

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

**ÔMEGA-CONOTOXINA MVIIC E/OU DANTROLENE NO
TRAUMA MEDULAR AGUDO DE RATOS**

FLAVIANI EMÍLIA DOS SANTOS

BELO HORIZONTE - MG

2019

FLAVIANI EMÍLIA DOS SANTOS

**ÔMEGA-CONOTOXINA MVIIC E/OU DANTROLENE NO
TRAUMA MEDULAR AGUDO DE RATOS**

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

Área de concentração: Clínica e Cirurgia
Veterinárias

Orientadora: Prof^ª Dra. Eliane Gonçalves de
Melo

BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG

2019

S237o Santos, Flaviani Emília dos, 1983-
Ômega-conotoxina MVIIC e/ou dantrolene no trauma medular agudo de ratos / Flaviani
Emília dos Santos. – 2019.
73 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. Lesão medular – Teses. 3. Traumatismos da medula espinhal – Teses. 4. Medicamentos – Administração – 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

FLAVIANI EMÍLIA DOS SANTOS

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 12 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Eliane Gonçalves de Melo

Prof^a. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador

V. F. F.

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

Benito Soto Blanco

Prof. Benito Soto Blanco
Escola de Veterinária - UFMG

Rubens Antonio Carneiro

Prof. Rubens Antonio Carneiro
Escola de Veterinária - UFMG



“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho a meus queridos pais Irene e Alemiro,
exemplos de amor e bondade, que sempre contribuíram
com meu crescimento pessoal e profissional

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir finalizar uma etapa tão importante na minha vida e por me mostrar a cada dia que estou no caminho certo.

A minha família maravilhosa, pai, mãe, Vinícius, Viviani e Fabiano, por se mostrarem presentes mesmo de longe e compreenderem as ausências em encontros de família.

A meu marido Dilson, companheiro incomparável, meu porto seguro. Sempre amoroso e paciente, me ajudando a vencer todas as etapas do caminho, tornando mais leve os finais de semana de estudo e experimentação.

A minha querida orientadora Eliane Gonçalves de Melo, por me dar a oportunidade de participar de sua equipe, por todos os ensinamentos e orientações e por também ser amiga nos momentos de dificuldade, que possamos caminhar juntas por muito tempo.

A toda a equipe de orientados e alunos de iniciação científica da Professora Eliane. Talita, uma grande amiga que ganhei no mestrado para a vida toda, agradeço por tudo o que fizemos juntas, todos os momentos felizes e todas as dificuldades que passamos, fico feliz que ainda temos uma longa jornada juntas. Maria Paula, meu exemplo de determinação, agradeço por todos os ensinamentos, pela grande ajuda em toda a fase experimental e por todos os conselhos. Paula Mayer, minha amiga e companheira de trabalho no hospital, obrigada pela ajuda na condução dos casos clínicos com toda a sua experiência e conhecimento. Carla Osório, uma pessoa admirável, obrigada por todo o empenho e disposição para a realização das cirurgias e por partilhar toda a sua experiência. Ao Pablo, agradeço por toda a ajuda nos casos do hospital, ao Sebastian e ao Sandro pelo auxílio na fase experimental. Aos alunos Andrine, João e Daniel, agradeço pela colaboração e comprometimento no manejo e cuidado dos animais.

A todos os profissionais do IEP-Santa Casa, muita gratidão pela ajuda e suporte para realização de parte do projeto, em especial Professor Marcus Vinícius Gomez, pela parceria, por nos receber em seu laboratório e por fornecer a conotoxina. A Professora Karla e ao doutorando Cláudio, muito obrigada.

A Empresa Cristália por acreditar na nossa linha de pesquisa, pela colaboração no projeto e pela doação do medicamento Dantrolene.

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFMG, em especial ao Professor Paulo Ricardo, por permitir realizar parte das análises no laboratório e a residente Jéssica, pela ajuda na execução dos exames laboratoriais.

A Professora Érica do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal II, pela parceria e ensinamentos nas análises de PCR.

A Professora Joana do Departamento de Zootecnia, por toda a ajuda e ensinamentos com a estatística do estudo.

A todos os companheiros de trabalho do Hospital Veterinário da UFMG, agradeço pelo companheirismo, convivência diária, momentos de descontração, conselhos e pelo apoio. Ao pessoal da limpeza, recepção, tesouraria, portaria, central de exames, telefonia, esterilização e enfermagem, obrigada pelo apoio e amizade.

Aos Professores Benito Soto Blanco, Vitor Márcio Ribeiro e Rubens Antônio Carneiro, constituintes da banca examinadora, agradeço por terem aceitado o convite e por contribuírem para a avaliação do trabalho.

A Maria Adelaide do Biotério da Farmácia, pela disponibilidade e ajuda na aquisição dos animais.

A todos os meus amigos que me acompanharam, agradeço pelo apoio, incentivo e pela compreensão por não ter participado de muitos encontros.

Aos animais, fonte de estudo e inspiração para nossa vida profissional. Em especial, os animais utilizados nessa pesquisa, os pacientes do hospital veterinário, Emília, Rabicó, Dama, Dudu e Pitoco. Que nossas pesquisas possam ajudá-los cada vez mais.

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT.....	17
1 - INTRODUÇÃO.....	18
2 - REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 - Fisiopatia do trauma medular agudo	19
2.2 - Lesão medular primária:	19
2.3 - Lesão medular secundária:.....	20
2.3.1 - Alterações vasculares.....	21
2.3.2 - Excitotoxicidade e distúrbios	21
2.3.3 - Acúmulo de cálcio intracelular	22
2.3.4 - Radicais livres e peroxidação lipídica.....	23
2.3.5 - Respostas inflamatória e imunológica	23
2.3.6 - Morte celular: apoptose e necrose.....	24
2.3.6.1 - Caspases como iniciadoras e efetoras da apoptose	25
2.3.6.2 - Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	26
2.3.6.3 - Proteínas da família Bcl-2.....	26
2.4 - Bloqueadores de canais de cálcio como agentes neuroprotetores.....	27
2.4.1 - Ômega conotoxina MVIIC	27
2.4.2 - Dantrolene sódico	29
2.5 - Teste comportamental para avaliação neurológica em ratos.....	29
3 - MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 - Animais	32
3.2 - Grupos Experimentais.....	32
3.3 - A toxina.....	32
3.4 - O dantrolene sódico	32
3.5 - Procedimentos anestésico e cirúrgico	34
3.6 - Trauma medular compressivo.....	34
3.7 - Pós-operatório	37
3.8 - Tratamentos	38
3.8.1 - Aplicação intratecal	38
3.8.2 - Aplicação intraperitoneal	38
3.9 - Avaliação da capacidade motora em campo aberto:	40
3.10 - Eutanásia.....	40

3.11 - Coleta de materiais:.....	40
3.12 - Análises laboratoriais.....	42
3.12.1 - Avaliação hematológica.....	42
3.12.2 - Avaliação de bioquímica plasmática.....	42
3.12.3 - Quantificação de EROs por ensaio fluorimétrico DCF-DA	43
3.12.4 - Avaliação da peroxidação lipídica por método TBARS	43
3.12.5 - Avaliação da expressão gênica de Bax, caspase-3, caspase-8 e caspase-9 por qRT-PCR em tempo real	44
3.12.5.1 - Extração do RNA.....	45
3.12.5.2 - Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real	45
4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 - Modelo experimental de trauma medular agudo.....	46
5.2 - Tratamentos	47
5.3 - Avaliação da função motora em campo aberto.....	48
5.4 - Avaliação hematológica.....	51
5.5 - Avaliação bioquímica	51
5.6 - Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	54
5.7 - Peroxidação lipídica.....	55
5.8 - Expressão de fatores relacionados à apoptose	57
6 - CONCLUSÃO.....	60
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8 - ANEXO.....	73

LISTA DE ABREVIACÕES

AIF - Apoptosis Inducing Factor
ANOVA - análise de variância
ALT - alanina aminotransferase
AST - aspartato aminotransferase
ATP - adenosina trifosfato
Bak - Bcl-2 Associated Killer
Bax - Bcl-2 Associated x protein
BBB - Basso, Beattie e Bresnahan
Bcl-2 - B-cell lymphoma protein 2
Bcl-xl - B-cell lymphoma-extra large
BH3 - B cell Homolog 3
BID - BH3 Interactin Death Domain
CCVD - canais de cálcio voltagem dependentes
cDNA - DNA complementar
CEUA - comissão de ética no uso de animais
cm - centímetro
CN - grupo controle negativo
CP - grupo controle positivo
CT - threshold
D - grupo que recebeu aplicação de dantrolene
DCF-DA - diclorofluoresceína-diacetato
DNA - ácido desoxirribonucléico
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs - espécies reativas de oxigênio
EV - Escola de Veterinária
FA - fosfatase alcalina
Fas - First Apoptosis Signal
FC - fold change
Fig.- figura
Hz - hertz
IEP - Instituto de Ensino e Pesquisa
i.p. - intraperitoneal
i.t. - intratecal
mm - milímetros
ml - mililitros
MASCIS - Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
MDA - malondialdeído
MPs - membros pélvicos
MVIIC - ω -conotoxina MVIIC
NaCl - cloreto de sódio
nM - nanomolar
NMDA - N-metil-D-aspartato
PBS - Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato-salino)
pH - potencial hidrogeniônico

pmol - picomol
qRT-PCR - reação quantitativa em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
RE - retículo endoplasmático
RNA - ácido ribonucléico
rTNF - receptores de necrose tumoral
RZR - receptor rianodínico
SMAC - Second Mitochondrial Activador of Caspases
SNC - sistema nervoso central
T - grupo que recebeu aplicação de 20 pmol de ω -conotoxina MVIIC
Tab. - tabela
T12 - segmento vertebral torácico número 12
T+D - grupo que recebeu aplicação de 20 pml de ω -conotoxina MVIIC + dantrolene
TBA - ácido tiobarbitúrico
TMA - trauma medular agudo
TUNEL - Terminal Deoxinucleotidiltransferase Uracil Nick End Labeling
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
x g - vezes a força gravitacional da Terra
 ω - ômega
 μ g - micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático do desenvolvimento da lesão secundária após contusão da medula espinhal. Imediatamente após o trauma, a região de impacto da substância cinzenta apresenta hemorragia e elementos vasculares escapam para o parênquima medular. A substância branca circundante e a cinzenta rostral e caudal à região de impacto podem parecer notavelmente intactas. No entanto, ao longo de um período de minutos a horas, a lesão se espalha centripetamente, iniciando a indução de morte celular por necrose e apoptose. Neurônios apoptóticos nas margens da lesão induzem a ativação da micróglia e apoptose de oligodendrócitos em áreas com axônios degenerados (Adaptado de Beattie, 2004)

Figura 2: Fotografia do caramujo marinho *Conus magus*. Encontrado nas regiões do oceano Índico e Pacífico, o *Conus magus* sintetiza a toxina com uma mistura complexa de conopeptídeos para paralisar sua presa rapidamente. Foto de Jeanette e Scott Johnson (Hannon e Atchison, 2013)

Figura 3: Fotografia do delineamento experimental. Vinte animais distribuídos aleatoriamente, acondicionados em caixas plásticas de dimensões de 17 cm x 41 cm x 33 cm, forradas com maravalha, com dois ratos por caixa, no Biotério do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG

Figura 4: Fotografias do procedimento anestésico e da antissepsia cirúrgica. **A)** Indução anestésica em câmara com isoflurano. **B)** Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa aquecida com bolsa térmica. **C)** Realização de antissepsia em região dorsal do tronco tricotomizada com solução digliconato de clorexidina 2% e digliconato de clorexidina 0,5% solução alcoólica. Manutenção anestésica por meio de máscara com isoflurano em sistema semiaberto

Figura 5: Fotografias do procedimento cirúrgico de laminectomia em T12 em ratos *Wistar*. **A)** Incisão cutânea e subcutânea na linha média dorsal. **B)** Afastamento da musculatura epaxial e identificação dos processos espinhosos. **C)** Desgaste da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico. **D)** Aproximação dos músculos, redução do espaço morto e dermorrafia com sutura padrão simples contínuo com fio inabsorvível sintético *nylon 3-0*

Figura 6: Fotografias da realização do trauma medular compressivo com o aparelho MASCIS *Impactor*. **A)** Posicionamento do animal após laminectomia em T12 e utilização do sistema de estabilização vertebral “*clamping system*”. **B)** Dispositivo conectado ao *Software Impactor 7.0* no computador para padronização do trauma. **C)** Haste de impacto do aparelho tocando a medula na região de laminectomia dorsal após queda a 25 mm de altura

Figura 7: Fotografias da recuperação anestésica e dos tratamentos. **A)** Animal mantido em caixa com oxigenioterapia e aquecida com colchão térmico até completa recuperação anestésica. **B)** Aplicação intratecal de 20 pmol de ω -conotoxina MVIIC realizada por meio de punção do espaço subaracnóide entre a quinta e sexta vértebras lombares por seringa de Hamilton 701LT acoplada a agulha 26G. **C)** Aplicação intraperitoneal de dantrolene sódico com agulha 25x7 mm acoplada em seringa 10 ml, introduzida no quadrante inferior direito do abdômen. **D)** Seringa de Hamilton 701LT volume total 10 μ L

Figura 8: Fotografias da avaliação da capacidade motora de ratos *Wistar* em campo aberto para classificação da deambulação em escores baseado na escala BBB. **A)** Animal um dia antes da intervenção cirúrgica, classificado no escore 21, com sustentação de peso nos quatro membros e cauda elevada. **B)** Animal do controle negativo um dia após o procedimento cirúrgico de laminectomia, sem trauma medular, classificado no escore 21, com sustentação de peso sobre os membros pélvicos. **C e D)** Animais do grupo controle positivo após trauma medular agudo compressivo, apresentando paraplegia e cauda baixa tocando o solo, classificados em escore zero

Figura 9: Valores das medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 10: Valores das medianas de hemácias, hematócrito, hemoglobina e CHGM e valores médios e desvios padrão dos leucócitos e plaquetas de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 11: Valores médios e desvios padrão de ureia e creatinina de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 12: Valores médios e desvios padrão dos valores de FA, AST, ALT, proteínas totais e albumina de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 13: Valores médios e desvios padrão da variação dos níveis de EROs de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 14: Valores médios e desvios padrão dos níveis de malondialdeído (MDA) resultantes da peroxidação lipídica de membranas celulares de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 15: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa de caspase 3, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 16: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa de caspase 8, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 17: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa de caspase 9, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

Figura 18: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa da proteína pro-apoptótica Bax, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escala de classificação e características locomotoras dos membros pélvicos (MPs) segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da função motora de ratos após trauma medular agudo.

Quadro 2 - Distribuição dos ratos nos cinco grupos experimentais e protocolos de tratamento.

Quadro 3 - Genes e sequências de nucleotídeos dos *primers* iniciadores para qRT-PCR em tempo real.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das medianas e (rank) do escore BBB de deambulação em campo aberto dos sete dias de avaliação, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação.

Tabela 2 - Valores das medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, aos sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação.

RESUMO

O trauma medular agudo (TMA) ocasiona danos aos tecidos neuronais por mecanismos primários e secundários. A hiperconcentração intracelular de íons cálcio é um elemento chave no desenvolvimento da lesão secundária e ocorre por diversos mecanismos, dentre eles, influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes presentes na membrana celular e por mobilização de reservas intracelulares localizadas no retículo endoplasmático. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito neuroprotetor da associação de bloqueadores de canais de cálcio, a ω -conotoxina MVIIC e o dantrolene, em ratos submetidos ao TMA. Vinte ratos machos adultos, linhagem *Wistar*, foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: CN (controle negativo), CP (controle positivo), T (ω -conotoxina MVIIC), D (dantrolene) e T+D (ω -conotoxina MVIIC + dantrolene). Os animais do grupo CN foram submetidos à laminectomia em T12 e injeção de PBS por via intratecal (i.t.). Os demais grupos foram submetidos à laminectomia em T12 e trauma medular compressivo com a queda da haste de 10 gramas a uma altura de 25 mm no sistema indutor de trauma espinhal MASCIS *Impactor*. O grupo CP recebeu injeção de PBS por via i.t., o grupo T recebeu 20 pmol/10 μ L de ω -conotoxina MVIIC por via i.t., o grupo D recebeu 10 mg/kg de dantrolene por via intraperitoneal (i.p) e o grupo T+D recebeu 20 pmol/10 μ L de ω -conotoxina MVIIC por via i.t. e 10 mg/kg de dantrolene por via i.p. Os animais foram submetidos à avaliação clínica durante os sete dias subsequentes ao trauma, para observação da função motora em campo aberto e classificação conforme escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan, 1995. Oito dias após o tratamento, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de sangue para avaliações hematológica e bioquímica plasmática, e de segmentos da medula espinhal para quantificação de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e avaliação da expressão gênica de fatores relacionados à apoptose (Bax, caspase 3, 8 e 9). Observou-se que apenas o grupo D mostrou recuperação motora significativa após os sete dias de avaliação pelo teste BBB ($p < 0,05$). Os valores dos perfis hematológico e bioquímico se mantiveram dentro dos limites fisiológicos em todos os grupos, com exceção dos valores de ureia que se apresentaram mais elevados. Não houve diferença significativa entre os grupos nas análises de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e expressão gênica de fatores relacionados à apoptose. Conclui-se que o dantrolene promoveu recuperação motora e sua associação com a MVIIC não apresentou efeito sinérgico no tratamento do TMA.

Palavras chave: Lesão medular, *Conus magus*, influxo de cálcio, espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, apoptose.

ABSTRACT

Acute spinal cord injury causes damage to the nervous tissue by primary and secondary mechanisms. Excessive intracellular calcium concentration is a key element to the development of secondary injury. It occurs by several mechanisms: influx of calcium through membrane voltage-gated calcium channels and mobilization of intracellular reserves from the endoplasmic reticulum. The purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effect of the association of calcium channel blockers, ω -conotoxin MVIIC and dantrolene, on experimental acute spinal cord injury. Twenty male Wistar rats were randomly distributed into five groups: CN (negative control), CP (positive control), T (ω -conotoxina MVIIC), D (dantrolene) and T+D (ω -conotoxina MVIIC + dantrolene). Animals of the CN group underwent T12 laminectomy and intrathecal PBS injection. The other groups underwent T12 laminectomy and compressive spinal trauma due to a 10 gram stem drop from the height of 25 mm at the MASCIS Impactor spinal trauma induction system. The CP group received intrathecal PBS injection, the T group received intrathecal 20 pmol/10 μ l of ω -conotoxin MVIIC, group D received 10 mg/kg dantrolene intraperitoneally and the T + D group received 20 pmol/10 μ L of ω -conotoxin MVIIC intrathecally and 10 mg/kg dantrolene intraperitoneally. Neurological examination was performed daily for seven days and consisted with Basso, Beattie, Bresnahan test for the evaluation of motor function. Eight days after treatment, the animals were euthanized and the blood samples were collected for hematological and biochemistry analysis, and spinal cords samples were collected for quantification of reactive oxygen species, lipid peroxidation and the evaluation of the gene expression of factors related to apoptosis (Bax, caspase 3, 8 and 9). It was observed that only group D improved motor function with significant difference after seven days evaluation by BBB test ($p < 0,05$). Values for hematological and biochemistry profiles were within the reference intervals in all groups, with the exception of urea values that were higher in all animals. There was no statistical difference between the values of quantification of reactive oxygen species, lipid peroxidation and gene expression of related factors to apoptosis. It was conclude that dantrolene promoted motor recovery. There was not effect of pharmacological addition on the association MVIIC and dantrolene.

Key words: Spinal cord injury, *Conus magus*, calcium influx, reactive oxygen species, lipid peroxidation, apoptosis.

1 - INTRODUÇÃO

O trauma medular agudo (TMA), na medicina humana, ocorre com uma incidência anual de 54 casos por milhão de habitantes nos Estados Unidos e é responsável por alto índice de morbidade e mortalidade (NSCISC, 2018). As causas mais comuns são acidentes com veículos motorizados, acidentes de trabalho ou durante atividades recreativas e esportivas (Sekhon e Fehlings, 2001). As consequências para o indivíduo afetado podem ser drásticas, assim como para a sua família, interferindo de forma importante na qualidade de vida dos envolvidos, além de expressivos custos com hospitalização, reabilitação e assistência psicológica aos pacientes (Dumont *et al.*, 2001, Sekhon e Fehlings, 2001; Rowland *et al.*, 2008; Fehlings e Nguyen, 2010; Oyinbo, 2011).

Na prática clínica de pequenos animais, o TMA é um dos problemas neurológicos mais comuns, porém sua real incidência ainda não está bem documentada (Olby, 2010). Pode causar déficits neurológicos graves e permanentes e determinar a morte ou a eutanásia do animal. Em cães e gatos, as causas exógenas mais comuns de trauma medular são acidentes por veículos motorizados, brigas entre animais e quedas. Lesões de origem endógena geralmente decorrem de hérnia de disco intervertebral, fraturas vertebrais patológicas, anormalidade e instabilidade vertebral congênita (Arias, Severo e Tudury, 2007; Olby, 2010; Fletcher, Dewey e Da Costa, 2017).

