ⁴⁵Ca autoradiographic study*. *Brain Res.*, v. 624, p. 94-102, 1993.

FLEMING, J.C., NORENBURG, M.D., RAMSAY, D.A., DEKABAN, G.A., MARCILLO, A.E., SAENZ, A.D., STYLES, M., DIETRICH, W.D., WEAVER, L.C. *The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury*. *Brain*.129:3249–3269, 2006.

FLUEHMANN, G., DOHERR, M.G., JAGGY, A. et al. *Canine neurological diseases in a referral hospital population between 1989 and 2000 in Switzerland*. *J Small Anim Pract* 47:582–7, 2006.

FRAYN, K.N., *Regulation of fatty acid delivery in vivo*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 441, pp. 171–179, 1998.

FRUHBECK, G., GOMEZ-AMBROSI, J., MURUZ ABAL, et al. *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation*. *The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, vol. 280, no. 6, pp. E827–E847, 2001.

GAUR, S.; NEWCOMB, R.; RIVNAY, B. et al. *Calcium channel antagonist peptides define several components of transmitter release in the hippocampus*. *Neuropharmacol.*, v. 33, p. 1211-1219, 1994.

GOLDSHMIT, Y., KANNER, S., ZACS, M., et al. *Rapamycin increases neuronal survival, reduces inflammation and astrocyte proliferation after spinal cord injury* *Molecular and Cellular Neuroscience* 68 82–91; 2015.

- GRANGER, N., CARWARDINE, D. *Acute Spinal Cord Injury Tetraplegia and Paraplegia in Small Animals*. Vet Clin Small Anim 44 1131–1156; 2014.
- GREEN, D. *Apoptotic pathway: the roads to ruin*. Cell, v.94, p.695-698, 1998.
- GUNTER, T. E., GUNTER, K. K., SHEU, S.S. et al. *Mitochondrial calcium transport*. Am. J. Physiol. 267, C313-C339, 1994.
- HALL, E.D.; SPRINGER, J.E. *Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal*. NeuroRx: J. Am. Soc. Exp. NeuroTher., v.1, p.80-100, 2004.
- HALL, E.D., *Antioxidant therapies for acute spinal cord injury*. Neurotherapeutics 8, 152e167; 2011.
- HALL, E.D., WANG, J.A., BOSKEN, J.M. Et al. *Lipid Peroxidation in Brain or Spinal Cord Mitochondria After Injury*. J. Bioenerg Biomembr, 2015.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York. 4th edn, 2007 Aebi H, Catalase in vitro. Methods Enzymol, 105:121–126; 1984.
- HANSEBOUT, R.R. *Acute traumatic spinal cord injury* up to date 2016.
- HAPPEL, R.D.; SMITH, K.P.; BANIK, N.L. et al. *Ca²⁺ accumulation in experimental spinal cord trauma*. Brain Res., v. 211, p. 476-479, 1981.
- HILLARDY, D.R., MONJE, V.D., MINTZ, I.M., et al. *A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels*. Neuron 9:69-77; 1992.
- HOOPER, C.; BORGES, C.A.; LEMOS, R.C. et al. *Biochemical profiles of rats Wistar at Laboratory Animal Breeding Center*. In: International Congress on Laboratory Animal Science, 2007, São Paulo. International Congress on Laboratory Animal Science, 2007.
- HORN, K.P., BUSCH, S.A., HAWTHORNE, A.L., et al. *Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions*. Journal of Neuroscience.28:9330–9341, 2008.
- HULSEBOSCH, C.E. *Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury*. Adv. Physiol. Educ., v.26, n.1-4, p.238-255, 2002.
- 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.
- JEFFERY, N.D. *Vertebral fracture and luxation in small animals*. Vet Clin North Am Small Anim Pract 40:809–28; 2010.
- JEFFERY, N.D., LEVINE, J.M., OLBY, N.J. et al. *Intervertebral disk degeneration in dogs: consequences, diagnosis, treatment, and future directions*. J Vet Intern Med 27(6):1318–33, 2013.

KIGERL, K.A., GENSEL, J.C., ANKENY, D.P. et al. *Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord*. Journal of Neuroscience. 29:13435–13444, 2009.