A lesão no sistema nervoso resultante do trauma pode ser dividida em primária e secundária. A lesão primária acontece no momento do evento traumático devido às forças que causam a injúria física à medula espinhal (Dumont *et al.*, 2001; Arias, Severo e Tudury, 2007). A lesão secundária é deflagrada pela lesão primária, envolve anormalidades vasculares, vários processos bioquímicos e reações inflamatórias que perpetuam o dano à medula espinhal por horas a dias após o trauma, podendo provocar danos irreversíveis ao parênquima neuronal (Kwon *et al.*, 2004; Arias, Severo e Tudury, 2007; Fletcher, Dewey e Da Costa, 2017).

Ao contrário do que ocorre na lesão primária, os mecanismos da lesão secundária são passíveis de intervenções terapêuticas e muitas pesquisas em espécies animais, incluindo primatas (Krassioukov *et al.*, 2002), ratos (Casha, Yu e Fehlings, 2001; Costa, 2010; Torres *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011; Fukushima, 2012; Lavor, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Rosado *et al.*, 2014; Coelho, 2016; Azevedo, 2018; Silva *et al.*, 2018) e coelhos (Aslan *et al.*, 2009) têm sido usadas como modelo de estudo da fisiopatogenia do trauma medular e para avaliação de tratamentos, apontando resultados promissores.

Hiperconcentração intracelular de íons cálcio é elemento chave no mecanismo da lesão secundária e alvo de muitos estudos na experimentação animal com a utilização de estratégias terapêuticas que bloqueiam os canais de cálcio com o intuito de reduzir os danos axonais e morte de neurônios (Aslan *et al.*, 2009; Costa, 2010; Torres, *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2014; Rosado *et al.*, 2014; Torres, 2014; Coelho, 2016; Azevedo, 2018).

Nesse contexto, a ômega (ω) - conotoxina, bloqueadora específica de canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD), produzida por caramujos marinhos, do gênero *Conus* (Olivera *et al.*, 1985; Hillyard, 1992; Liu *et al.*, 1996; McDonough *et al.*, 1996; Olivera e Teichert, 2007; Mir *et al.*, 2016), mostra-se promissora no desenvolvimento de terapias para o trauma medular (Oliveira *et al.*,

2014; Oliveira *et al.*, 2016; Azevedo, 2018) e outras desordens neurológicas como dor neuropática (Bingham, Mitsunaga e Bergeron, 2010; De Souza *et al.*, 2012; Hannon e Atchison, 2013).

Outro composto, o dantrolene sódico, tem sido usado em vários estudos de terapia do TMA, em doses, vias e momentos de aplicação diferentes, com efeitos neuroprotetores potenciais em função da diminuição dos danos secundários (Aslan *et al.*, 2009; Costa, 2010; Torres, *et al.*, 2010; Torres, 2014; Martins *et al.*, 2018). O dantrolene bloqueia a liberação de cálcio do retículo endoplasmático pela inibição de receptores de rianodina (RYR), presentes na membrana dessa organela, e acredita-se que tal fármaco possa proteger neurônios do acúmulo de cálcio intracitoplasmático (Frandsen e Schousboe, 1991; Krause *et al.*, 2004; Costa, 2010; Torres, *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011).

A compreensão da fisiopatogenia do TMA e dos mecanismos das lesões secundárias é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas neuroprotetoras. A continuidade dos estudos já desenvolvidos, utilizando vários tipos de fármacos, toxinas e suas associações podem futuramente permitir o desenvolvimento de planos terapêuticos adequados que consigam controlar a destruição progressiva do sistema nervoso central (SNC) e atenuar lesões em curso, evitando danos irreversíveis e incapacidade permanente de vítimas do trauma medular.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos neuroprotetores da aplicação intratecal (i.t.) de 20 pmol/10 μ L da ω -conotoxina MVIIC e de 10mg/kg de dantrolene por via intraperitoneal (i.p.), de forma isolada e em associação, após o TMA experimental em ratos. Os objetivos específicos foram avaliação da recuperação motora por meio da observação diária dos animais em campo aberto, quantificação de espécies reativas de oxigênio, da peroxidação lipídica e da expressão gênica de fatores relacionados a apoptose em tecido medular. Os efeitos sistêmicos dos fármacos foram avaliados por meio de testes hematológicos e bioquímicos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Fisiopagenia do trauma medular agudo

A lesão aguda da medula espinhal envolve injúria mecânica direta no local do trauma que inicia uma sequência de eventos vasculares, celulares, inflamatórios e bioquímicos levando ao desenvolvimento de lesões teciduais progressivas e aumentando a extensão da lesão inicial (Fig.1) (Beattie; Farooqui e Bresnahan, 2000). A fisiopatogenia do TMA é dividida em dois componentes principais: lesão primária e lesão secundária (Kwon *et al.*, 2004; Rowland *et al.*, 2008; Olby, 2010; Park, White e Tieber, 2012).

2.2 - Lesão medular primária:

Lesão primária ocorre como resultado direto do traumatismo à medula espinhal e envolve a ruptura e o esmagamento de elementos neuronais, vasculares, membranas celulares e estruturas de suporte,

resultando em interrupção morfofisiológica imediata dos impulsos nervosos (Coughlan, 1993; Rowland *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2009; Webb, Ngan e Fowler, 2010).

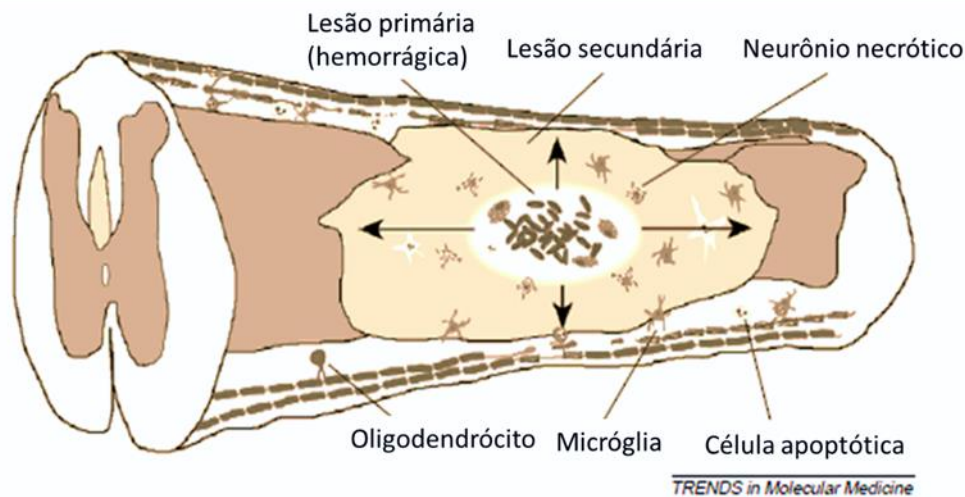


Figura 1 - Desenho esquemático do desenvolvimento da lesão secundária após contusão da medula espinhal. Imediatamente após o trauma, a região de impacto da substância cinzenta apresenta hemorragia e elementos vasculares escapam para o parênquima medular. A substância branca circundante e a cinzenta rostral e caudal à região de impacto podem parecer notavelmente intactas. No entanto, ao longo de um período de minutos a horas, a lesão se espalha centripetamente, iniciando a indução de morte celular por necrose e apoptose. Neurônios apoptóticos nas margens da lesão induzem a ativação da micróglia e apoptose de oligodendrócitos em áreas com axônios degenerados (Adaptado de Beattie, 2004).

As principais forças mecânicas envolvidas nas lesões traumáticas são compressão, contusão, cisalhamento e laceração. As lesões por compressão e contusão são as mais frequentes e ocorrem na maioria das vezes por herniações discais, fraturas e luxações vertebrais (Baptiste e Fehling, 2006; Kube e Olby, 2008; Rowland *et al.*, 2008; Olby, 2010; Fletcher, Dewey e Da Costa, 2017).

Em casos de fraturas vertebrais, o trauma pode ocasionar transecção completa da medula espinhal com efeitos devastadores (Olby, 2010). No entanto, após hérnias de disco, as meninges geralmente permanecem intactas e caso sofram lesões completas, os axônios subapicais podem ser poupados, embora frequentemente sofram desmielinização e disfunção (Smith e Jeffery; 2006). Esses axônios fisiologicamente com disfunção, porém anatomicamente viáveis, são o foco de atenção para o desenvolvimento de novas terapias em pacientes cronicamente afetados (Olby *et al.*, 2008).

2.3 - Lesão medular secundária:

Lesão secundária inicia imediatamente após o dano primário e se estende por vários dias, perpetuando a lesão à medula espinhal. Uma série de eventos secundários que expandem a zona de destruição tecidual incluem hemorragia e destruição do leito microvascular, isquemia, mudanças rápidas na concentração intracelular de íons, excitotoxicidade, produção de radicais livres e

inflamação (Beattie, 2004). Enquanto os déficits neurológicos se apresentam imediatamente após a lesão primária, um período prolongado de destruição tecidual se perpetua durante a fase secundária do trauma medular (Rowland *et al.*, 2008) e a apoptose pode ser considerada o ponto final desses eventos destrutivos que ocorrem de forma simultânea (Rowland *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2009; Olby, 2010).

2.3.1 - Alterações vasculares

Traumas medulares graves podem produzir efeitos sistêmicos sobre a pressão sanguínea causando hipertensão seguida de hipotensão e diminuição do débito cardíaco após alguns minutos (Tator e Fehlings, 1991; Park, White e Tieber, 2012). Em circunstâncias normais, a medula espinhal apresenta um sistema de autorregulação intrínseco que mantém a sua perfusão independente de alterações da pressão arterial sistêmica (Fletcher, Dewey e Da Costa, 2017). O trauma ao parênquima medular e em sua microvasculatura causa perda dessa função autoreguladora, comprometendo a capacidade da medula espinhal em manter seu fluxo sanguíneo e exacerbando a lesão isquêmica iniciada pela lesão primária (Tator e Fehlings, 1991; Olby, 2010; Park, White e Tieber, 2012).

Lesão mecânica dos vasos sanguíneos causa hemorragia, acentuada redução da microcirculação nas substâncias branca e cinzenta medulares e consequente isquemia, sendo considerada um dos aspectos mais importantes da lesão secundária (Tator e Fehlings, 1991; Kwon *et al.*, 2004). Além disso, os produtos da degradação da hemoglobina são tóxicos para os neurônios e o efeito massa da hemorragia aumenta ainda mais a pressão intersticial e diminui a perfusão da região (Kwon *et al.*, 2004; Olby, 2010).

O edema e a hemorragia no local pode se espalhar rostral e caudalmente a partir do sítio primário. A hemorragia é mais evidente na substância cinzenta da medula espinhal devido à grande vascularização local e, os altos requisitos metabólicos dos neurônios tornam a substância cinzenta extremamente sensível à lesão isquêmica. Danos endoteliais levam ao aumento da permeabilidade e edema intracelular, fator chave para o recrutamento de células inflamatórias (Kwon *et al.*, 2004; Mataliotakis e Tsirikos, 2016).

Diminuição progressiva da perfusão medular decorre também de danos induzidos por radicais livres às membranas das células endoteliais, liberação de mediadores inflamatórios e consequente vasoespasmo, além de formação de edema vasogênico e citotóxico, os quais resultam em aumento da pressão intersticial (Tator e Fehlings, 1991).

2.3.2 - Excitotoxicidade e distúrbios

Excitotoxicidade refere-se à capacidade do glutamato ou aminoácidos excitatórios promoverem a morte de neurônios do SNC sob certas condições. Esse fenômeno possui especificidade celular e na maioria dos casos é mediada por receptores glutaminérgicos (Choi, 1992).

O glutamato e o aspartato, principais neurotransmissores excitatórios do SNC, são encontrados em concentrações elevadas e tóxicas no parênquima medular após o trauma em função do extravasamento a partir dos neurônios lesionados e do declínio da sua depuração pelos astrócitos isquêmicos ao redor da lesão (Park, Velumian e Fehlings, 2004; Olby, 2010; Fletcher, Dewey e Da Costa, 2017).

O excesso de glutamato no meio extracelular ocasiona a superestimulação dos receptores ionotrópicos N-metil D-aspartato (NMDA), presentes nas membranas de neurônios e de oligodendrócitos. Inicia-se uma cascata de eventos a partir da abertura dos canais iônicos, com influxo de íons sódio e cálcio, desequilíbrio iônico e aumento intracelular desses íons em níveis supra-fisiológicos. Altos níveis de cálcio intracelular desempenham importante papel nos eventos de destruição tecidual subsequentes devido à ativação de fosfolipases, lipoxigenases, proteases, endonucleases e outras enzimas, ocorrendo a quebra de lipídeos e proteínas, alteração do metabolismo e morte celular (Lu, Ashwell e Waite, 2000; Kwon, *et al.*, 2004; Fletcher, Dewey e Da Costa, 2017). O aumento dos níveis de sódio ativa fosfolipases, promove acidez intracelular, edema citotóxico, aumento do edema na região e piora da perfusão (Schwartz e Fehlings, 2002; Park, Velumian e Fehlings, 2004).

O aumento do potássio extracelular resulta em excessiva despolarização dos neurônios e prejuízo na condução neuronal (Dumont *et al.*; 2001). Outro distúrbio eletrolítico é a depleção de magnésio, a qual pode ter efeito deletério sobre processos metabólicos como glicólise, fosforilação oxidativa e síntese de proteínas, bem como afetar certas reações enzimáticas em que o magnésio serve como cofator, além de contribuir para o acúmulo de cálcio intracelular (Vink *et al.*, 1987; Dumont *et al.*, 2001).

2.3.3 - Acúmulo de cálcio intracelular

O aumento da concentração de cálcio intracelular após o TMA ocorre por diversos mecanismos, dentre eles, ativação dos receptores NMDA por neurotransmissores excitatórios, ativação dos canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD) desencadeada pela despolarização da membrana e também mobilização de reservas intracelulares do retículo endoplasmático. Níveis intracelulares elevados de cálcio contribuem com a progressão da lesão secundária por meio de vários mecanismos cálcio dependentes (Mody e MacDonald, 1995; Olby, 1999).

As mitocôndrias, organelas intracelulares que desempenham importante função no metabolismo energético celular e na homeostase do cálcio dentro da célula, são também fontes intracelulares de espécies reativas de oxigênio devido ao grande número de reações de oxirredução e utilização maciça de oxigênio pelas mesmas (Gottlieb, 1999; Fiskum, 2000). O processo de excitotoxicidade pode resultar em acúmulo de cálcio, ocasionando mudanças na permeabilidade e no potencial de membrana mitocondrial, produção insuficiente de ATP, edema e lise da organela. Proteínas pró-apoptóticas como o citocromo *c*, proteases e fatores indutores da apoptose são liberados no citosol, onde ativam cascata de eventos promotores de morte celular por apoptose (Mody e MacDonald, 1995; Green e Reed, 1998; Gottlieb, 1999). Outra consequência do acúmulo de cálcio mitocondrial é a estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a oxidação das membranas celulares (Green e Reed, 1998; Castilho; Ward e Nicholls, 2001).

Outra organela importante na regulação do cálcio intracelular presente nos neurônios é o retículo endoplasmático, cuja superfície apresenta receptores rianodínicos (RyR) que controlam a liberação de cálcio para o citoplasma celular. Existem três isoformas de RyR, RyR-1 e RyR-2 são expressas predominantemente nos músculos esquelético e cardíaco respectivamente, e a RyR-3 em vários tecidos, mas encontra-se em maior quantidade no SNC, sobretudo no cérebro. A liberação do cálcio armazenado no retículo endoplasmático neuronal, por meio da ativação dos RyR-3 amplifica os efeitos do influxo de cálcio, aumentando a neurotoxicidade (Mody e MacDonald, 1995; Zucchi e Ronca, 1997; Krause, *et. al.*, 2004).

O aumento na concentração de cálcio no citosol ativa endonucleases, capazes de quebrar o DNA e fosfolipases que causam lise da membrana plasmática e liberação de ácido araquidônico, além de induzir a produção de radicais livres (Choi, 1992).

2.3.4 - Radicais livres e peroxidação lipídica

A produção aumentada de EROs no TMA desempenha papel importante na morte celular neuronal e disfunção neurológica. São moléculas com alta reatividade e instabilidade e incluem os radicais livres de oxigênio como superóxido, radicais hidroxila, radicais lipídicos, óxido nítrico e peroxinitrito (Xu *et al.*, 2005; Cuzzocrea e Genovese, 2008).

As EROs são produzidas em condições isquêmicas seguidas por reperfusão, na elevação das concentrações intracelulares de cálcio, nas reações inflamatórias e na presença de ferro e cobre devido a hemorragias petequiais (Olby, 2010).

Os níveis de EROs produzidos geralmente ultrapassam a capacidade fisiológica de neutralização dos antioxidantes endógenos, acarretando progressiva oxidação patológica dos ácidos graxos das membranas celulares, processo denominado peroxidação lipídica. Neurônios e células da glia são altamente vulneráveis a lesões oxidativas devido a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes nos mesmos (Olby, 1999; Dumont *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2004; Cuzzocrea e Genovese, 2008). Ocorre também peroxidação das membranas celulares endoteliais, o que desencadeia a agregação plaquetária com posterior intensificação e extensão da área de isquemia (Olby, 1999).

A formação de radicais livres de oxigênio e a peroxidação lipídica amplificam os mecanismos de lesões secundárias do trauma, como hipoperfusão, desenvolvimento de edema, falha na condução neuronal e no metabolismo energético (Cuzzocrea e Genovese, 2008).

2.3.5 - Respostas inflamatória e imunológica

A reação inflamatória intraparenquimal e a ativação do sistema imunológico desencadeados pelo TMA possuem efeitos benéficos por estimularem a reparação tecidual, mas também efeitos deletérios devido à liberação de mediadores inflamatórios e fatores citotóxicos (Donnelly e Popovich, 2008).

As respostas inflamatória e imunológica envolvem componentes celulares como neutrófilos, macrófagos e linfócitos T, além de componentes não celulares como citocinas e prostaglandinas (Kwon *et al.*, 2004). Minutos após o trauma, mediadores inflamatórios como interleucinas e fatores de necrose tumoral são secretados por microgliócitos (Fehlings e Nguyen, 2010; Olby, 2010). A produção aumentada de metaloproteinases, enzimas que degradam a matriz extracelular e estão presentes em meninges e neurônios horas depois da injúria, desempenham importante papel na disfunção da barreira hematoespinal e no aumento da infiltração de neutrófilos (Noble *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2006).

Os neutrófilos, primeiras células participantes da resposta inflamatória, invadem a lesão em poucas horas e tendem a permanecer por uma semana, embora existam diferenças entre as espécies. A invasão de macrófagos é mais lenta, com pico em torno de quatro dias e duração de semanas a meses. Esse segundo pico de infiltração celular coincide com uma nova onda de perda axonal e desmielinização (Fleming *et al.*, 2006; Donnelly e Popovich, 2008).

Neutrófilos e macrófagos produzem enzimas neurotóxicas e proteolíticas aumentando a lesão. A fosfolipase A₂, importante enzima envolvida no processo inflamatório, tem sua expressão aumentada em neurônios, microglia e oligodendrócitos após o trauma. Catalisa a hidrólise de ácidos graxos fosfolipídicos de membrana, iniciando a via metabólica da cascata do ácido araquidônico, ocorre liberação de mediadores inflamatórios e radicais livres, induzindo desmielinização e morte neuronal (Fleming *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006).

As células inflamatórias predominantes cinco dias após o trauma são as células microgliais e macrófagos, que persistem por até um ano após a lesão (Fleming *et al.*, 2006). Considerados fagócitos endógenos do SNC, os microgliócitos liberam substâncias químicas potencialmente citotóxicas como peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e proteinases (Olby, 1999).

2.3.6 - Morte celular: apoptose e necrose

Após o TMA, neurônios, oligodendrócitos, microglia, astrócitos e células endoteliais morrem devido à necrose ou apoptose. A morte de oligodendrócitos nos tratos da substância branca continua por semanas e contribui com a desmielinização e perda de função neurológica pós-trauma (Beattie; Farooqui e Bresnahan, 2000; Lu, Ashwell e Waite, 2000; Casha, Yu e Fehlings, 2001; Beattie, 2004; Kwon *et al.*, 2004).

A apoptose, ou morte celular programada, é um fenômeno biológico, ativo e geneticamente regulado que ocorre como resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos (Gottlieb, 1999). A célula ativa enzimas proteolíticas, as caspases, que possuem como alvo várias proteínas citoesqueléticas e nucleares (Nicholson e Thornberry, 1997; Emery *et al.*, 1998), sofre alterações morfológicas características como retração, perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, os quais são endocitados por células vizinhas (Nicholson e Thornberry, 1997; Emery *et al.*, 1998; Brasileiro Filho, 2004; Kwon *et al.*, 2004; Grivicich, Regner e Rocha, 2007).

Em contrapartida, a necrose é uma resposta passiva a um insulto capaz de interromper as funções vitais da célula. Os lisossomos liberam proteases, lipases, ribonucleases e dextrirribonucleases no citosol, que são ativadas por altas concentrações de Ca^{2+} no citoplasma, dando início à degradação enzimática dos componentes celulares por enzimas da própria célula (Brasileiro Filho, 2004). Observa-se danos à membrana celular e a organelas, ausência de produção de ATP e falha energética, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura e liberação do conteúdo celular, causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória local intensa (Lu, Ashwell e Waite, 2000; Brasileiro Filho, 2004; Ziegler e Groscurth, 2004).

Ambas as formas de morte celular ocorrem após o TMA e são iniciadas pelos processos de isquemia, estresse oxidativo e excitotoxicidade. Quanto mais grave a lesão, maior a probabilidade de a célula sofrer morte por necrose (Kwon *et al.*, 2004), vista principalmente no epicentro da lesão logo após o trauma (Beattie, Farooqui e Bresnahan, 2000), enquanto células menos danificadas são capazes de ativar a via apoptótica (Lu, Ashwell e Waite, 2000).

A morte celular por apoptose de neurônios e oligodendrócitos tem início na fase aguda do trauma e pode continuar por semanas, não apenas no local de impacto mecânico, mas também em locais distantes (Emery *et al.*, 1998). A degeneração axonal após o TMA está associada a apoptose de células da glia, em particular de oligodendrócitos, por ativação de receptores apoptóticos Fas (*First Apoptosis Signal*) e p75, presentes em astrócitos, oligodendrócitos e microglia, conhecidos por ativarem a cascata de caspases (Casha, Yu e Fehlings, 2001; Kwon *et al.*, 2004).

2.3.6.1 - Caspases como iniciadoras e efetoras da apoptose

Independente do estímulo sofrido pela célula, a apoptose resulta sempre da ativação de caspases, as quais induzem modificações funcionais e morfológicas características do processo (Brasileiro Filho, 2004). As caspases (*cysteine asparagil specific proteases*), grupo de proteases da família das cisteínas, são sintetizadas como precursores inativos chamados pró-caspases. Após ativação por clivagem proteolítica, adquirem a capacidade de reconhecer substratos intracelulares com resíduos de aspartato, promovendo uma cascata de eventos cujo desfecho é a morte celular por apoptose (Nicholson e Thornberry, 1997; Vander Heiden e Thompson, 1999; Desagher e Martinou, 2000; Boatright e Salvesen, 2003).

As caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10 participam da apoptose e são classificadas de acordo com seu papel e seu ponto de entrada na cascata apoptótica. As iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) são as primeiras a serem ativadas e estão envolvidas na iniciação do processo, fazem proteólise das efetoras (caspases 3, 6 e 7), que por sua vez atuam ativando outras proteases que degradam diferentes substratos das células, incluindo DNA e citoesqueleto (Denault e Salvesen, 2002; Boatright e Salvesen, 2003; Brasileiro Filho, 2004).

Dependendo do local de origem do estímulo para a morte celular programada, a ativação da apoptose pode ser iniciada pela via extrínseca, mediada por receptores trans-membrana, ou pela via intrínseca, mitocôndria-dependente (Boatright e Salvesen, 2003).

2.3.6.2 - Vias intrínseca e extrínseca da apoptose

A mitocôndria é a principal mediadora da via intrínseca e integra os estímulos de morte celular através de proteínas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*). Libera proteínas indutoras de apoptose como o citocromo *c*, a proteína SMAC (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*) e o AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), os quais ativam a caspase iniciadora 9 ou diretamente as efetoras (Nicholson e Thornberry, 1997; Desagher e Martinou, 2000; Brasileiro Filho, 2004). O citocromo *c* no citosol se associa com fatores que ativam a apoptose e recruta caspase 9, formando o complexo conhecido como apoptossomo, que então ativa a caspase 3, iniciando a via de execução da apoptose (Nicholson e Thornberry, 1997; Brasileiro Filho, 2004).

A via extrínseca é desencadeada quando ligantes extracelulares interagem com um grupo de receptores de membrana que possuem domínio de morte. Os receptores mais descritos pertencem à família dos receptores de necrose tumoral (rTNF). Após a interação ligante-receptor, ocorre a transmissão de sinais apoptóticos e pró-caspases iniciadoras 8 ou 10 são ativadas, as quais ativam caspases efetoras 3, 6 e 7 (Amarante-Mendes e Green, 1999; Boatright e Salvesen, 2003), responsáveis pela ativação de proteases que irão completar o processo. Além de ativar as caspases efetoras, a caspase 8 cliva a BID (*BH3 Interactin Death Domain*), proteína pró-apoptótica presente no citosol, originando fragmento que se liga a proteínas Bcl-2 e Bcl-x, alterando a permeabilidade mitocondrial e favorecendo a saída do citocromo *c*, AIF e SMAC, que ativam a caspase 9 ou as caspases efetoras. Logo, o mecanismo intrínseco mitocondrial de indução da apoptose também é ativado pela ativação da caspase 8 (Brasileiro Filho, 2004).

2.3.6.3 - Proteínas da família Bcl-2

A família Bcl-2 de proteínas regula a apoptose integrando os sinais de morte ou sobrevivência celular que são gerados dentro e fora da célula. É dividida em duas classes de proteínas, as indutoras (Bax e Bak) e as inibidoras (Bcl-2 e Bcl-xL) da apoptose e participam ativamente na regulação do processo. As proteínas Bcl-2 e Bcl-xL são chamadas reguladoras antiapoptóticas, estão presentes na membrana mitocondrial, constituindo ou regulando proteínas formadoras de poros de permeabilidade transicional, importante na permeabilidade da mitocôndria, e previnem a liberação do citocromo *c* (Nicholson e Thornberry, 1997; Borner, 2003; Brasileiro Filho, 2004).

Por outro lado, as proteínas Bax e Bak são pró-apoptóticas, estão presentes no citosol e caracterizam-se por apresentar domínio de dimerização BH3 (*B cell Homolog 3*) que permite ligá-las às proteínas anti-apoptóticas e inibi-las. Vias indutoras da apoptose agem ativando essas proteínas, promovem desestabilização da membrana mitocondrial e consequente liberação do citocromo *c* e de outras proteínas ativadoras de caspases. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti e pró-apoptóticas (Nicholson e Thornberry, 1997; Vander Heiden e Thompson, 1999; Borner, 2003; Brasileiro Filho, 2004).

As mitocôndrias podem também influenciar o processo de apoptose regulando mudanças no seu potencial de membrana, no pH citoplasmático e na produção de radicais livres. A disfunção mitocondrial é responsável por aumentar os níveis de EROs e acidificar o citoplasma, eventos que

ocorrem previamente à apoptose. A expressão de Bcl-2 inibe a geração de EROs e a acidificação intracelular, assim como estabiliza o potencial de membrana mitocondrial, podendo a Bcl-2 ser considerada uma reguladora da fisiologia mitocondrial (Vander Heiden e Thompson, 1999).

2.4 - Bloqueadores de canais de cálcio como agentes neuroprotetores

O tratamento TMA tem se concentrado em grande parte na atenuação das lesões secundárias e os agentes terapêuticos têm como alvo um ou mais mecanismos que perpetuam a lesão, com o objetivo de conferir neuroproteção e restauração do tecido neuronal (Dumont *et al.*, 2001; Webb, Ngan e Fowler, 2010).

Devido ao papel relevante do cálcio na patogênese das lesões secundárias, os agentes bloqueadores de canais de cálcio, como o nimodipino (Ford e Malm, 1985; Guha, Tator e Piper, 1985; Siavash *et al.*, 1988; Fehlings, Tator e Linden, 1989; Holtz, Nystrom e Gerdin, 1989; Nehrt *et al.*, 2007), o dantrolene (Aslan *et al.*, 2009; Costa, 2010; Torres *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011; Rosado *et al.*, 2014; Torres, 2014), a toxina Ph α 1 β (Coelho, 2016) e conotoxinas (Oliveira *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016; Azevedo, 2018; Oliveira *et al.*, 2018), vêm sendo utilizados em pesquisas para tratamento do TMA. Diferentes espécies animais como ratos, gatos e coelhos foram utilizadas e os resultados apresentaram efeitos neuroprotetores variáveis.

2.4.1 - Ômega conotoxina MVIIIC

Venenos de animais têm recebido crescente atenção de bioquímicos e fisiologistas devido ao seu potencial de bloquear receptores de membrana específicos em células dos sistemas nervoso e musculoesquelético (Olivera *et al.*, 1985; Uchitel, 1997). As conotoxinas, toxinas presentes no veneno de caramujos marinhos do gênero *Conus*, se destacam no meio científico e se apresentam como um modelo para estudo de como os seus peptídeos e suas interações com canais iônicos podem se tornar um medicamento em potencial (Bowersox e Luther, 1998; Bingham, Mitsunaga e Bergeron, 2010).

Muitas pesquisas já foram realizadas para avaliar a neuroproteção que as conotoxinas conferem no trauma encefálico (Hovda *et al.*, 1994) e medular em ratos (Burns, Jin e Bowersox, 1999; Oliveira *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2018, Azevedo, 2018), em modelos de isquemia cerebral de coelhos (Perez-Pinzon *et al.*, 1997) e de ratos (Valentino *et al.*, 1993; Bowersox, Singh e Luther, 1997) e no tratamento da dor em ratos (De Souza *et al.*, 2012).

Os caramujos do gênero *Conus* são predadores que habitam recifes de corais tropicais, possuem hábitos noturnos e se alimentam de peixes ou moluscos (Olivera *et al.*, 1985). Cerca de 500 espécies já foram reconhecidas e todas são consideradas venenosas (Terlau e Olivera, 2004), dentre elas, destaca-se o caramujo marinho *Conus magus*, encontrado nas regiões dos oceanos Índico e Pacífico e que sintetiza a toxina com uma mistura complexa de conopeptídeos para paralisar sua presa rapidamente (Fig. 2). Através de um dente radular, semelhante a um arpão, inocula seu

veneno como mecanismo de defesa ou para facilitar a imobilização de suas presas (Cruz *et al.*, 1985).

A conotoxina é composta por peptídeos farmacologicamente ativos, que atuam como moduladores e inibidores seletivos de canais iônicos de cálcio, sódio e potássio (Uchitel, 1997). Possuem arranjos moleculares particulares não havendo sobreposição entre as espécies, sendo reconhecidos de 50.000 a 140.000 conopeptídeos diferentes, o que torna a conotoxina uma excelente ferramenta farmacológica em neuropatias (Terlau e Olivera, 2004; Olivera e Teichert, 2007; Mir *et al.*, 2016).

A diferença na sequência de aminoácidos confere múltiplas isoformas da conotoxina, cada uma funcionalmente seletiva em bloquear diferentes tipos de canais iônicos (Uchitel, 1997; McDonough *et al.*, 2002). O veneno do caramujo *Conus magus*, apresenta um peptídeo altamente específico para canais de cálcio tipo N, a ω -conotoxina MVIIA. Outro peptídeo do mesmo veneno, a ω -conotoxina MVIIC, preferencialmente tem como alvo os canais de cálcio tipo P e Q (Hillyard *et al.*, 1992; Terlau e Olivera, 2004).



Figura 2: Fotografia do caramujo marinho *Conus magus*. Foto de Jeanette e Scott Johnson (Hannon e Atchison, 2013).

A ω -conotoxina MVIIC é constituída por 26 aminoácidos e foi primeiramente descrita em 1992 por Hillyard e colaboradores. Bloqueia de forma potente e lentamente reversível os canais de cálcio P e Q (Liu *et al.*, 1996, McDonough *et al.*, 1996). Estudos utilizando a MVIIC demonstraram inibição de isquemia em células do hipocampo (Pinheiro *et al.*, 2009) e em medula de ratos (Imaizumi, Kocsis e Waxman, 1999) *in vitro*, por reduzir significativamente o influxo do cálcio através dos CCVD.

Em 2014, Oliveira e colaboradores testaram os efeitos neuroprotetores da MVIIC no TMA de ratos e obtiveram resultados promissores, com melhora da recuperação motora dos animais *in vivo* e diminuição da apoptose neuronal *in vitro*. Além disso, Azevedo (2018) observou recuperação da função motora, diminuição do estresse oxidativo e da expressão gênica de fatores pró-apoptóticos em ratos submetidos ao TMA e tratados com MVIIC por via intratecal.

2.4.2 - Dantrolene sódico

O dantrolene (1-[[[5-(4-nitrofenil)-2-furanil]-metil]amino]-2,4-imidazolidine-dione sódio sal hidratado) é um derivado da hidantoína, altamente lipofílico, sensível à luz e deve ser utilizado em até 6 horas após diluição. É metabolizado pelo sistema microssomal hepático em 5-hidroxi-dantrolene e excretado pela urina e bile (Inan e Wei, 2010). Foi originalmente sintetizado por Snyder e colaboradores em 1967 como uma nova classe de relaxante muscular esquelético, propriedade descoberta após administração intravenosa em animais.

Tem sido usado há muitas décadas para o tratamento de hipertermia maligna em humanos (Kolb, Horne e Martz, 1982; Glahn *et al.*, 2010; Schneiderbanger *et al.*, 2014), uma desordem farmacogenética do músculo esquelético causada por liberação excessiva de cálcio pelo retículo sarcoplasmático após administração de anestésicos halogenados, levando a quadro de rigidez muscular e hipertermia intensa (Nelson, 1992). Sua eficácia para o tratamento foi relatada primeiramente em suínos susceptíveis a essa síndrome durante anestesia com halotano, onde os animais apresentaram os mesmos sinais clínicos verificados em seres humanos. Os suínos foram então usados para investigar a fisiopatologia e a terapia para essa condição (Harrison, 1975). Vários estudos já foram conduzidos para avaliar sua segurança e diminuição da mortalidade (Kolb, Horne e Martz, 1982).

Também é utilizado para o tratamento de outras condições como síndrome neuroléptica maligna (Tsutsumi *et al.*, 1998), espasticidade muscular (Dykes, 1975; Krause *et al.*, 2004) e intoxicação por metanfetamina (3,4-methylenedioxyamphetamine), popularmente conhecida como ecstasy, substância psicotrópica usada como droga recreativa (Hall e Henry, 2006).

É um fármaco que bloqueia a liberação do cálcio armazenado no retículo endoplasmático (RE) para o citoplasma celular pela inibição dos receptores rianodínicos (RYRs) presentes na sua superfície (Krause *et al.*, 2004; Inan e Wei, 2010).

Para investigar os efeitos protetores do dantrolene na citotoxicidade induzida pela perda da homeostase do cálcio, muitos estudos já foram realizados. A administração do dantrolene por via intraperitoneal como terapia no TMA em coelhos proporcionou melhora na função motora, diminuição da apoptose e aumento nos níveis de enzimas antioxidantes (Aslan *et al.*, 2009). Em estudos realizados em ratos, sua administração resultou em efeito protetor na medula espinhal após trauma agudo diminuindo a morte celular por apoptose e promovendo recuperação motora, seja administrado de forma isolada (Costa, 2010; Torres *et al.*, 2010) ou em combinação com riluzol, medicamento também inibidor de canais iônicos (Martins *et al.*, 2018), ou com células tronco mesenquimais (Torres, 2014).

2.5 - Teste comportamental para avaliação neurológica em ratos

O teste comportamental em pesquisas de lesão medular é importante ferramenta capaz de produzir dados confiáveis e valiosos. Possui como principais finalidades associar o grau de *déficits* funcionais com a gravidade, localização e duração da lesão, avaliar o grau de recuperação após o

trauma com e sem intervenções e identificar a integridade dos sistemas motores e sensoriais (Bresnahan *et al.*, 1987; Basso, Beattie e Bresnahan, 1995; Basso, 2004). Para uso em ensaios pré-clínicos, a avaliação ideal deve ser de fácil realização, sensível a pequenas e importantes alterações comportamentais e capaz de avaliar rapidamente a função motora em grande número de animais experimentais (Basso, 2004).

Os testes comportamentais são realizados há muitos anos e se concentram na observação da locomoção do animal e subsequente atribuição de pontos. O teste mais antigo foi originalmente projetado por Tarlov e Klinger em 1954 e classificava o movimento e o suporte dos membros pélvicos dos animais em cinco escores. Posteriormente, foi modificado por outros pesquisadores que avaliaram a habilidade locomotora em campo aberto, a capacidade de realização de movimentos finos e de correção postural em plano inclinado de ratos pós TMA (Bresnahan *et al.*, 1987).

Em 1995, com o objetivo de melhorar a sensibilidade e confiabilidade da avaliação locomotora, Basso e colaboradores desenvolveram uma nova escala de classificação e avaliação da locomoção de ratos submetidos a trauma medular experimental, denominada Escala BBB, em referência à letra inicial do nome de cada pesquisador responsável pela sua criação. Apresenta grande número de escores, variando de 0 a 21, sendo zero atribuído a ratos com paraplegia e 21 a ratos com marcha normal (Quadro 1). Os escores 1 a 7 descrevem os animais que apresentam movimentos isolados discretos ou extensos das articulações dos membros pélvicos, os escores 8 a 14 os animais que apresentam apoio plantar, suporte de peso e movimentos coordenados ou não com os membros torácicos. A faixa de escores 15 a 20 é atribuída aos animais que apresentam elevação de dígitos durante a marcha com posicionamento apropriado das patas e cauda bem posicionada (Basso, Beattie e Bresnahan, 1995).

Quadro 1: Escala de classificação e características locomotoras dos membros pélvicos (MPs) segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da função motora de ratos após trauma medular agudo

Escores	Apresentação clínica dos membros pélvicos (mps)
0	Ausência de movimento dos membros pélvicos
1	Movimento discreto de uma ou duas das articulações
2	Movimento extenso de uma articulação ou extenso de uma articulação e discreto de outra
3	Movimento extenso de duas articulações
4	Movimento discreto das três articulações
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações
8	Passada ou posicionamento plantar sem suporte de peso

9	Posicionamento plantar com suporte de peso somente em estação ou passada dorsal com suporte de peso ocasional, frequente ou consistente e sem apoio plantar
10	Passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação com os membros torácicos
11	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso sem coordenação com os MTs
12	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e coordenação ocasional com os MTs
13	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e coordenação frequente com MTs
14	Passada plantar consistentemente coordenada, com a posição da pata predominantemente rotacionada durante contato inicial e retirada; passada plantar frequente, coordenação com MTs consistente e passada dorsal ocasional.
15	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos ausente ou ocasional durante avanço do membro, posicionamento da pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial
16	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos frequente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e rotacionada na retirada
17	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos frequente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada
18	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada
19	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda abaixada por parte ou todo o tempo de avaliação
20	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e instabilidade de tronco.
21	Marcha coordenada consistente, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e estabilidade de tronco consistente

MTs: membros torácicos **MPs:** membros pélvicos (Adaptado de Basso, Beattie e Bresnahan, 1995).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo de número 368/2017 (Anexo 1), estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo referido comitê. O projeto de pesquisa foi desenvolvido nas dependências físicas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG (Laboratório de Análises Clínicas e Centro Experimental de Pequenos Animais - CEPA), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal II), do Hospital Veterinário da UFMG (Bloco Cirúrgico) e do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Minas Gerais (IEP-SCBH).

3.1 - Animais

Foram utilizados 20 animais machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar* com peso médio 350 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia - UFMG. Os animais foram mantidos durante todo o experimento no Biotério do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, acondicionados em caixas plásticas de dimensões de 17 cm x 41 cm x 33 cm, forradas com maravalha, com dois ratos por caixa (Fig. 3). Os animais receberam ração para roedores¹ e água *ad libidum*, e foram submetidos a períodos de 12 horas com luz e 12 horas de escuro, em ambiente com temperatura controlada (22±2°C). Permaneceram em período de aclimação por 15 dias antes do trauma medular e tratamentos e por oito dias até a eutanásia.

3.2 - Grupos Experimentais

Após o período de aclimação, os animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais com quatro animais em cada grupo (Quadro 2). Todos os grupos foram submetidos ao procedimento cirúrgico de laminectomia dorsal no segmento vertebral T12 e, com exceção do grupo controle negativo, foram também submetidos ao trauma medular compressivo pelo aparelho indutor de trauma MASCIS *Impactor*² (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) logo após o procedimento de laminectomia.

3.3 - A toxina

A ω -conotoxina MVIIC foi adquirida na dose de 100µg do Laboratório Francês Laxotan, especializado em produção de venenos, e fornecida pelo Professor Marcos Vinícius Gomez da Faculdade de Medicina da UFMG, em apresentação comercial liofilizada, suspensa em solução de PBS estéril. O volume foi ajustado para 20 pmol/10µL, em tubos de plástico siliconizados, sendo armazenada em freezer (-20°C) até o momento da aplicação nos animais dos grupos T e T+D.

3.4 - O dantrolene sódico

O dantrolene foi fornecido pela empresa Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, em apresentação pó líofilo injetável, cada frasco com 20 mg do produto para diluição com água para injetáveis em frascos de 60 ml. Após diluição de acordo com as recomendações do fabricante, obteve-se uma solução com a concentração final de 0,33 mg/ml, que foi imediatamente aplicada nos animais dos grupos D e T+D.

1 - Ração para ratos e camundongos - Linha Laboratório - Presence Alimentos, S/A.

2- Impactor Modle - III User Guide - The State University of New Jersey, New Jersey - U.S.A.



Figura 3 - Fotografia do delineamento experimental. Vinte animais distribuídos aleatoriamente, acondicionados em caixas plásticas de dimensões de 17 cm x 41 cm x 33 cm, forradas com maravalha, com dois ratos por caixa, no Biotério do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.