KINNUNEN, P.K.J, KAARNIRANTA,K., MAHALKA, A.K. et al. *Protein oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations*. Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1818, no. 10, pp. 2446–2455, 2012.

KRAUS, K.H. *The pathophysiology of spinal cord injury and its clinical implications*. Sem. Vet. Med. Surg. (Small Anim.), v.11, n.4, p.201-207, 1996.

KRONER A, GREENHALGH, A.D., ZARRUK, J.G., et al. *TNF and Increased Intracellular Iron Alter Macrophage Polarization to a Detrimental M1 Phenotype in the Injured Spinal Cord*. Neuron. 83:1098–1116, 2014.

KWON, B.K., TETZLAFF, W. *Spinal cord regeneration: from gene to transplants*. Spine 26(24 suppl):S13–22; 2001.

KWON, B.K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J.N. . *Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury*. Spine J., v. 4, p. 451-464, 2004.

LANZ, O.; BERGMAN, R.; SHELL, L. *Initial assesment of patients with spinal cord trauma*. Vet. Med., p.851-854, 2000.

LEE, J.; YAN, P.; XIAO, Q. *Methylprednisolone Protects Oligodendrocytes But Not Neurons after Spinal Cord Injury*. The Journal of Neuroscience, p. 3141-3149, 2008.

LEE, J. *Pathophysiology, presentation and management of spinal cord injury* Orthopaedics II: Spine and pelvis 2015.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. *Therapeutic potencial of venom peptides*. Nat. Ver., v.2, 790-802, 2003.

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,H., DE WAARD, M., SCOTT,V.E.S.,et al. *Identification of Three Subunits of the High Affinity omega-Conotoxin MVIIC sensitive Ca²⁺ Channel* The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 23, Issue of June 7, pp. 13804–13810, 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. *Analysis of relative gene expression. Data using real time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta CT) method*. Methods, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOU, J., LENKE, L.G., LUDWIG, F.J., et al. *Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury* Spinal Cord 36, 683 ± 690; 1998.

LOZANO, J.S.G. *Efeito neuroprotetor da ômega-conotoxina MVIIC no trauma experimental da medula espinhal em ratos*. Dissertação (Mestrado em Medicina e Cirurgia Veterinárias) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

- LU, J.; ASHWELL, K.W.; WAITE, P. et al. *Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis*. *Spine*, v. 25, p. 1859-1866, 2000.
- MAJNO, G.; JORIS, I. *Apoptosis, oncosis, and necrosis – An overview of cell death*. *Am J Pathol*, v.169, n.1, p.3-15, 1995.
- MAROTO, R.; FUENTE, M. T.; ZAPAPTER, P. Et al. *Effects of ω -conotoxin MVIIC on veratridine-induced cytotoxicity and cytosolic Ca^{2+} oscillations*. *Brain Res.*, v. 714, p. 209-214, 1996.
- MARTIN, O., VLADIMIR, G., STEN, O., BORIS, Z. *Mitochondria, oxidative stress and cell death* *Apoptosis* ; 12:913–922, 2007.
- MASSEY, K.A., NICOLAOU, A. *Lipidomics of polyunsaturated fatty- acid-derived oxygenated metabolites*, *Biochemical Society Transactions*, vol. 39, no. 5, pp. 1240–1246, 2011.
- MASSEY, K.A., NICOLAOU, A. *Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids*, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 59, pp. 45–55, 2013.
- MATALIOTAKIS, G.I.; TSIRIKOS, A.I. *Orthopaedics and trauma* 30:5, 2016.
- MATSUSHITA, K.; WU, Y.; QIU, J. *Faz receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia*. *J. Neuroscience*, v. 20, p.6879-6887, 2000.
- MCDONALD, J.W., SADOWSKY, C. *Spinal cord injury*. *Lancet* 359(9304):417–25; 2002.
- MCDONOUGH, S.I., SWARTZ, K.J., MINTZ, I.M., et al. *Inhibition of Calcium Channels in Rat Central and Peripheral Neurons by ω -Conotoxin MVIIC*. *The Journal of Neuroscience*, April 15, 76(8):2612-2623, 1996.
- MESTRE, C.; PÉLISSIER, T.; FIALIP, J. et al. *A method to perform direct 116 transcutaneous intrathecal injection in rats*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 32, p. 197-200, 1994.
- MINAMI, K.; RAYMOND, C.; MARTIN-MOUTOT, N. et al. *Role of Thr11 in the binding of ω -conotoxin MVIIC to N-type Ca^{2+} channels*. *FEBS Let.*, v.491, p.127-130, 2001.
- MIHARA M.; UCHIYAMA M. *Determination of malon aldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test* *Analytical Biochemistry* Volume 86, Issue 1, May 271-278, 1978.
- MILJANICH, G.P., RAMACHADRAN, J. *Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 707–734; 1995.
- MOLDOVAN, L., MOLDOVAN, N.I. *Oxygen free radicals and redox biology of organelles, Histochemistry and Cell Biology*, vol. 122, no. 4, pp. 395–412, 2004.
- MORTAZAVI, M.M., VERMA, K., HARMON, O.A. *The microanatomy of spinal cord injury: a review*. *Clin Anat* ; 28: 27e36, 2015.