Quadro 2: Distribuição dos ratos nos cinco grupos experimentais e protocolos de tratamento

Grupo	Denominação	Descrição
CN	controle negativo	Aplicação intratecal de 10 μ L de PBS estéril, 60 minutos após laminectomia, sem trauma medular
CP	controle positivo	Aplicação intratecal de 10 μ L de PBS estéril, 60 minutos após laminectomia e trauma medular
T	ω - conotoxina MVIIC	Aplicação intratecal de 20 pmol/10 μ L da ω -conotoxina MVIIC, 60 minutos após laminectomia e trauma medular
D	dantrolene	Aplicação intraperitoneal de dantrolene (10 mg/kg) ³ , 90 minutos após laminectomia e trauma medular
T+D	ω - conotoxina MVIIC + dantrolene	Aplicação intratecal de 20 pmol/10 μ L da ω -conotoxina MVIIC e 10mg/kg de dantrolene por via intraperitoneal, 60 e 90 minutos após laminectomia e trauma medular, respectivamente

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

3.5 - Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais foram pesados e receberam de forma profilática antibiótico cefalotina sódica⁴ por via subcutânea (60mg/kg). Como medicação pré-anestésica receberam sulfato de morfina⁵ por via intramuscular (2,5mg/kg), 20 minutos antes do início da cirurgia. Em seguida, foi realizada a tricotomia da região dorsal do tronco e indução anestésica em câmara com isoflurano⁶. A manutenção do plano anestésico foi feita com o mesmo agente, fornecido por máscara facial em sistema de não-reinalação. Os animais foram posicionados em decúbito esternal na mesa de cirurgia, sobre duas chapas de polietileno, paralelas entre si e separadas por quatro hastes de alumínio, que permite a colocação de uma bolsa térmica entre as chapas para aquecimento do animal durante o procedimento cirúrgico. A área tricotomizada foi submetida à antissepsia com solução digliconato de clorexidina 2%⁷ e digliconato de clorexidina 0,5% solução alcoólica⁸ (Fig. 4).

Foram realizadas incisões cutânea e subcutânea na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica à primeira lombar e afastamento lateral dos músculos epaxiais. Em seguida foi realizada a laminectomia do segmento vertebral torácico número 12 (T12) com ostectomia do processo espinhoso da vértebra torácica com pinça hemostática de Kocher, seguida da remoção da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico⁹ e pinça hemostática de Halsted, sob irrigação intermitente com solução de NaCl 0,9%¹⁰ para evitar o aquecimento dos tecidos. A abertura da lâmina dorsal foi de aproximadamente cinco milímetros de diâmetro e permitia a visualização da medula espinhal.

Após a execução do trauma medular compressivo, foi realizada a aproximação dos músculos epaxiais e redução do espaço morto empregando-se sutura padrão simples contínuo com fio inabsorvível sintético *nylon* 3-0¹¹. A dermorrafia foi realizada com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio de sutura (Fig. 5).

3.6 - Trauma medular compressivo

Após a cirurgia de laminectomia e exposição da medula espinhal coberta pela *dura mater*, utilizou-se o sistema de estabilização vertebral do aparelho MASCIS *Impactor* (“*clamping system*”) nos processos espinhosos de T11 e T13, e os animais foram posicionados no sistema indutor de trauma espinhal MASCIS *Impactor*. O trauma medular compressivo foi gerado pela queda da haste de 10

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

5 - Dimorf® - Cristália produtos Químicos Farmaceuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

6 - Isoforine® - Cristália produtos Químicos Farmaceuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

7 - Riohex® 2% Solução com tensoativos. Rioquímica Ltda. São Jose do Rio preto, SP, Brasil.

8 - Riohex® 0,5% Solução Alcoólica. Rioquímica Ltda. São Jose do Rio preto, SP, Brasil.

9 - ECCOS® Aesculap, Laboratório B.Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil.

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

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

gramas a uma altura de 25 mm, mantida por 5 segundos. Após a retirada da haste foi visualizada hemorragia pós-trauma sobre a medula espinhal. O dispositivo permaneceu conectado ao *Software Impactor 7.0* no computador, que exibiu as curvas de trajetória de impacto por meio de sensores do aparelho, apontando possíveis erros de velocidade, tempo e altura de queda, garantindo um trauma de mesma intensidade em todos os animais (Fig. 6).

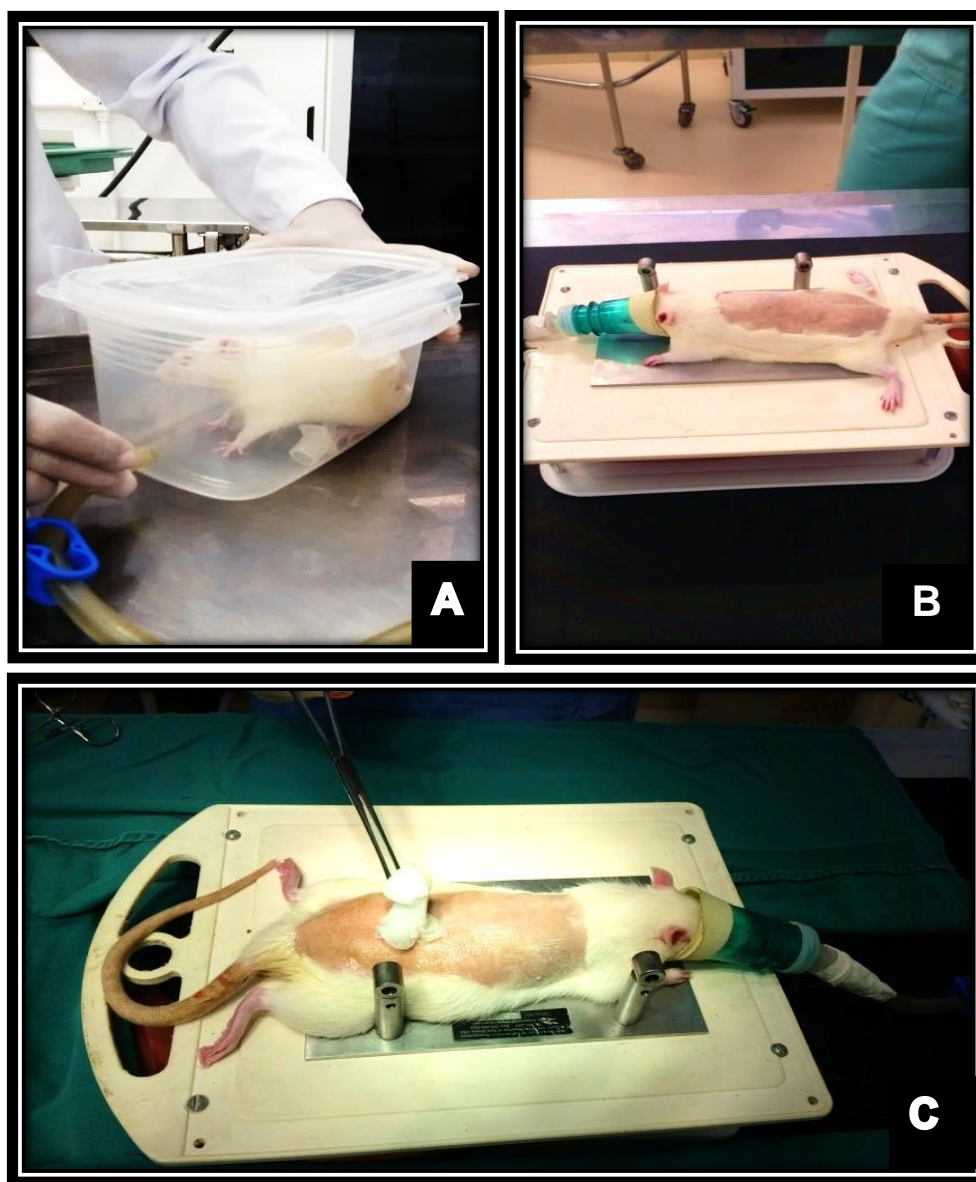


Figura 4: Fotografias do procedimento anestésico e da antissepsia cirúrgica. **A)** Indução anestésica em câmara com isoflurano. **B)** Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa aquecida com bolsa térmica. **C)** Realização de antissepsia em região dorsal do tronco tricotomizada com solução digliconato de clorexidina 2% e digliconato de clorexidina 0,5% solução alcoólica. Manutenção anestésica por meio de máscara com isoflurano em sistema semiaberto



Figura 5: Fotografias do procedimento cirúrgico de laminectomia em T12 em ratos *Wistar*. **A)** Incisão cutânea e subcutânea na linha média dorsal. **B)** Afastamento da musculatura epaxial e identificação dos processos espinhosos. **C)** Desgaste da lâmina dorsal com *drill* pneumático neurológico. **D)** Aproximação dos músculos epaxiais, redução do espaço morto e dermorrafia com sutura padrão simples contínuo com fio inabsorvível sintético *nylon 3-0*

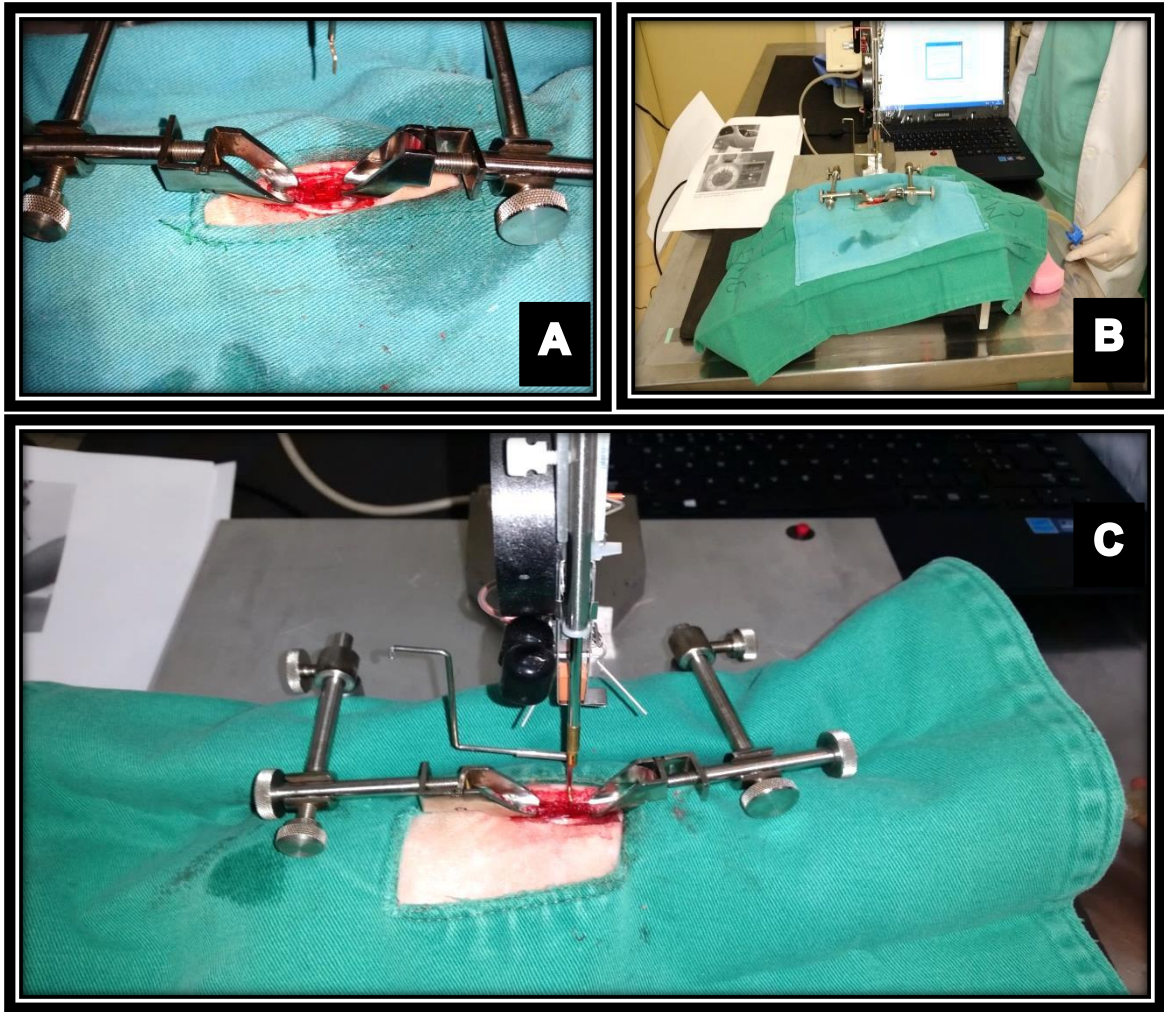


Figura 6: Fotografias da realização do trauma medular compressivo com o aparelho MASCIS *Impactor*. **A)** Posicionamento do animal após laminectomia em T12 e utilização do sistema de estabilização vertebral “clamping system”. **B)** Dispositivo conectado ao *Software Impactor 7.0* no computador para padronização do trauma. **C)** Haste de impacto do aparelho tocando a medula na região de laminectomia dorsal após queda a 25 mm de altura.

3.7 - Pós-operatório

Após a cirurgia de laminectomia, todos os animais receberam solução de NaCl 0,9% na taxa de manutenção por via subcutânea (15 ml/kg) e foram mantidos em caixas com oxigenioterapia e aquecidas com colchão térmico¹² à temperatura de 40°C, até completa recuperação anestésica (Fig. 7A). Foi realizada analgesia com sulfato de morfina (2,5 mg/kg), por via subcutânea, a cada 8 horas nos 3 dias subsequentes à cirurgia e massagem vesical para esvaziamento da bexiga três vezes ao dia até que os animais adquirissem micção espontânea.

12 - Brasmed - Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária Ltda, Paulínia, SP, Brasil.

3.8 - Tratamentos

O protocolo terapêutico consistiu na aplicação intratecal de PBS estéril e da ω -conotoxina MVIIC e na aplicação intraperitoneal do dantrolene sódico. As aplicações intratecal e intraperitoneal foram realizadas de acordo com o método descrito para ratos por Mestre e colaboradores (1994) e Andrews (2014), respectivamente.

3.8.1 - Aplicação intratecal

Uma hora após a laminectomia (grupo CN) ou após o trauma medular (grupos CP, T e T+D), os animais foram submetidos à nova indução anestésica em câmara com isoflurano e posicionados em decúbito esternal. Foi colocada uma seringa de 20 ml¹³ sob o abdômen de cada animal com o objetivo de aumentar a curvatura da coluna vertebral e assim obter melhor exposição dos espaços intervertebrais. Foi realizada a punção entre a quinta e sexta vértebra lombar com seringa de Hamilton 701LT¹⁴ acoplada a agulha 26 G¹⁵, perpendicularmente à coluna vertebral (Fig. 7B). Este local foi selecionado para que a punção ficasse restrita à região onde termina a medula espinhal e inicia a cauda equina, a fim de reduzir a possibilidade de danos à medula espinhal. Quando a agulha penetrou no espaço subaracnóideo, foi observado movimento da cauda, reflexo usado como indicador de punção bem efetuada (Mestre *et al.*, 1994). Um volume de 10 μ L de PBS estéril foi injetado nos grupos CN e CP, 10 μ L de solução contendo 20 pmol de ω -conotoxina MVIIC, descongelada em temperatura ambiente, foi injetada nos grupos T e T+D.

3.8.2 - Aplicação intraperitoneal

Noventa minutos após a laminectomia e trauma medular os animais dos grupos D e T+D receberam aplicação de 10 mg/kg de dantrolene por via intraperitoneal, logo após sua reconstituição. O animal foi contido pelo dorso e membros pélvicos e o local de punção foi previamente higienizado com álcool 70%¹⁶. A agulha 22 G¹⁷ acoplada em seringa 20 ml foi introduzida no quadrante inferior direito do abdômen para evitar danos à bexiga, ceco e outros órgãos abdominais (Fig. 7C).

13 - Seringa descartável 20 ml - BD Biosciences Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

14 - 10 microl, Model 701 LT SYR - Hamilton Company, Reno, NV, USA.

15 - Agulha descartável 26G - 13x0,45 mm - BD Biosciences Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

16 - Rioalcohol 70®- Álcool Etfílico 77°GL 70°INPM- Rioquímica, São Jose do Rio Preto, SP, Brasil.

17 - Agulha descartavel 22G - 25x7mm- BD Biosciences Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

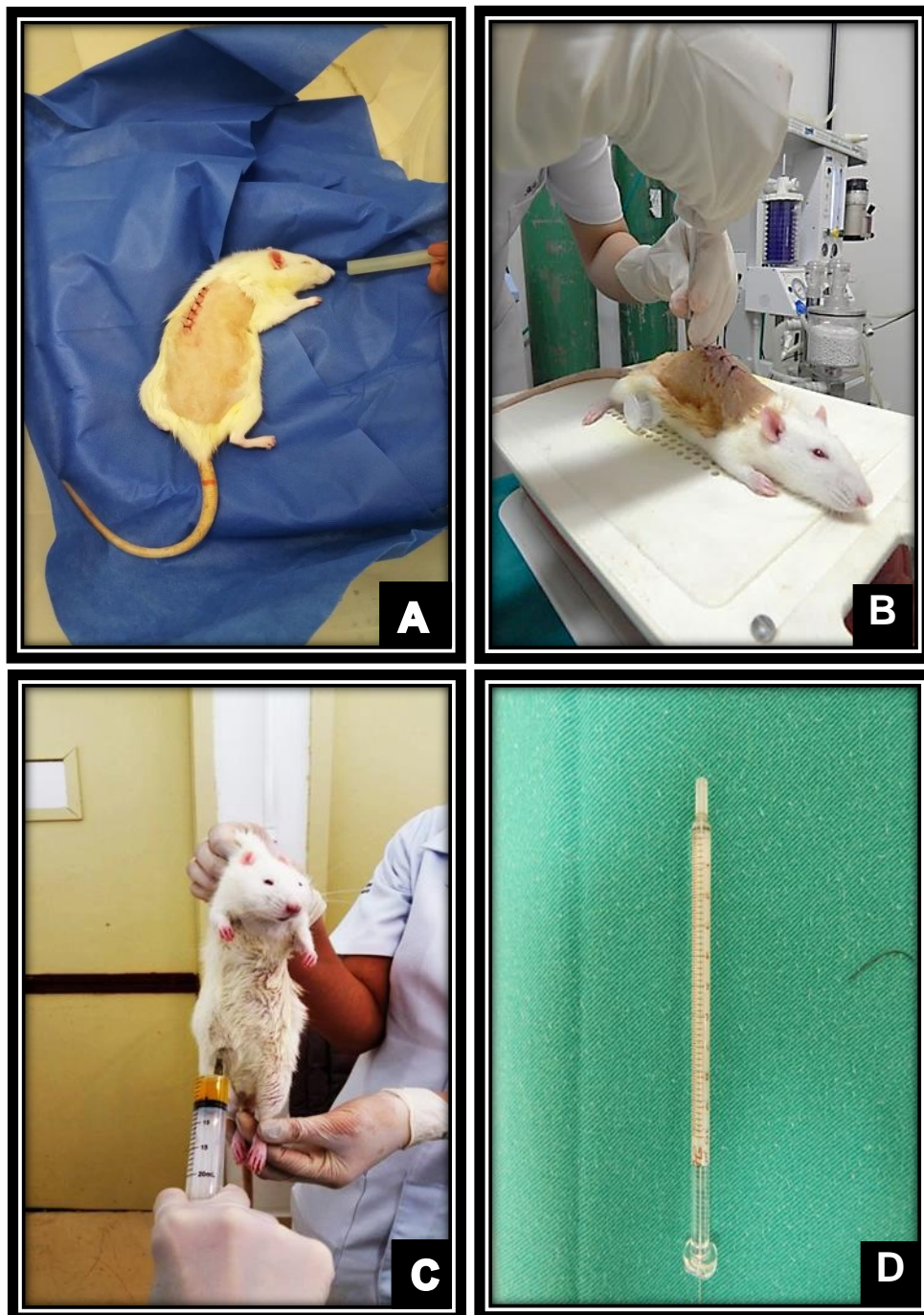


Figura 7: Fotografias da recuperação anestésica e dos tratamentos. **A)** Animal mantido em caixa com oxigenioterapia e aquecida com colchão térmico até completa recuperação anestésica. **B)** Aplicação intratecal de 20 pmol de ω -conotoxina MVIIC realizada por meio de punção do espaço subaracnóide entre a quinta e sexta vértebras lombares por seringa de Hamilton 701LT acoplada a agulha 26G. **C)** Aplicação intraperitoneal de dantrolene sódico com agulha 25x7 mm acoplada em seringa 20 ml, introduzida no quadrante inferior direito do abdômen. **D)** Seringa de Hamilton 701LT volume total 10 μ L

3.9 - Avaliação da capacidade motora em campo aberto:

A avaliação da capacidade motora dos animais foi realizada no dia anterior à intervenção cirúrgica e diariamente após o tratamento até o dia da eutanásia (Figura 8). Os animais foram colocados individualmente em um campo aberto com área de um metro quadrado sem obstáculos, foram observados e filmados por 4 minutos. Os vídeos foram assistidos por dois avaliadores a cegas e foi realizada a classificação da deambulação dos animais de acordo com escores que variaram de 0 a 21 pontos utilizando-se a escala BBB (Basso, Beatie e Bresnahan, 1995) (Quadro 1).