- NICHOLSON, D.W., THORNBERRY, N.A. *Caspases: killer proteases*. Trends Biochem Sci 22(8):299–306; 1997.
- NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. *The role of calcium in apoptosis*. Cell Calcium, v.23, n.2/3, p.173-180, 1998.
- OLBY, N. *The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs*. Vet Clin North Am Small Anim Pract 40:791–807, 2010.
- OLIVEIRA, K.M. *Efeitos de diferentes doses de ω – conotoxina MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo*. 61 p. Dissertação (Mestrado em Medicina e Cirurgia Veterinárias) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- OLIVEIRA, K. M. *ω -conotoxina MVIIA isolada ou associada ao dantrolene sódico no trauma medular agudo em ratos*. Tese (doutorado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- OLIVEIRA, K.M., SILVA, C.M., LAVOR, M.S.L., et al. *Systemic effects induced by intraleisional injection of ω -conotoxina MVIIC after spinal cord injury in rats*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis . 20: 15; 2014.
- 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 7(7):3524-3536; 2014.
- OLIVERA, B.M.; MILJANICH, G.P.; RAMACHANDRAN et al. *Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins*. Annu. Rev. Biochem., v.63, p.823-287, 1994.
- OLIVERA, B.M.; TEICHERT, R.W. et al. *Diversity of the neurotoxic conus peptides: a model for concerted pharmacological Discovery*. Mol. Interv., v.7, n.5, p.251-260, 2007.
- ORDONEZ, F.J., ROSETY, M.A., CAMACHO, A., ROSETY, I., et al. *Arm-cranking exercise reduced oxidative damage in adults with chronic spinal cord injury*. Arch. Phys. Med.Rehabil. 94, 2336e2341; 2013.
- 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.
- 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.
- PRYOR W.A. *On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples*. Free Radical Biology and Medicine, vol. 7, no. 2, pp. 177–178, 1989.
- QIN, L., LIU, Y., HONG, J.S., CREWS, F.T. et al. *NADPH oxidase and aging drivemicroglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration*. Glia 61, 855e868, 2013.

- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. et al. *Neuroprotection and peptide toxins*. Brain Res., v.45, p.125-141, 2004.
- ROWLAND, J.W.; HAWRYLUK, G.W.; KWON, B.; FEHLINGS, M.G. *Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon*. Neurosurg. Focus, v. 25, suppl. E2, p.1-17, 2008.
- 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.
- SATTLER, R., TYMIANSKI, M. *Molecular mechanisms of calciumdependent excitotoxicity* J. Mol. Med. 78 (2000) 3–13; 2000.
- SCHAUENSTEIN, E. *Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products*. Journal of Lipid Research, vol. 8, no. 5, pp. 417–428, 1967.
- SEKHON, L.H.; FEHLINGS, M.G. *Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury*. Spine (Phila Pa 1976) 26:S2; 2001.
- SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A.; ARIAS, M. V. B. *Fisiopatologia do trauma e da compressão à medula espinal de cães e gatos*. Med. Vet., v. 1, n. 2, p. 78-85, 2007.
- SHEN, G.S.; LAYER, R.T.; McCABE, R.T. *Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics*. DDT, v.5, n.3, p.98-105, 2000.
- SHI, R., BLIGHT, A.R. *Compression injury of mammalian spinal cord in vitro and the dynamics of action potential conduction failure*. Journal Neurophysiology ;76:1572–80 1996.
- SMITH, P.M., JEFFERY, N.D. *Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally occurring spinal cord injury*. Brain Pathology ;16:99–109 2006.
- SPRINGUER, J.E., AZBILL, R.D., KNAPP, P.E. *Activation of the caspase-3apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury*. Nat Med 5(8):943–6; 1999.
- STEIN, D.M., SHETH, K.N. *Management of acute spinal cord injury*. Continuum (Minneapolis) 21: 159e87; 2016.
- STRIPLING, T. *The cost of economic consequences of traumatic spinal cord injury*. Paraplegia News 8:50–4, 1990.
- SULLIVAN, P.G., RABCHEVSKY, A.G. , WALDMEIER, P.C., SPRINGER, J.E.. *Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death?* J. Neurosci. 79 231–239, 2005.
- SZYDŁOWSKAA, K., TYMIANSKIA, M. *Calcium, ischemia and excitotoxicity* Cell Calcium 47 122–129; 2010.