3.10 - Eutanásia

Oito dias após a intervenção cirúrgica, todos os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico¹⁸ (100 mg/kg), por via intraperitoneal. Para evitar irritação transitória, dor e desconforto, previamente 15 minutos à aplicação do tiopental foi feita a administração de 10mg/kg de lidocaína¹⁹ também por via intraperitoneal.

O tiopental é um barbitúrico de ultracurta duração, classificado como depressor do SNC, produz depressão central gradativa que se inicia no córtex até atingir o centro cardiorrespiratório bulbar. Este método de eutanásia química consta no Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013).

3.11 - Coleta de materiais:

Imediatamente após a eutanásia, foram coletados 3,0 ml de sangue por cardiopunção, dos quais 1,0 ml foi acondicionado em frasco com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)²⁰ a 10% para realização de análises hematológicas e 2,0 ml em tubo siliconizado sem anticoagulante²¹ para avaliação da bioquímica plasmática.

Os parâmetros hematológicos em ratos podem ser influenciados por uma variedade de fatores, incluindo o local de coleta, idade, sexo, espécie e estresse (Quesenberry e Carpenter, 2012; Thrall *et al.*, 2012). Portanto, para a realização da eutanásia e posterior coleta de sangue, todos os animais foram submetidos ao mesmo tipo de contenção, sendo segurados gentilmente pelo dorso e membros pélvicos.

18 - Thiopentax - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

19 - Xylestesin 2% Sem Vasoconstritor - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

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

21 - Tubo para coleta de sangue a vácuo siliconizado, Labor Import, Osasco, SP, Brasil.

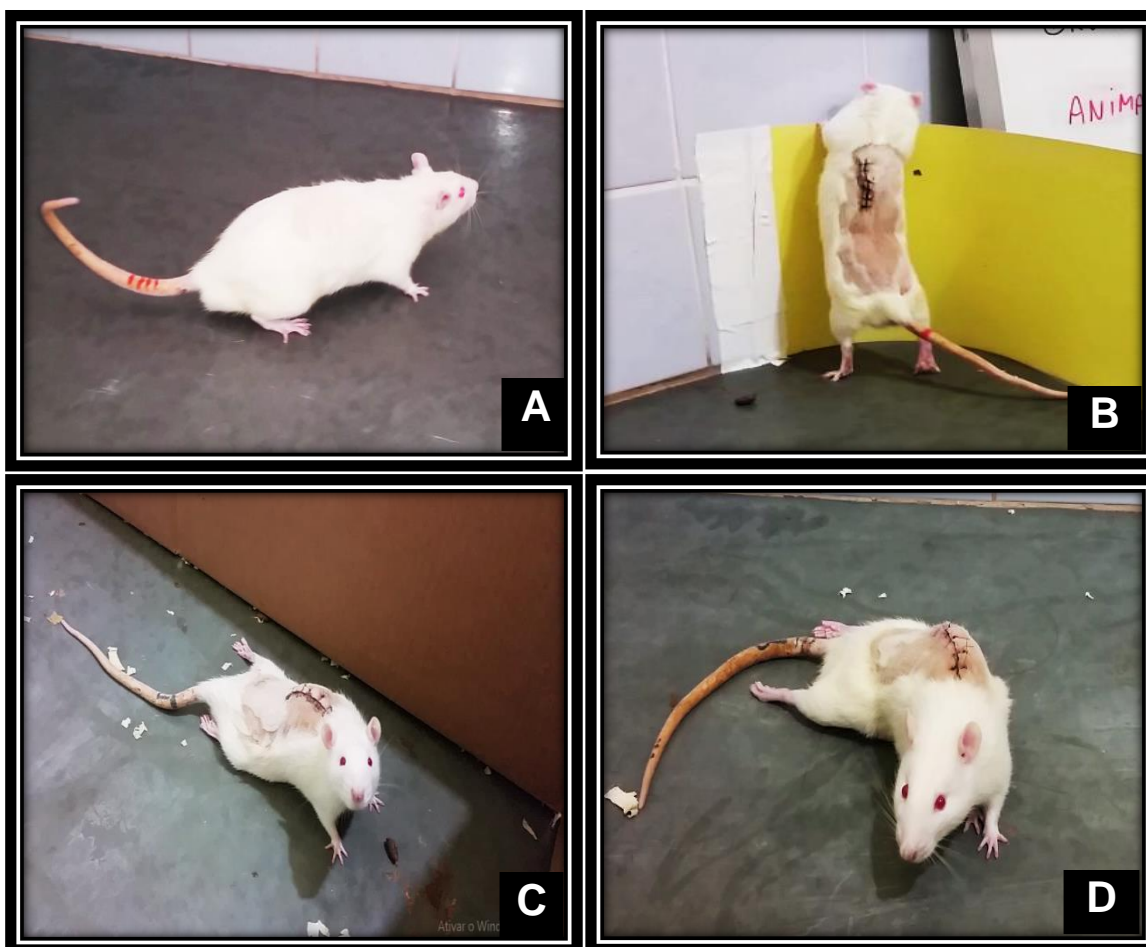


Figura 8: Fotografias da avaliação da capacidade motora de ratos *Wistar* em campo aberto para classificação da deambulação em escores baseado na escala BBB. **A)** Animal um dia antes da intervenção cirúrgica, classificado no escore 21, com sustentação de peso nos quatros membros e cauda elevada. **B)** Animal do controle negativo um dia após o procedimento cirúrgico de laminectomia, sem trauma medular, classificado no escore 21, com sustentação de peso sobre os membros pélvicos. **C e D)** Animais do grupo controle positivo após trauma medular agudo compressivo, apresentando paraplegia e cauda baixa tocando o solo, classificados em escore zero.

Dois segmentos da medula espinhal foram coletados após dissecação da coluna vertebral. O primeiro segmento, 2,0 cm craniais ao epicentro da lesão compressiva ou à região de laminectomia (animais do grupo CN), foi acondicionado em tubo plástico siliconizado²² e imediatamente congelado à - 20°C até o processamento para análises de quantificação de EROs e avaliação de peroxidação lipídica. O segundo segmento, 1,0 cm caudal ao epicentro da lesão compressiva ou região de laminectomia, foi coletado e acondicionado em tubos plásticos siliconizados livres de

²² - Microtubo 2ml tipo Eppendorf - Unisciense do Brasil.

RNase/DNase²³ e imediatamente congelado a -80°C até o processamento para extração de RNA e avaliação de expressão gênica de fatores relacionados à apoptose por qRT-PCR.

3.12 - Análises laboratoriais

As análises hematológicas e de bioquímica plasmática foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da EV-UFMG para avaliação dos efeitos sistêmicos da ω -conotoxina MVIIC e do dantrolene. A quantificação de EROs, avaliação da peroxidação lipídica e extração de RNA foram realizadas no Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa-BH (IEP-Santa Casa). A avaliação da expressão gênica de Bax, caspase-3, caspase-8 e caspase-9 foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal II da Escola de Veterinária da UFMG.

3.12.1 - Avaliação hematológica

O hemograma foi realizado em contador eletrônico²⁴ utilizando-se 1,0 ml de sangue total colhido em tubo com EDTA a 10%. Foram realizadas as contagens de hemácias, hemoglobina e leucócitos totais. O volume globular (VG) foi determinado utilizando-se centrifuga pela técnica do microhematócrito²⁵ e quantificação em tabela padrão. Os esfregaços sanguíneos foram realizados em lâminas de vidro²⁶ (26x76 mm) e corados com Panótipo Rápido²⁷ para subsequente contagem de plaquetas. Refratômetro analógico portátil²⁸ foi utilizado para estimar as proteínas totais.

3.12.2 - Avaliação de bioquímica plasmática

Para avaliação da bioquímica plasmática, 2,0 ml de sangue total coletados em tubo siliconizado sem anticoagulante foram centrifugados para separação do soro. As análises foram realizadas por método colorimétrico cinético²⁹, por meio de aparelho analisador bioquímico³⁰, seguindo protocolo de *kits* comerciais³¹. Foram dosadas as atividades da fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e as concentrações da proteína total, albumina, ureia e creatinina.

23 - Microtubo 2ml tipo Eppendorf - RNases e DNases free- Uniscience do Brasil.

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

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

26 - Lâminas para microscopia não lapidada, Exacta, SOS Lab, Belo Horizonte, MG, Brasil.

27 - Panótico Rápido LB, Laborclin Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil.

28 - Megabrix Refratômetro, Curitiba, PR, Brasil.

29 - TP Analyser basic®- Thermo Plate.

30 - Cobas Mira® - Roche.

31 - Biosystems S.A. Barcelona, CT, Espanha

3.12.3 - Quantificação de EROs por ensaio fluorimétrico DCF-DA

Para análise dos níveis intracelulares de EROs por meio da técnica de diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA), foi utilizado o fragmento congelado a -20°C da medula espinhal coletado cranial ao epicentro da lesão ou da região de laminectomia.

Os níveis de 2', 7'- diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA) foram determinados como indicadores da produção de peróxido dos componentes celulares pela técnica de espectrofluorimetria. O DCF-DA é uma molécula que atravessa as membranas celulares por difusão passiva. Este método de análise baseia-se na desacetilação da sonda DCF-DA e sua oxidação subsequente por EROs, gerando um composto altamente fluorescente (Jakubowski e Bartosz, 2000; Loetchutinat *et al.*, 2005). Com a adição de 750 µL de solução TRIS-HCL³² e homogeneização em sonificador por dois minutos, o tecido foi centrifugado a 2.500 rpm a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo para posterior análise da peroxidação lipídica. Para o ensaio, dois ml de solução PBS foram colocados em uma cubeta de acrílico, em seguida adicionou-se 5 µL de tecido. Realizou-se a leitura de fluorescência (excitação 502nm, emissão 523nm) em aparelho espectrofluorímetro³³. A taxa de aquisição foi de uma leitura por segundo em temperatura controlada à 37°C, em um tempo de 380 segundos de leitura, sendo que após estabelecer a linha de base em 30 segundos, ocorreu a adição de 2 µL a 40 nM (nanomolar) de DCF-DA para quantificação de EROs.

3.12.4 - Avaliação da peroxidação lipídica por método TBARS

Para avaliação da peroxidação lipídica foi utilizado o fragmento congelado a -20°C de medula espinhal coletado cranial ao epicentro da lesão ou da região de laminectomia, por meio da reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico (TBA) em altas temperaturas. Tal ensaio quantifica o malondialdeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica de membranas celulares por meio de reação com o TBA. Este método consiste na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea que é quantificado no espectrofotômetro. O ensaio para avaliar a lipoperoxidação foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ohkawa, Ohishi e Yagi, 1979.

Para tal avaliação, uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi incubado com 500 µL de solução tampão de ácido acético em pH 3,4, 200 µL de solução SDS 8,1%, 100 µL de água e 500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8% durante 90 minutos à 95°C. A leitura espectrofotométrica do conteúdo de MDA foi realizada em espectrofotômetro³⁴ no comprimento de onda de 532 nm após o resfriamento das amostras.

32 - TRIS hydrochloride- Sigma Aldrich, MerckKGaA, Darmstadt, Germany.

33 - Shimadzu - modelo RF-5301.

34- Shimadzu- modelo UVmini -124

3.12.5 - Avaliação da expressão gênica de Bax, caspase-3, caspase-8 e caspase-9 por qRT-PCR em tempo real

Para realização da técnica qRT-PCR, foi utilizado o fragmento congelado a -80°C da medula espinhal coletado caudal ao epicentro da lesão compressiva ou região de laminectomia. Foi avaliada a expressão gênica de proteases mediadoras primárias da apoptose (caspase-3, caspase-8, caspase-9) e de proteínas pró-apoptóticas (Bax). Os *primers* das proteases e proteínas relacionadas à apoptose³⁵ e da proteína constitutiva beta-actina³⁶, utilizada como normalizadora, estão relacionados no quadro 3.

Quadro 3: Genes e sequências de nucleotídeos dos *primers* iniciadores para qRT-PCR

Gene	Sequência de nucleotídeos
Caspase-3	Forward: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA Reverse: CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT
Caspase-8	Forward: TAAGACCTTTAAGGAGCTTCATTTTGA Reverse: AGGATACTAGAACCTCATGGATTTGAC
Caspase-9	Forward: TGGAGGAGGCTGACCCGGCAA Reverse: CCACAGCTCCGCGACTTGCA
Bax	Forward: CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC Reverse: AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA
Beta actina	Forward: GCGTCCACCCGCGAGTACAA Reverse: ACATGCCGGAGCCGTTGTC

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

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

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

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

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

3.12.5.1 - Extração do RNA

A extração de RNA se deu em três fases: homogeneização, separação de fases e isolamento, sendo que em cada uma delas foram utilizados reagentes específicos. Inicialmente, as amostras foram retiradas do freezer -80°C e acomodadas em gelo para permitir o descongelamento. Adicionou-se a cada amostra o reagente Trizol³⁷ em uma proporção de 3:1, com posterior homogeneização em aparelho Tissue Lyser II³⁸ na frequência de 30Hz por 2 minutos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio livre de RNAses, feita inversões do tubo vigorosamente com as mãos durante 15 segundos e incubação do material por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida o material foi centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C para formação de três fases distintas. A fase superior (aquosa) contendo o RNA foi pipetada e transferida para um novo tubo RNAase *free*. Foi adicionado 0,5 ml de isopropanol 100% absoluto livre de RNAses para precipitação do RNA. Feita incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e posterior centrifugação a 12000 xg, a 4°C, por 10 minutos. Formou-se um precipitado no fundo do tubo, o sobrenadante foi descartado por inversão cuidadosa do tubo. O precipitado foi lavado com 1,0 ml de etanol a 75%. A amostra foi centrifugada a 7500 xg por cinco minutos a 4°C, em seguida descartou-se o sobrenadante e a lavagem com etanol foi repetida. Os tubos foram colocados para secar em temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos. Após a secagem, foi adicionado ao RNA precipitado 75 µL de água livre de RNase³⁹ e feita homogeneização por repetidas pipetagens. Retirado 0,5 µL para quantificação de RNA em aparelho espectrofotômetro⁴⁰, a concentração final foi dada em ng/ µL. O restante da amostra de RNA foi congelado a -80°C para posterior confecção do DNA complementar (cDNA).

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

Foi utilizado o *kit* QuantiFast SYBR Green RT-qPCR⁴¹ para realização das reações no aparelho 7900HT Fast Real Time PCR System⁴² com o auxílio da plataforma ABI Prism 7900HT. Para a preparação das amostras, foi utilizada uma solução contendo 12,5 µL de SYBR Green e 1 µL de ROX presentes no *kit*, 7,5 µL de água ultrapura, 1 µL do *primer forward* e 1 µL do *primer reverse* de cada gene estudado, individualmente. Adicionados 2 µL do cDNA, com volume final de 25 µL em cada poço da placa de cultura. A placa foi selada com adesivo óptico e em seguida centrifugada a 1 xg por 1 minuto.

37- Trizol – Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil.

38- Tissue Lyser II- Qiagen.

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

40- Nanovue plus- GE Lifescience.

41- Qiagen.

42- Applied Biosystems.

As reações foram realizadas em duplicatas e as condições de ciclos de amplificação foram 30 minutos a 48°C para transcriptase reversa, 10 minutos a 95°C para ativação enzimática, seguidos de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação da fita dupla e um minuto a 60°C para anelamento e extensão dos *amplicons*.

O *7500 Software v 2.1*⁴³ apresentou as curvas de amplificação gênica em relação ao número de ciclos, sendo o ciclo limiar, ou *threshold* (CT), o ciclo em que se inicia a amplificação da amostra. Assim, o CT permite determinar quantos ciclos são necessários para início da amplificação da sequência gênica alvo presente no DNA de cada amostra e, quanto maior a expressão de um determinado gene, mais cópias foram sintetizadas em ciclos iniciais e menor foi o CT. O delta CT (Δ CT) foi determinado pela subtração do CT do gene pesquisado pelo CT do gene normalizador beta actina. O delta delta CT ($\Delta\Delta$ CT) foi determinado pela diferença entre o Δ CT e a média do Δ CT do grupo controle negativo. A expressão gênica relativa ou *fold change* (FC) de cada gene foi calculada utilizando-se o método do $2^{-\Delta\Delta$ CT (Livak e Schmittgen, 2001).

4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado. Os dados hematológicos e de bioquímica plasmática foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Student-Newman-Keuls (SNK) e Duncan. Para as variáveis que não atingiram as premissas para ANOVA foi utilizada a análise de Kruskal Wallis. Para avaliação da capacidade motora, expressa em escores, foram utilizados os testes de Friedman e Kruskal Wallis. A análise de EROs, de peroxidação lipídica e a expressão gênica de fatores relacionados a apoptose foram submetidas a ANOVA, após transformação dos dados quando necessário. Os dados foram analisados pelos programas estatísticos InfoStat versão 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016) e SAS *Statistical Analysis System* versão 9.0. Adotou-se nível de significância de 5% nas análises ($p < 0,05$).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Modelo experimental de trauma medular agudo

O modelo experimental de TMA empregado com o aparelho estereotático MASCIS *Impactor*, utilizando a queda livre da haste de 10 gramas à altura de 25 mm induziu um trauma medular classificado como grave (Agrawal *et al.*, 2010) em todos os animais. A escolha do grau de impacto se baseou na casuística da prática clínica, pois a maioria dos pacientes que são atendidos com trauma medular é acometida por lesão com essa intensidade, tanto em seres humanos (Tator, 1995;

43- Applied Biosystems.

Sekhon e Fehlings, 2001) quanto em pequenos animais (Mendes e Arias, 2012; Park, White e Tieber, 2012). Outra ponderação foi o fato de traumas de intensidade leve a moderada permitirem recuperação precoce e espontânea em ratos (Agrawal *et al.*, 2010), o que poderia dificultar a avaliação da eficácia dos tratamentos efetuados. A utilização do aparelho MASCIS *Impactor* produziu de forma eficiente e padronizada, lesão aguda à medula espinhal, pois todos os animais submetidos ao trauma apresentaram alterações deambulatórias uniformes no período pós-cirúrgico, assim como observado por Coelho (2016) e Azevedo (2018).

Os animais da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar* constituem modelo experimental de trauma medular compressivo viável e de baixo custo. Em todo o período pós-operatório os animais não apresentaram alterações comportamentais que indicassem dor ou estresse, o que mostra que os protocolos de analgesia preventiva e pós-operatória foram adequados. Todos toleraram de forma satisfatória a manipulação para avaliações diárias e aplicações medicamentosas. As feridas cirúrgicas não apresentaram sinais de inflamação, infecção, nem deiscência de pontos. A laminectomia foi realizada pelo mesmo cirurgião em todos os animais, sem causar lesão medular, visto que todos os animais do grupo CN apresentaram deambulação normal após o procedimento.

Este modelo experimental tem contribuído para melhor compreensão da fisiopatogenia e dos efeitos de diversos tratamentos no TMA, seja por meio de testes comportamentais e análises laboratoriais como avaliação hematológica e bioquímica plasmática, estresse oxidativo e expressão gênica de fatores relacionados à apoptose (Lavor, 2013; Oliveira, 2014; Coelho, 2016; Azevedo, 2018), como pela avaliação anatomopatológica de lesões medulares, quantificação de corpos neuronais por imunohistoquímica e identificação de morte celular *in situ* pela técnica de TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidil Transferase Uracil Nick End Labeling*), com resultados importantes para a continuidade da linha de pesquisa em trauma medular (Torres, 2008; Costa, 2010; Martins, 2012; Oliveira, 2012; Silva, 2013; Rosado *et al.*, 2014).

5.2 - Tratamentos

A escolha da ω -conotoxina MVIIC para o tratamento do TMA foi devido ao seu efeito potente e seletivo em bloquear os CCVD tipo P e Q (Liu *et al.*, 1996; McDonough *et al.*, 1996), mecanismo importante para evitar a progressão das lesões secundárias. Quanto à via e ao tempo de administração, a realização do tratamento, por via intratecal, uma hora após o trauma, foi adotada baseada no estudo de Oliveira (2014), que observou melhor efeito neuroprotetor da ω -conotoxina MVIIA com essa metodologia, se comparada ao modelo de tratamento intralesional, que não promoveu resultados favoráveis à neuroproteção. Foi realizado treinamento para aplicações intratecais antes do início da experimentação animal, sendo considerada uma via de simples execução e segura.

Estudos realizados com o dantrolene para tratamento de TMA demonstraram efeitos neuroprotetores utilizando-se a dose de 10mg/kg, pela via intraperitoneal, imediatamente à injúria (Aslan *et al.*, 2009) ou 1 hora após (Costa, 2010; Torres *et al.*, 2010; Torres, 2014; Martins *et al.*, 2018). Neste estudo, optou-se pela mesma dose e via, sendo a aplicação intraperitoneal considerada de fácil execução e confortável para os animais.

A eutanásia realizada oito dias após o trauma permitiu acompanhar a evolução clínica e foi baseada no critério dos picos de morte celular por apoptose secundária ao TMA, que ocorrem nos tempos de 8, 24 horas e sétimo dia após a injúria inicial (Lu, Ashwell e Waite, 2000), visando verificar o efeito neuroprotetor dos tratamentos sobre os picos de apoptose.