- THURET, S.; MOON, L.D.; GAGE, F.H. *Therapeutic interventions after spinal cord injury*. 2006.
- THRALL, M.A. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 518p, 2004.
- TYMIANSKI, M., TATOR, C.H. *Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury*. *Neurosurgery* 38 1176–1195; 1996.
- TSIEN, R.W., LIPSCOMBE, D., MADISON, D.V., BLEY, K.R., FOX, A.P. *Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation*. *Trends Neurosci.* 11, 431–438; 1988.
- TSIEN, R.W., ELLINOR, P.T., HORNE, W.A. *Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels*. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 349–354; 1991.
- TURNER, T. J., DUNLAP, K. . *Neuropharmacology* **34**, 1469–1478, 1995.
- UCHITEL, O.D. *Toxins affecting calcium channels in neurons*. *Toxicol.*, v.35, p.1161-1191, 1997.
- VANCE, E., VANCE, J.E. *Biochemistry: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition. 18 Oxidative Medicine and Cellular Longevity; 2002.
- VAISHNAV, R.A., SINGH, I.N., MILLER, D.M., HALL, E.D. *Lipid peroxidation-derived reactive aldehydes directly and differentially impair spinal cord and brain mitochondrial function*. *Journal Neurotrauma*.27(7):1311–1320; 2010.
- VOLINSKY, R., KINNUNEN, P.K.J. *Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology*, *FEBS Journal*, vol. 280, no. 12, pp. 2806–2816, 2013.
- WHEELER, D.B., RANDALL, A., TSIEN, R.W. *Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission*. *Science* 264: 107-111; 1994.
- WINTER, B., PATTANI, H. *Spinal cord injury* *Anaesthesia and intensive care medicine* 12:9 2011.
- WRIGHT, C.E.; ANGUS, J. *Effects of N-, P- and Q-type neuronal calcium channel antagonists on 604 mammalian peripheral neurotransmission*. *Br. J. Pharmacol.*, v. 119, p. 49-56, 1999.
- WU, Y.; ZHENG, M.; WANG, S. *Spatiotemporal pattern of TRAF3 expression after rat spinal cord injury*. *J. Mol. Hist.*, 2014.
- YOUNG, W.; YEN, V.; BLIGHT, A. *Extracellular calcium ionic activity in experimental spinal cord contusion*. *Brain Res.* , v. 253, p. 105-113, 1982.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F. et al. *Statistical analysis of real-time PCR data*. *B. M. C. Bioinformatics*, v. 7, 2006. < <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/85>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

ZHANG, B., BAILEY, W.M., BRAUN, K.J., GENSEL, J.C. *Age decreases macrophage IL-10 expression: Implications for functional recovery and tissue repair in spinal cord injury*. *Exp Neurol*. 273:83–91, 2015a.

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

ZWIMPFER, T.J., BERNSTEIN, M. *Spinal cord concussion*. *Journal of Neurosurgery* 72(6):894–900, 1990.

ANEXO 1



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 105/2017
Título do projeto: Ômega conotoxina MVIIC no tratamento do trauma medular agudo em ratos
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Eliane Goncalves de Melo
Unidade: Escola de Veterinária
Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 03/07/2017. Validade: 03/07/2017 à 02/07/2022
Belo Horizonte, 03/07/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br