Vários estudos avaliaram os efeitos neuroprotetores do dantrolene (Aslan *et al.*, 2009; Costa, 2010; Torres *et al.*, 2010 e Martins *et al.*, 2018) e da ω -conotoxina MVIIC (Imaizumi, Kocsis e Waxman, 1999; Oliveira *et al.*, 2014); porém, não há dados na literatura sobre o possível efeito neuroprotetor da associação desses dois medicamentos. Uma vez que a ω -conotoxina MVIIC inibe o influxo de cálcio pelos CCVD e o dantrolene inibe o efluxo desse íon nos receptores de rianodina, considerou-se que o uso dessas medicações associadas possa aumentar o efeito terapêutico com resultados favoráveis no TMA.

5.3 - Avaliação da função motora em campo aberto

A avaliação da função motora dos animais em campo aberto foi considerada de fácil execução e de baixo custo. Trata-se de avaliação não invasiva e que não representou condição de estresse aos animais. Possibilitou a avaliação das características funcionais e graduação dos déficits neurológicos de acordo com os movimentos das articulações, coordenação dos membros, estabilidade do tronco e posicionamento da cauda e patas. Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade, correspondendo ao escore máximo de 21 dentro da escala BBB com marcha coordenada consistente, pata paralela ao corpo, cauda elevada e tronco estável (Basso, Beattie e Bresnahan, 1995).

No primeiro dia após a laminectomia, os animais dos grupos CP, T, D, T+D, submetidos ao TMA, apresentaram média de escores 0, 0, 0,5 e 0,5 respectivamente, sem diferença estatística entre eles, o que mostra padronização da lesão para avaliação dos tratamentos. Todos os animais do grupo CN, mantiveram o escore máximo 21 após o procedimento cirúrgico, indicando que a laminectomia não causou danos ao tecido medular à apresentação clínica. Em outros estudos, também não foram verificados *deficits* neurológicos em animais submetidos apenas à laminectomia (Costa, 2010; Torres *et al.*, 2010; Fukushima, 2012; Lavor, 2013; Coelho, 2016; Azevedo, 2018; Martins *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018).

Ao avaliar a capacidade motora dos animais submetidos ao TMA isoladamente em cada grupo, entre o primeiro e o sétimo dia de tratamento, observou-se diferença significativa em todos os protocolos utilizados, evidenciando que todos os animais apresentaram algum grau de recuperação, com melhora gradativa ao longo dos dias, seja de forma espontânea como no CP ou por efeito do tratamento (Tab. 1).

No grupo CP, que recebeu PBS, houve recuperação discreta a partir do quarto dia que se manteve progredindo até o último dia da avaliação. A recuperação espontânea pode ocorrer em consequência do retorno funcional de axônios fisiologicamente afuncionais, porém

anatomicamente viáveis, em meio ao tecido danificado (Olby *et al.*, 2008), o que explicaria a melhora desses animais não tratados.

Animais tratados com a MVIIC de forma isolada (T) apresentaram recuperação mais sutil a partir do quinto dia. Nos grupos D e T+D, houve recuperação já no segundo dia, com escores de deambulação mais elevados no grupo que recebeu dantrolene isoladamente, progressivos até a última avaliação. Ressalta-se que os animais dos grupos D e T+D não apresentaram diferença estatística em relação ao sétimo dia, já no quarto dia de avaliação, enquanto os outros grupos não diferem apenas no quinto dia, evidenciando que animais tratados com dantrolene apresentaram recuperação mais precoce.

Há controvérsias na literatura sobre o efeito neuroprotetor do dantrolene na recuperação clínica dos animais. Costa (2010) observou efeito semelhante ao descrito neste estudo após administração isolada e em dose única, e observação clínica prolongada de 31 dias, ao contrário de Torres (2008), que não verificou esse efeito na recuperação motora, porém notou discreta tendência de recuperação sensorial, através do teste de sensibilidade dolorosa superficial, aos oito dias, e nos estudos morfológicos, detectou maior preservação do tecido neuronal pela técnica de TUNEL.

Tabela 1 - Valores das medianas e (rank) do escore BBB de deambulação em campo aberto dos sete dias de avaliação, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$)

Dia	1	2	3	4	5	6	7
CN	21a (4,00)	21a (4,00)	21a (4,00)	21a (4,00)	21a (4,00)	21a (4,00)	21a (4,00)
CP	0ab (2,25)	0a (2,25)	0abc (2,63)	0,5cd (3,38)	1de (4,75)	1e (6,13)	2,5e (6,13)
T	0a (2,75)	0abcd (3,63)	0abc (3,63)	0ab (3,63)	0,5bcde (4,50)	0,5bcde (4,50)	1e (5,38)
D	0,5a (1,88)	1ab (2,50)	1,5abc (3,88)	2,5cd (4,63)	3cd (4,63)	3d (5,13)	3,5d (5,88)
T+D	0,5a (1,25)	1abc (3,13)	0,5ab (3,13)	1abcd (4,00)	1,5bcd (4,88)	1,5d (4,88)	1,5d (5,75)

Rosado e colaboradores (2014) testaram o efeito neuroprotetor do dantrolene de forma isolada ou em associação com metilprednisolona, e também não observaram diferença significativa entre os grupos tratados e o controle na recuperação motora em nenhum dos dias de avaliação. Em contrapartida, Aslan e colaboradores (2009) observaram que a administração de dantrolene em coelhos, imediatamente após o trauma medular, resultou em melhora significativa na função

motora, 24 horas após a injúria. Esta diferença no tempo de recuperação pode ser devido ao trauma menos grave, visto que os animais um dia após o trauma apresentaram-se com paraparesia, e não paraplégicos, como no presente estudo. Além disso, os pesquisadores avaliaram a capacidade motora dos animais pela escala proposta por Tarlov e Klinger (1954), que provavelmente é menos precisa e mais subjetiva que a escala BBB, pois sua classificação é dada em apenas cinco escores, logo, pequenas variações podem não ser contabilizadas.

Quanto à MVIIC, Oliveira e colaboradores (2014) também relataram melhora da capacidade motora ao longo dos sete dias de avaliação de ratos submetidos a TMA, no entanto sem diferença significativa em relação ao grupo controle negativo ao final da avaliação. Contudo, a dose, o tempo e a via de aplicação foram diferentes, pois utilizaram 15pmol de MVIIC por via intralesional, cinco minutos após o trauma.

Já a comparação da capacidade motora, entre os grupos traumatizados, após sete dias de avaliação, não evidenciou diferença, porém observou-se que o grupo D foi também semelhante ao grupo CN. Esse dado indica que os animais do grupo D apresentaram melhor recuperação motora (Tab.2).

A associação do dantrolene com a MVIIC não mostrou efeito sinérgico na diminuição da manifestação dos déficits neurológicos (Fig.9). Apesar desses fármacos reduzirem por diferentes vias o aumento de Ca^{2+} intracelular, não houve potencialização do efeito neuroprotetor com a associação dos mesmos.

Tabela 2 - Valores das medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, aos sete dias, de ratos submetidos à laminectomia (CN) e trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Medianas seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$)

	CN	CP	T	D	T+D
Medianas no dia 7	21 ^b	2,5 ^a	1 ^a	3,5 ^{ab}	1,5 ^a

Todavia, dados na literatura demonstraram o efeito protetor do dantrolene em diversas associações. Martins e colaboradores (2018) observaram recuperação significativa da função motora apenas no grupo tratado com dantrolene em associação com outro bloqueador de canal de cálcio, o riluzol, aos sete dias de tratamento. Torres (2014) associou dantrolene com células tronco mesenquimais no tratamento do TMA e verificou recuperação funcional significativa em relação ao grupo controle positivo a partir do 25º dia de observação.

Outras avaliações utilizando o tecido medular foram empregadas com o objetivo de avaliar a neuroproteção conferida pelos tratamentos e identificar as possíveis vias que determinaram a recuperação motora, mesmo que discreta, dos grupos tratados, assim como a recuperação mais rápida e melhor do grupo D.

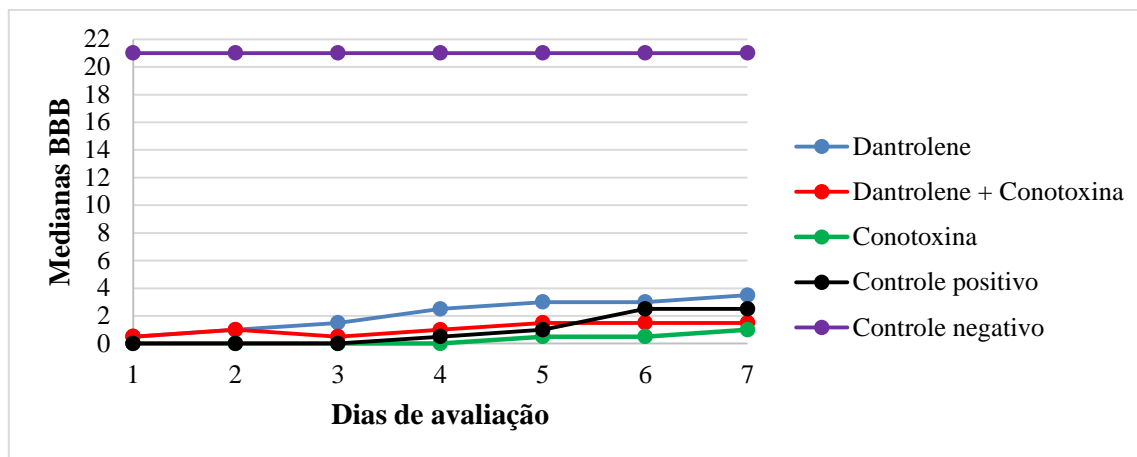


Figura 9: Valores de medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação

5.4 - Avaliação hematológica

Os valores hematológicos de todos os grupos permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (Thrall *et al.*, 2012) e não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Fig. 10). Estes resultados sugerem que a dose de 20pmol de ω -conotoxina MVIIC e 10mg/kg de dantrolene não ocasionaram efeitos tóxicos sobre a medula óssea, local de produção dos elementos sanguíneos, nem promoveram aumento no consumo dos mesmos, até oito dias após suas aplicações. Tais achados corroboram com Oliveira (2012) e Azevedo (2018) que não encontraram alterações nos valores hematológicos em estudos de TMA em ratos tratados com ω -conotoxina MVIIC, assim como Torres (2008) e Martins (2012), utilizando o dantrolene em monoterapia ou em associação com outros bloqueadores de canais de cálcio.

5.5 - Avaliação bioquímica

As concentrações plasmáticas de ureia e creatinina foram analisadas para a avaliação da função renal dos animais (Fig. 11). Os valores de ureia apresentaram-se acima do limite fisiológico em todos os grupos, sem diferença estatística entre eles. A ureia, diferentemente da creatinina, pode ter sua concentração plasmática alterada devido a fatores extrarenais, como por exemplo, ingestão de dietas protéicas, resultando em produção aumentada de amônia e, conseqüentemente, síntese aumentada de ureia pelo fígado, o que poderia justificar os achados em todos os grupos, visto que todos os animais receberam a mesma ração, sem restrição de quantidade. Os valores de creatinina apresentaram-se dentro dos limites fisiológicos (Quesenberry e Carpenter, 2012; Thrall *et al.*, 2012) em todos os grupos; no entanto, os grupos D e T+D apresentaram valores mais elevados com diferença estatística entre os grupos. Os valores de creatinina dentro da normalidade sugerem que a dose de 20pmol de ω -conotoxina MVIIC não ocasionou efeitos deletérios aos rins até oito

dias pós-tratamento. Porém, os valores mais altos desse analito observados nos grupos tratados com dantrolene, podem sugerir uma tendência a danos renais pelo medicamento, fato não observado por Torres (2008) e Martins (2012), que empregaram o mesmo fármaco, com a mesma dose e pela mesma via de aplicação.

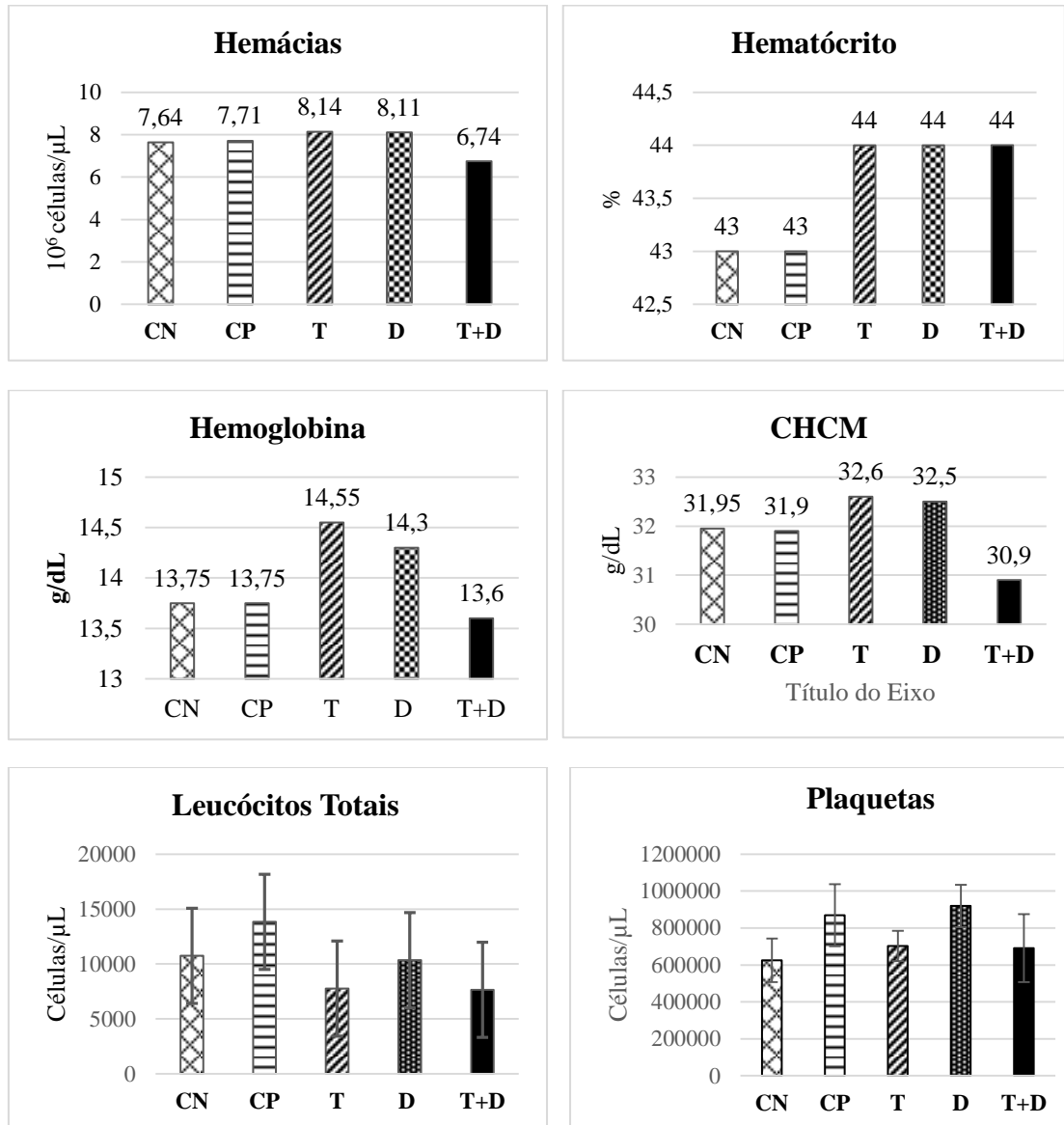


Figura 10: Valores das medianas de hemácias, hematócrito, hemoglobina e CHGM e valores médios e desvios padrão dos leucócitos e plaquetas de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. **Hemácias** $p=0,4240$: CN (7,64); CP (7,71); T (8,14); D (8,11); T+D (6,74). **Hematócrito** $p= 0,9931$: CN (43,00); CP (43,00); T (44,00); D (44,00); T+D (44,00). **Hemoglobina** $p=0,6642$: CN (13,75); CP (13,75); T (14,55); D (14,30); T+D (13,60). **CHGM** $p=0,0551$: CN (31,95); CP (31,90); T (32,60); D (32,50); T+D (30,90). **Leucócitos** $p= 0,2150$: CN (10750,00±4330,90); CP (13837,50±5337,48); T (7762,50±3257,30); D (10350,00±4346,26); T+D (7650,00±1302,56). **Plaquetas** $p=0,04$:CN (625000±58682,76); CP (869000±83974,20); T (702500±41096,43); T+D (691250±91876,16).

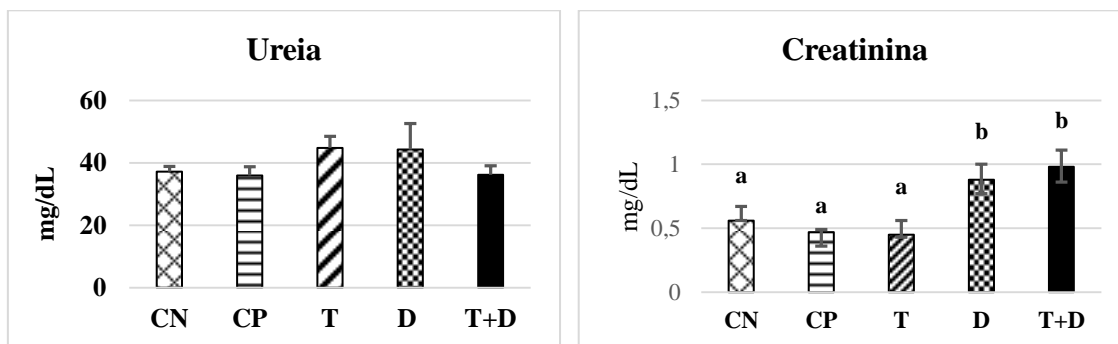


Figura 11: Valores médios e desvios padrão de ureia e creatinina de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. **Ureia** $p=0,4109$: CN ($37,23 \pm 1,64$); CP ($35,96 \pm 2,76$); T ($44,79 \pm 3,70$); D ($44,29 \pm 8,33$); T+D ($36,13 \pm 2,92$). **Creatinina** $p=0,0001$: CN ($0,56 \pm 0,05$); CP ($0,47 \pm 0,01$); T ($0,45 \pm 0,05$); D ($0,88 \pm 0,06$); T+D ($0,98 \pm 0,07$).

Para avaliação da função hepática dos animais, foram analisadas as atividades das enzimas FA, AST, ALT, e as concentrações das proteínas totais e albumina. Os valores de FA apresentaram-se dentro dos limites fisiológicos em todos os grupos, porém os grupos CN, CP e T apresentaram valores superiores àqueles dos grupos D e T+D com diferença estatística entre os grupos. Os valores de AST, ALT, proteínas totais e albumina apresentaram-se dentro dos valores fisiológicos em todos os grupos (Quesenberry e Carpenter, 2012; Thrall *et al.*, 2012), sem diferença estatística entre os mesmos (Fig. 12).

A fosfatase alcalina é uma enzima presente nas membranas de vários tipos celulares, como osteoblastos, epitélio biliar, renal e intestinal, podendo sofrer alterações em suas concentrações plasmáticas por diversos fatores (Thrall *et al.*, 2012). Variações em suas concentrações nos grupos estudados sem alterações concomitantes de ALT e AST, enzimas hepáticas mais específicas, não indicam efeito deletério ao fígado.

Os valores de FA, ALT, AST, proteínas totais e albumina dentro da normalidade sugerem que a dose de 20pmol de ω -conotoxina MVIIC e 10mg/kg de dantrolene não ocasionaram lesões hepáticas até oito dias pós-tratamento, portanto podem ser consideradas seguras para tratamento em ratos. A ausência de alterações hepáticas corrobora com os dados da literatura que afirmam que o dantrolene é um fármaco seguro quando utilizado em doses terapêuticas tanto em monoterapia (Torres, 2008) quanto em associação (Martins, 2012), assim como a ω -conotoxina MVIIC, utilizada por Oliveira (2012) e Azevedo (2018) em diversas doses por via intralesional e intratecal, respectivamente.

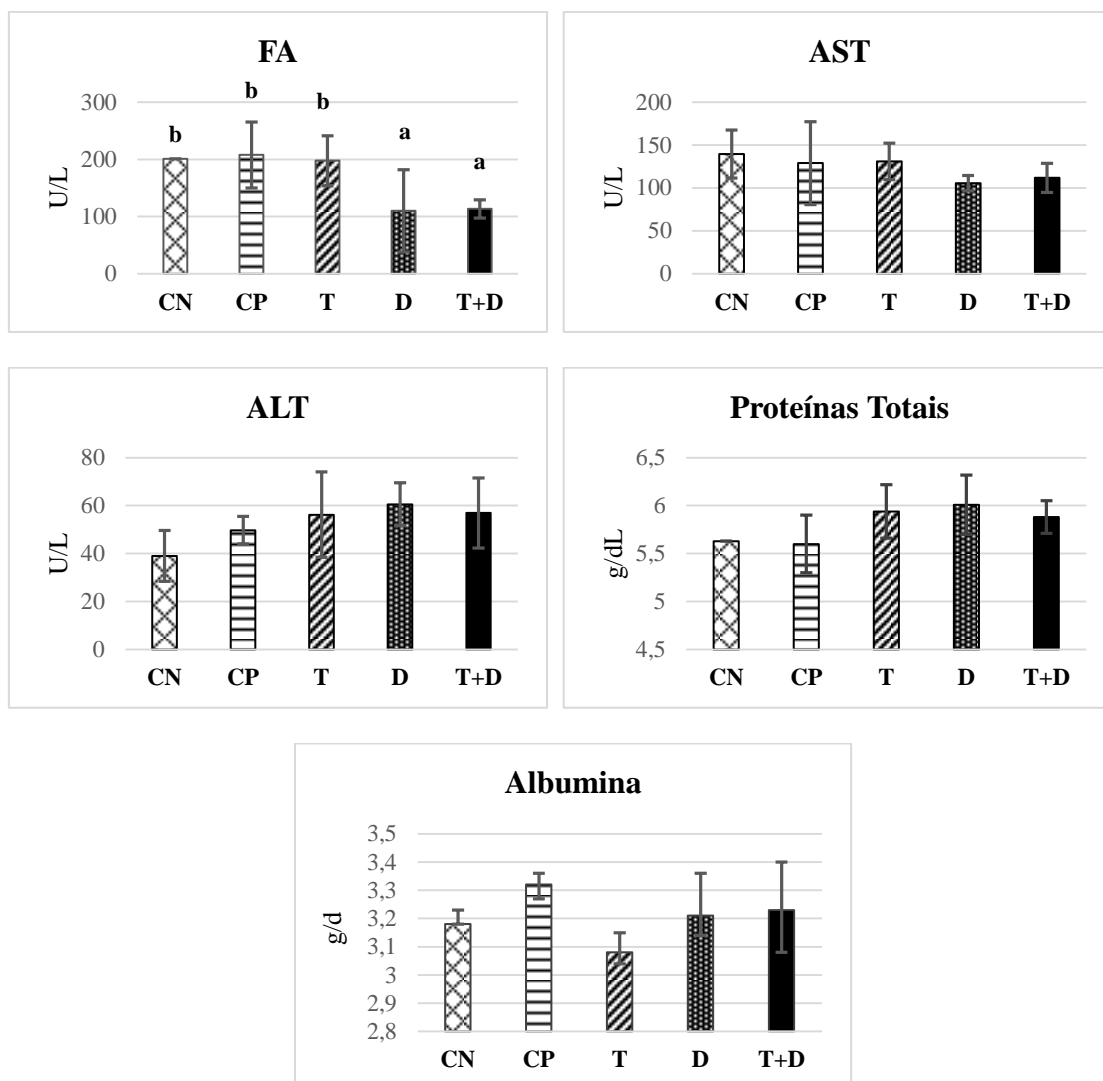


Figura 12: Valores médios e desvios padrão dos valores de FA, AST, ALT, proteínas totais e albumina de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. **FA** $p=0,177$: CN ($200,75 \pm 28,78$); CP ($207,75 \pm 21,80$); T ($197,75 \pm 36,05$); D ($110,00 \pm 7,94$); T+D ($113,50 \pm 16,24$). **AST** $p=0,3801$: CN ($139,40 \pm 14,01$); CP ($128,95 \pm 24,13$); T ($131,84 \pm 10,67$); D ($105,45 \pm 4,48$); T+D ($111,78 \pm 8,47$). **ALT** $p=0,1644$: CN ($39,04 \pm 5,32$); CP ($49,75 \pm 2,87$); T ($56,21 \pm 8,93$); D ($60,57 \pm 4,46$); T+D ($60,57 \pm 7,33$). **Proteínas totais** $p=0,1923$: CN ($5,53 \pm 0,15$); CP ($5,60 \pm 0,14$); T ($5,94 \pm 0,16$); D ($6,01 \pm 0,09$); T+D ($5,88 \pm 0,15$). **Albumina** $p=0,0972$: CN ($3,18 \pm 0,03$); CP ($3,32 \pm 0,02$); T ($3,08 \pm 0,03$); D ($3,21 \pm 0,08$); T+D ($3,23 \pm 0,09$)

5.6 - Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os níveis intracelulares de EROs não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. No entanto, observou-se valor discretamente menor nos grupos tratados em relação ao grupo CP, o que sugere uma tendência a menor produção de EROs nos animais tratados com MVIIC e dantrolene (Fig. 13).

Tal observação é ratificada pelos achados de Oliveira (2014), que verificou redução significativa na produção de EROs com o uso de outra ω -conotoxina, a MVIIA, dantrolene ou sua associação, sendo a maior diminuição pelo grupo MVIIA. Azevedo (2018) também verificou redução significativa na produção de EROs com a utilização de ω -conotoxina, a MVIIC, após o TMA de ratos, porém aplicada em doses e tempos diferentes. Esses estudos, portanto, mostraram a capacidade das conotoxinas e do dantrolene em diminuir a produção de radicais livres, o que não pode ser confirmado por este estudo.

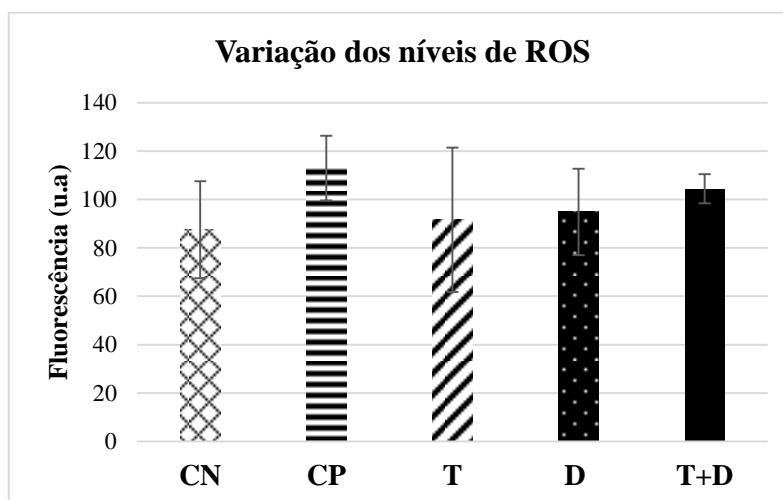


Figura 13: Valores médios e desvios padrão da variação dos níveis de EROs de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$). No grupo **CN** observou-se média de 87,53 e desvio padrão de 20,04; no grupo **CP**, observou-se média de 112,95 e desvio padrão de 13,32; no grupo **T**, observou-se média de 91,57 e desvio padrão de 29,85; no grupo **D**, observou-se média de 94,88 e desvio padrão de 17,88; no grupo **T+D** observou-se média de 104,42 e desvio padrão de 5,97

5.7 - Peroxidação lipídica

Os níveis de malondialdeído (MDA) resultantes da peroxidação lipídica de membranas celulares não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. No entanto, todos os grupos tratados apresentaram níveis menores de MDA em relação ao grupo CP, sobretudo o grupo D com menor variação, indicando algum efeito dos tratamentos sobre a peroxidação lipídica (Fig. 14).

Azevedo (2018), em seu estudo com a MVIIC, também não observou diferença nos níveis de MDA entre os grupos. No entanto, Oliveira (2014) observou capacidade de redução da lipoperoxidação pela MVIIA, secundária à inibição significativa da produção de EROs, o que não foi observado nesse estudo.

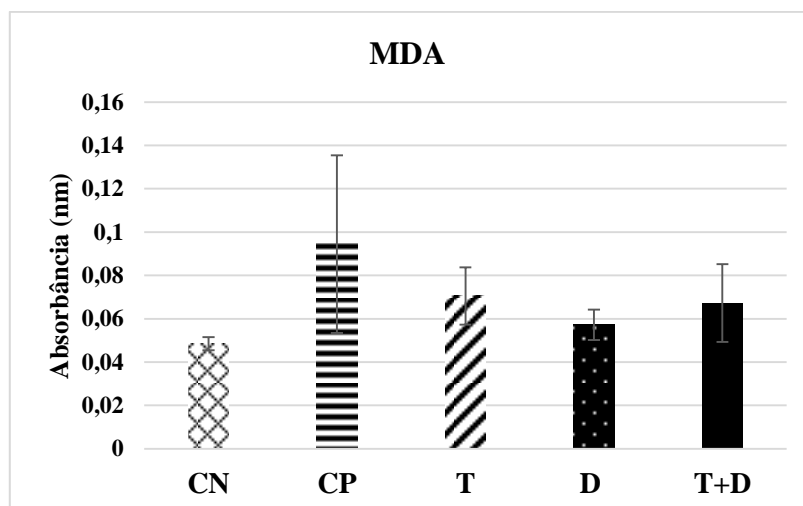


Figura 14: Valores médios e desvios padrão dos níveis de malondialdeído (MDA) resultantes da peroxidação lipídica de membranas celulares de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$). No grupo **CN** observou-se média de 0,048 e desvio padrão de 0,003; no grupo **CP**, observou-se média de 0,094 e desvio padrão de 0,041; no grupo **T**, observou-se média de 0,070 e desvio padrão de 0,013; no grupo **D**, observou-se média de 0,057 e desvio padrão de 0,007; no grupo **T+D** observou-se média de 0,067 e desvio padrão de 0,017

A inibição da peroxidação lipídica e propriedades antioxidantes do dantrolene foram relatadas por Aslan e colaboradores (2009), que constataram significativa diminuição da lipoperoxidação em amostras de sangue total e líquido cerebrospinal de coelhos tratados imediatamente após o trauma medular, além de melhora nos sistemas de defesa endógeno antioxidante enzimático e não enzimático. Tal inibição não foi vista neste estudo, uma possível explicação seria a diferença do momento de aplicação do dantrolene e tipo de trauma realizado.

Outra linha de pesquisa, relatou as mesmas propriedades antioxidantes e diminuição do estresse oxidativo com o uso do dantrolene, conferindo efeito radioprotetor em ratos. Em 2003, Büyükkuroğlu e colaboradores relataram o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e diminuição significativa dos níveis de MDA em ratos previamente tratados com 5mg/kg de dantrolene e submetidos à irradiação, além de prevenção na diminuição da contagem de leucócitos e plaquetas, o que torna o dantrolene um medicamento valioso para pacientes oncológicos submetidos à radioterapia.

A peroxidação lipídica é um dos mecanismos mais prejudiciais que se desenvolvem após o TMA, resulta no rompimento de membranas celulares e liberação de subprodutos como o MDA (Seligman *et al.*, 1977), quantificado neste experimento. A atenuação dos efeitos secundários do TMA por meio de menor ativação de receptores glutamínérgicos, diminuição do influxo de Ca^{2+} , menor produção de EROs e aumento da atividade enzimática antioxidante está diretamente relacionada com a diminuição da peroxidação lipídica (Azbill *et al.*, 1997).

Todos os grupos tratados apresentaram níveis de EROs e MDA menores que o grupo CP, evidenciando uma tendência a menor estresse oxidativo aos oito dias pós TMA. Entre os tratamentos, o grupo D apresentou menor peroxidação lipídica, o que pode ser justificado por um possível efeito antioxidante do dantrolene, propriedade demonstrada em trabalhos anteriores (Büyükokuroğlu *et al.*, 2003; Aslan *et al.*, 2009).

5.8 - Expressão de fatores relacionados à apoptose

Os valores da expressão gênica relativa dos genes caspase 3 (Fig. 15), caspase 8 (Fig. 16), caspase 9 (Fig. 17) e Bax (Fig. 18) não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos controle e tratados.

Resultado diferente foi visto por Oliveira e colaboradores (2014), que relataram redução significativa da expressão gênica da caspase 3, em amostras de medula sob condições isquêmicas tratadas pela MVIIC. Azevedo (2018) observou redução significativa também da expressão gênica da caspase 8 e 9, nos grupos tratados com a conotoxina, com a mesma dose, porém com aplicações pós TMA em tempos diferentes do presente estudo.

Quanto ao dantrolene, Torres (2014) relatou aos 30 dias pós TMA de ratos, diminuição significativa da expressão de fatores pró-apoptóticos Bax, caspase 3 e 9 em grupos tratados com o fármaco na mesma dose e via de aplicação. No entanto, o tempo de análise do tecido medular no presente estudo foi realizado mais precocemente, o que pode explicar a diferença nos achados e sugerir superexpressão desses fatores na fase aguda do trauma medular, visto que a morte por apoptose inicia-se nas primeiras horas após a injúria e pode ser vista em quantidades decrescentes por várias semanas (Zhang *et al.*, 2012).

A proteína pró-apoptótica Bax apresentou maior expressão gênica relativa no grupo D seguido do grupo T (Fig. 17). Tal achado pode explicar a maior expressão de caspases iniciadoras (8 e 9) e efetoras (3) nesses mesmos grupos, visto que tal proteína funciona como ativadora da cascata apoptótica, assim como também inibe proteínas antiapoptóticas (Brasileiro Filho, 2004).

Outros estudos utilizaram o dantrolene, a MVIIC e associações no tratamento do TMA em ratos e avaliaram, pela técnica de TUNEL, a fragmentação de DNA e consequentemente a morte de células neuronais (Torres *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2018). Todos estes estudos apresentaram resultados favoráveis quanto à diminuição da morte neuronal nos grupos tratados. Vale ressaltar que, a técnica marca células que sofreram clivagem do DNA, alterações vistas tanto no processo de necrose como no de apoptose, não sendo específica para um ou outro fenômeno de morte celular. Para tal diferenciação, faz-se necessária a avaliação de achados morfológicos distintos como condensação da cromatina e corpos apoptóticos, ou realização de outra técnicas como eletroforese do DNA em gel de agarose e microscopia eletrônica (Charriaut-Marlangue e Ben-Ari, 1995; Grasl-Kraupp *et al.*, 1995).

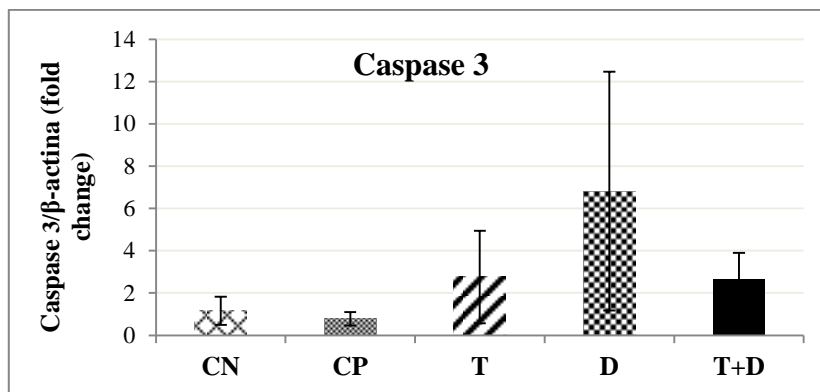


Figura 15: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa da protease Caspase 3, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,173$). No grupo **CN** observou-se média de 1,1575 e desvio padrão de 0,661; no grupo **CP**, observou-se média de 0,7775 e desvio padrão de 0,314; no grupo **T**, observou-se média de 2,7600 e desvio padrão de 2,190; no grupo **D**, observou-se média de 6,82 e desvio padrão de 5,644; no grupo **T+D** observou-se média de 2,6475 e desvio padrão de 1,257

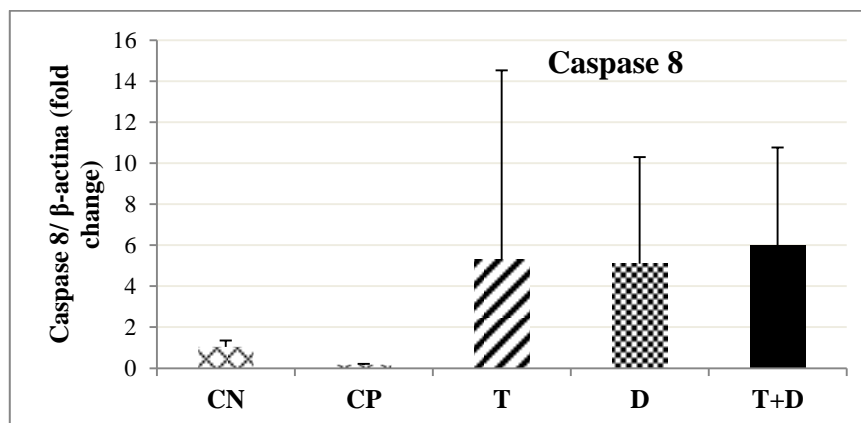


Figura 16: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa da protease Caspase 8, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,299$). No grupo **CN** observou-se média de 1,035 e desvio padrão de 0,317; no grupo **CP**, observou-se média de 0,165 e desvio padrão de 0,046; no grupo **T**, observou-se média de 5,302 e desvio padrão de 9,221; no grupo **D**, observou-se média de 5,097 e desvio padrão de 5,194; no grupo **T+D** observou-se média de 5,986 e desvio padrão de 4,786

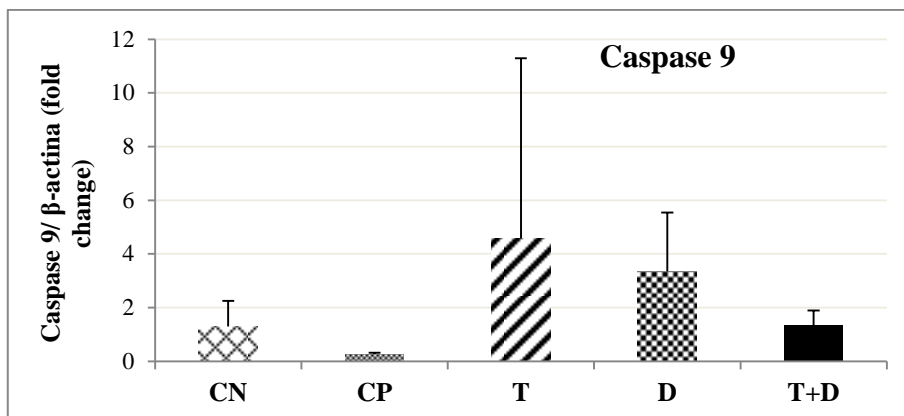


Figura 17: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa da protease Caspase 9, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,248$). No grupo **CN** observou-se média de 1,295 e desvio padrão de 0,951; no grupo **CP**, observou-se média de 0,270 e desvio padrão de 0,054; no grupo **T**, observou-se média de 4,587 e desvio padrão de 6,707; no grupo **D**, observou-se média de 3,347 e desvio padrão de 2,201; no grupo **T+D** observou-se média de 1,340 e desvio padrão de 0,554

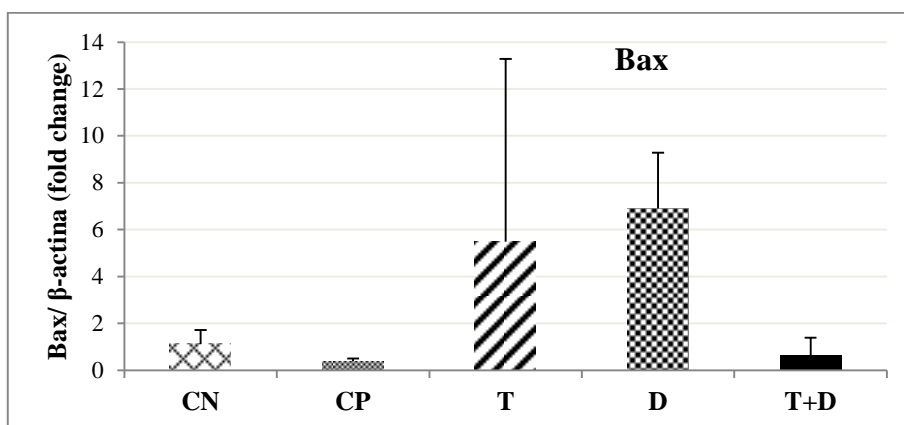


Figura 18: Valores médios e desvios padrão da expressão gênica relativa da proteína pro-apoptótica Bax, de ratos *Wistar* submetidos à laminectomia (CN) e ao trauma medular, tratados ou não com MVIIC e dantrolene, de forma isolada ou em associação. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,456$). No grupo **CN** observou-se média de 1,117 e desvio padrão de 0,597; no grupo **CP**, observou-se média de 0,382 e desvio padrão de 0,112; no grupo **T**, observou-se média de 5,487 e desvio padrão de 7,804; no grupo **D**, observou-se média de 6,907 e desvio padrão de 2,380; no grupo **T+D** observou-se média de 0,635 e desvio padrão de 0,758

Uma tendência maior de expressão gênica relativa das caspases e da proteína Bax observada nos grupos tratados deste estudo sugere ocorrência maior de morte por apoptose se comparados com o resultado visto no grupo CP, que apresentou menor expressão, talvez por neste grupo ter ocorrido morte celular por necrose em maior magnitude.

Uma vez que a célula sofre agressão, a ativação do processo apoptótico, início do desenvolvimento de necrose ou sua sobrevivência, vai depender da intensidade e qualidade da injúria e da extensão das lesões secundárias. Considerando a apoptose como um processo que ocorre em células menos danificadas, capazes de ativar esse processo ativo, e que não promove reações inflamatórias no local, esse fenômeno é preferível à morte celular por necrose.

A necrose, além de ocorrer no momento do TMA, devido à lesão primária, pode ser iniciada e mantida por resposta inflamatória exacerbada e alterações isquêmicas com liberação de substâncias citotóxicas. Nessas condições, observa-se necrose progressiva do tecido medular (Zhang, Krebs e Guth, 1997), impedindo a possibilidade de reparação eficaz do tecido.

Nesse raciocínio, mais estudos são necessários para diferenciar o tipo de morte prevalente em cada grupo submetido ao TMA e tratados com PBS, MVIIC, dantrolene e suas associações, seja por técnicas imunoistoquímicas ou avaliações histológicas.

Finalmente, um fator limitante para resultados mais específicos do efeito de cada tratamento, sobre eventos secundários do TMA como excitotoxicidade e morte por apoptose, pode ter sido o número amostral limitado neste estudo, visto que o comportamento de cada grupo apresentou tendências semelhantes.

6 - CONCLUSÃO

A ω -conotoxina MVIIC (20 pmol/10 μ L) aplicada por via intratecal e o fármaco dantrolene (10mg/kg) aplicado por via intraperitoneal em dose única, associados ou em monoterapia, não produziram efeitos colaterais sistêmicos e podem ser utilizados de forma segura em ratos.

O dantrolene, em dose única de 10mg/kg, pela via intraperitoneal, melhorou a recuperação motora dos animais com TMA após oito dias de avaliação.

Os tratamentos com ω -conotoxina MVIIC e/ou dantrolene não diminuíram o estresse oxidativo e nem foram capazes de gerar estímulos anti-apoptóticos, indicando que a associação não apresentou efeito farmacológico sinérgico no tratamento do TMA.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, G.; KERR, C.; THAKOR, N. V.; ALL, A. H. Characterization of graded multicenter animal spinal cord injury study contusion spinal cord injury using somatosensory-evoked potentials. *Spine*, v. 35(11), p. 1122-1127, 2010.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32(9), p. 1053-1061, 1999.

ANDREWS, K. Intraperitoneal (IP) injection in rats and mice. *UBC Animal Care Guidelines*, p. 1-6, 2014.

ARIAS, M. V. B.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Spinal cord trauma in dogs and cats: revision of pathophysiology and medical treatment. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, p. 115-134, 2007.

ASLAN, A.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M. E.; ALTUNBAS, K.; BAS, O.; YURUMEZ, Y.; COSAR, M. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. *Europe Spine Journal*, v.18, p. 1442-1451, 2009.

AZEVEDO, S. C. *Ômega conotoxina MVIIC no tratamento do trauma medular agudo em ratos Wistar*. 2018. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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*, v. 765(2), p. 283-290, 1997.

BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, v. 23(3-4), p. 318-334, 2006.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma*, v.12, p. 1-21, 1995.

BASSO, D. M. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities and controversies. *Journal of Neurotrauma*, v. 21(4), p. 395-404, 2004.

BEATTIE, M. S.; FAROOQUI, A. A.; BRESNAHAN, J. C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, v. 17(10), p. 915-925, 2000.

BEATTIE, M. S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends in Molecular Medicine*, v. 10(12), p. 580-583, 2004.

- BINGHAM, J. P.; MITSUNAGA, E.; BERGERON, Z. L. Drugs from slugs - Past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chemico-Biological Interactions*, v.183, p. 1-18, 2010.
- BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15(6), p. 725-731, 2003.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, v. 39(11), p. 615-647, 2003.
- BOWERSOX, S. S.; SINGH, T.; LUTHER, R. R. Selective blockade of N-type voltage-sensitive calcium channels protects against brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, v. 747(2), p. 343-347, 1997.
- BOWERSOX, S. S.; LUTHER, R. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon*, v. 36(11), p.1651-1658, 1998.
- BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia Geral. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004, 367p.
- BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S.; TODD, F. D.; NOYES, D. H. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Experimental Neurology*, v. 95(3), p. 548-570, 1987.
- BURNS, L. H.; JIN, Z.; BOWERSOX, S. S. The neuroprotective effects of intrathecal administration of the selective N-type calcium channel blocker ziconotide in a rat model of spinal ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, v. 30(2), p. 334-343, 1999.
- BÜYÜKOKUROĞLU, M. E.; TAYSI, S.; KOÇ, M.; BAKAN, N. Dantrolene protects erythrocytes against oxidative stress during whole-body irradiation in rats. *Cell Biochemistry and Function*, v. 21(2), p. 127-131, 2003.
- CASHA, S.; YU, W.; FEHLINGS, M. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, v. 103(1), p. 203-218, 2001.
- CASTILHO, R. F.; WARD, M. W.; NICHOLLS, D. G. Oxidative stress, mitochondrial function and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 72(4), p. 1394-1401, 2001.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; BEN-ARI, Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *NeuroReport*, v. 7(1), p. 61-64, 1995.
- CHOI, D. W. Excitotoxic Cell Death. *Journal of Neurobiology*, v. 23(9), p. 1261-1276, 1992.

COELHO, M. P. R. C. *Efeito neuroprotetor da toxina pha1β recombinante no trauma medular agudo em ratos*. 2016. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. *Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais - Conceitos e procedimentos recomendados*. Brasília: Copyright, 2013, 62p.

COSTA, P. M. *Avaliação anátomo-clínica do dantroleno sódico no trauma medular agudo experimental em ratos por período prolongado*. 2010. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COUGHLAN, A. R. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. *Journal of Small Animal Practice*, v. 34, p. 117-122, 1993.

CRUZ, L. J.; GRAY, W. R.; YOSHIKAMI, D.; OLIVERA, B. M. Conus Venoms: A rich source of neuroactive peptides. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, v. 4(2), p. 107-132, 1985.

CUZZOCREA, S.; GENOVESE, T. Role of free radicals and poly (ADP-Ribose) polymerase-1 in the development of spinal cord injury: new potential therapeutic targets. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15(5), p. 477-487, 2008.

DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews*, v. 102(12), p. 4489-4500, 2002.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, v. 10(9), p. 369-377, 2000.

DE SOUZA, A. H.; CASTRO, C. J.; RIGO, F. K.; DE OLIVEIRA, S. M.; GOMEZ, R. S.; DINIZ, D. M.; BORGES, M. H.; CORDEIRO, M. N.; SILVA, M. A. R.; FERREIRA, J.; GOMEZ, M. V. An evaluation of the antinociceptive effects of Pha1β, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer* and ω-Conotoxin MVIIA, a cone snail *Conus magus* Toxin, in rat model of inflammatory and neuropathic pain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 33(1), p. 59-67, 2012.

DI RIENZO J. A.; CASANOVES F.; BALZARINI M. G.; GONZALEZ L.; TABLADA M.; ROBLEDO C. W. InfoStat versión 2016. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, v. 209, p. 378-388, 2008.

DUMONT, R. J.; OKONKWO, D. O.; VERMA, S.; HURLBERT, R. J.; BOULOS, P. T.; ELLEGALA, D. B.; DUMONT, A. S. Acute spinal cord injury, Part I: Pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, v. 24, p. 254-264, 2001.

DYKES, M. H. M. Evaluation of a muscle relaxant: dantrolene sodium (Dantrium). *JAMA*, v. 231(8), p.862-864, 1975.

EMERY, E.; ALDANA, P.; BUNGE, M. B.; PUCKETT, W.; SRINIVASAN, A.; KEANE, R. W.; BETHEA, J.; LEVI, A. D. O. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, v. 89(6), p. 911-920, 1998.

FEHLINGS, M. G.; TATOR, C. H.; LINDEN, R. D. The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, v. 71(3), 403-416, 1989.

FEHLINGS, M. G.; NGUYEN, D. H. Immunoglobulin G: A potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *Journal Clinical Immunology*, v. 30, p. 109-112, 2010.

FISKUM, G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *Journal of Neurotrauma*, v. 17(10), p. 843-855, 2000.

FLEMING, J. C.; NORENBURG, M. D.; RAMSAY, D. A.; DEKABAN, G. A.; MARCILLO, A. E.; SAENZ, A. D.; PASQUALE-STYLE, M.; DIETRICH, D.; WEAVER, L. C. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, v. 129(12), p. 3249-3269, 2006.

FLETCHER, D. J.; DEWEY, C. W.; DA COSTA, R. C. Traumatismo da coluna vertebral e/ou medula. Em: Curtis Wells Dewey e Ronaldo Casimiro da Costa. *Neurologia canina e felina- guia prático*. 3ª ed., p. 481-494, 2017.

FORD, R. W. J.; MALM, D. N. Failure of nimodipine to reverse acute experimental spinal cord injury. *Central Nervous System Trauma*, v. 2(1), p. 9-16, 1985.

FRANSEN, A.; SCHOUSBOE, A. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca²⁺ release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, v. 56(3), p. 1075-1078, 1991.

FUKUSHIMA, F.B. *Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol e etomidato em ratos submetidos ao trauma medular espinhal*. 2012. 85p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GLAHN, K. P. E.; ELLIS, F. R.; HALSALL, P. J.; MULLER, C. R.; SNOECK, M. M. J.; URWYLER, A.; WAPPLER, F. Recognizing and managing a malignant hyperthermia crisis: guidelines from the European Malignant Hyperthermia Group. *British Journal of Anaesthesia*, v. 105(4), p. 417-420, 2010.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondria: Ignition chamber for apoptosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 68(2), p. 227-231, 1999.

- GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. In situ detection of fragmented dna (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*, v. 21(5), p. 1465-1468, 1995.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, v. 281(5381), p. 1309-1312, 1998.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Apoptosis: programmed cell death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, p. 335-334, 2007.
- GUHA, A.; TATOR, C. H.; PIPER, I. Increase in rat spinal cord blood flow with the calcium channel blocker, nimodipine. *Journal of Neurosurgery*, v.63(2), p. 250-259, 1985.
- HALL, A. P.; HENRY, J. A. Acute toxic effects of “Ecstasy” (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. *British Journal of Anaesthesia*, v. 96(6), p. 678-685, 2006.
- HANNON, H. E.; ATCHISON, W. D. Omega-conotoxins as experimental tools and therapeutics in pain management. *Marine Drugs*, v. 11, p. 680-699, 2013.
- HARRISON, G. G. Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *British Journal of Anaesthesia*, v. 47(1), p. 62-65, 1975.
- HILLYARD, D. R.; MONJE, V. D.; MINTZ, I. M.; BEAN, B. P.; NADASDI, L.; RAMACHANDRAN, J.; MILJANICH, G.; AZIMI-ZOONOOZ, A.; MCINTOSH, J. M.; CRUZ, L. J.; IMPERIAL, J. S.; OLIVERA, B. M. A. New conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron*, v. 9, p. 69-77, 1992.
- HOLTZ, A.; NYSTROM, B.; GERDIN, B. Spinal cord injury in rats: inability of nimodipine or anti-neutrophil serum to improve spinal cord blood flow or neurologic status. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 79(6), p. 460-467, 1989.
- HOVDA, D. A.; FU, K.; BADIE, H.; SAMII, A.; PINANONG, P.; BECKER, D. P. Administration of an omega-conopeptide one hour following traumatic brain injury reduces calcium accumulation. *Acta Neurochirurgica*, v. 60, p.521-523, 1994.
- IMAZUMI, T.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S. G. The role of voltage-gated Ca²⁺ channels in anoxic injury of spinal cord white matter. *Brain Research*, v. 817(1-2), p. 84-92, 1999.
- INAN, S.; WEI, H. The Cytoprotective effects of dantrolene: A ryanodine receptor antagonist. *Anesthesia e Analgesia*, v.111 (6), p. 1400-1410, 2010.
- JAKUBOWSKI, W.; BARTOSZ, G. 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biology International*, v. 24, p. 757-760, 2000.

KOLB, M. E.; HORNE, M. L.; MARTZ, R. Dantrolene in human malignant hyperthermia - A multicenter study. *Anesthesiology*, v. 56(4), p. 254-262, 1982.

KRASSIOUKOV, A. V.; ACKERY, A.; SCHWARTZ, G.; ADAMCHIK, Y.; LIU, Y.; FEHLINGS, M. G. An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Research Protocols*, v. 10(2), p. 60-68, 2002.

KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M. U.; FIEGE, M.; WEIBHORN, R.; WAPPLER, F. Dantrolene - A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*, v. 59, p. 364-373, 2004.

KUBE, S. A.; OLBY, N. J. Managing acute spinal cord injuries. *Compendium*, p. 496-506, 2008.

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

LAVOR, M. S. L. *Efeito do etomidato na isquemia e no trauma medular agudo em ratos*. 2013. 147p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIU, N.; ZHANG, Y. P.; TITSWORTH, W. L.; JIANG, X.; HAN, S.; LU, P.; SHIELDS, C. B.; XU, X. A Novel role of phospholipase A₂ in mediating spinal cord secondary injury. *Annals of Neurology*, v. 59, p. 606-619, 2006.

LIU, H.; DE WAARD, M.; SCOTT, V. E. S.; GURNETT, C. A.; LENNONI, V. A.; CAMPBELL, K. P. Identification of three subunits of the high affinity ω -conotoxin MVIIC-sensitive Ca²⁺ channel. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271(23), p. 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(4), p. 402-408, 2001.

LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; MEESUNGNOEN, J.; JAY-GERIN, J.; MANKHETKORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2,7-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 72, p. 323-331, 2005.

LU, J.; ASHWELL, K. W. S.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury role of apoptosis. *Spine*, v. 25(14), p. 1859-1866, 2000.

MARTINS, B. D. C.; TORRES, B. B. J.; MARTINS, G. De CARO; MELO, E. G. Evaluation of the motor capacity of rats, in an open field, submitted to acute spinal cord trauma and treated with the association of riluzole and dantrolene. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, v. 30, p. 496-499, 2011.

MARTINS, B. D. C. *Efeitos da associação do riluzol ao dantrolene em ratos submetidos ao trauma medular agudo*. 2012. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS, B. D. C.; TORRES, B. B. J.; OLIVEIRA, K. M.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, C. M. O.; FUKUSHIMA, F. B.; ROSADO, I. R.; DE MELO, E. G. Association of riluzole and dantrolene improves significant recovery after acute spinal cord injury in rats. *The Spine Journal*, v.18(3), p. 532-539, 2018.

MATALIOTAKIS, G. I.; TSIRIKOS, A. I. Spinal cord trauma: pathophysiology, classification of spinal cord injury syndromes, treatment principles and controversies. *Orthopaedics and trauma*, v. 30(5), p. 369-452, 2016.

MCDONOUGH, S. I.; SWARTZ, K. J.; MINTZ, I. M.; BOLAND, L. M.; BEAN, B. P. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by ω -conotoxin MVIIC. *The Journal of Neuroscience*, v. 76(8), p. 2612-2623, 1996.

MCDONOUGH, S. I.; BOLAND, L. M.; MINTZ, I. M.; BEAN, B. P. Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *The Journal of General Physiology*, v. 119(4), p. 313-328, 2002.

MENDES, D. S.; ARIAS, M. V. B. Traumatismo da medula espinhal em cães e gatos: estudo prospectivo de 57 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32(12), p. 1304-1312, 2012.

MESTRE, C.; PÉLISSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 32(4), p. 197-200, 1994.

MIR, R.; KARIN, S.; KAMAL, M. A.; WILSON, C. M.; MIRZA, Z. Conotoxins: structure, therapeutic potential and pharmacological applications. *Current Pharmaceutical Design*, v. 22, p. 582-589, 2016.

MODY, I.; MACDONALD, J. F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 16(10), p. 356-359, 1995.

NEHRT, A.; RODGERS, R.; SHAPIRO, S.; BORGENS, R.; SHI, R. The critical role of voltage-dependent calcium channel in axonal repair following mechanical trauma. *Neuroscience*, v. 146(4), p. 1504-1512, 2007.

NELSON, T. E. Halothane effects on human malignant hyperthermia skeletal muscle single calcium-release channels in planar lipid bilayers. *Anesthesiology*, v. 76, p. 588-595, 1992.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 22(8), p. 299-306, 1997.

NOBLE, L. J.; DONOVAN, F.; IGARASHI, T.; GOUSSEV, S.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *Journal of Neuroscience*, v. 22 (17), p. 7526-7535, 2002.

NSCISC. National Spinal Cord Injury Statistical Center, Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2018. Disponível em www.nscisc.uab.edu. Acessado em novembro de 2018.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 2, p. 351-358, 1979.

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

OLBY, N. J.; PARKE, N.; SPINAPOLIS, J. W.; HUMPHREY, J. W.; MEHTA, P. M.; HARRIS, T.; PAPICH, M.; SHI, R.; SMITH, D. Phase 1 - Clinical trial of 4-aminopyridine derivatives in dogs with chronic myelopathies. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 22(722), 2008.

OLBY, N. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *Veterinary Clinical Small Animal*, v. 40, p. 791-807, 2010.

OLIVERA, B. M.; GRAY, W. R.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J. M.; VARGA, J.; RIVIER, J.; DE SANTOS, V.; CRUZ, L. J. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*, v. 230 (4732), p. 1338-1343, 1985.

OLIVERA, B. M.; TEICHERT, R. W. Diversity of the neurotoxic conus peptides: A model for concerted pharmacological discovery. *Molecular Interventions*, v. 7(5), p. 251-260, 2007.

OLIVEIRA, K. M. *Efeitos de diferentes doses de ω -conotoxina MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo*. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, K. M. *ω -conotoxina MVIIA isolada ou associada ao dantrolene sódico no trauma medular agudo em ratos*. 2014. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, K. M.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, C. M. O.; FUKUSHIMA, F. B.; ROSADO, I. R.; SILVA, J. F.; MARTINS, B. C.; GUIMARAES, L. B.; GOMEZ, M. V.; MELO, M. M.; MELO, E. G. Omega-conotoxin MVIIC attenuates neuronal apoptosis in vitro and improves significant recovery after spinal cord injury in vivo in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v.7, p.3524-3536, 2014.

OLIVEIRA, K. M.; BINDA, N. S.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, C. M. O.; FUKUSHIMA, F. B.; ROSADO, I. R.; TAGUCHI, T. M.; ALVES, E. G. L.; MELO, M. M.; GOMEZ, M. V.; MELO, E.

G. Aplicação intralésional da ω - conotoxina MVIIA no trauma medular em ratos. *Ciência Rural*, v.46(1), p.150-156, 2016.

OLIVEIRA, K. M.; BINDA, N. S.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, C. M. O.; ROSADO, I. R.; GABELLINI, E. L. A.; DA SILVA, J. F.; OLIVEIRA, C. M.; MELO, M. M.; GOMEZ, M. V.; MELO, E. G. Conotoxin MVIIA improves cell viability and antioxidant system after spinal cord injury in rats. *Plos One*, v. 13(10), p. 1-26, 2018.

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

PARK, E. H.; WHITE, G. A.; TIEBER, L. M. Mechanisms of injury and emergency care of acute spinal cord injury in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 22(2), p. 160-178, 2012.

PARK, E.; VELUMIAN, A. A.; FEHLINGS, M. G. The Role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *Journal of Neurotrauma*, v. 21(6), p. 754-774, 2004.

PEREZ-PINZON, M. A.; YENARI, M. A.; SUN, G. H.; KUNIS, D. M.; STEINBERG, G. K. SNX-111, a novel, presynaptic N-type calcium channel antagonist, is neuroprotective against focal cerebral ischemia in rabbits. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 153(1), p. 25-31, 1997.

PINHEIRO, A. C. DO N.; DA SILVA, A. J.; PRADO, M. A. M.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; BATISTA, M. C.; CASTRO JUNIOR, C. J.; MASSENSINI, A. R.; GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M. A.; KUSHMERICK, C.; GOMEZ, M. V. Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus*, v. 19(11), p. 1123-1129, 2009.

QUESENBERRY, K. E; CARPENTER, J. W. Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery. 3ª ed. Elsevier, 2012, 600 p.

ROSADO, I. R.; LAVOR, M. S. L.; ALVES, E. G. L.; FUKUSHIMA, F. B.; OLIVEIRA, SILVA, C. M. O.; CALDEIRA, F. M. C.; COSTA, P. M.; MELO, E. G. Effects of methylprednisolone, dantrolene and their combination on experimental spinal cord injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 7(8), p. 4617-4626, 2014.

ROWLAND, J. W.; HAWRYLUK, G. W. J.; KWON, B.; FEHLINGS, M. G. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus*, v. 25(5), p. 1-17; 2008.

SCHNEIDERBANGER, D.; JOHANNSEN, S.; ROEWER, N.; SCHUSTER, F. Management of malignant hyperthermia: diagnosis and treatment. *Therapeutics and Clinical Risk management*, v. 10, p. 355-362, 2014.

SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M. G. Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole. *Spinal Cord Trauma: Regeneration, Neural Repair and Functional Recovery. Progress in Brain Research*, v. 137, p. 177-190, 2002.

SEKHON, L. H. S.; FEHLINGS, M. G. Epidemiology, demographics and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v. 26, p. 2-12, 2001.

SELIGMAN, M. L.; FLAMM, E. S.; GOLDSTEIN, B. D.; POSER, R. G.; DEMOPOULOS, H. B.; RANSOHOFF, J. Spectrofluorescent detection of malonaldehyde as a measure of lipid free radical damage in response to ethanol potentiation of spinal cord trauma. *Lipids*, v. 12(11), p. 945-950, 1977.

SIYAVASH, S.; HAGUIGHI, D. V. M.; BAHRAM, B.; CHEHRAZI, M. D.; FRANKLIN, C.; WAGNER JR., M. D. Effect of nimodipine-associated hypotension on recovery from acute spinal cord injury in cats. *Surgical Neurology*, v. 29(4), p. 293-297, 1988.

SILVA, C. M. O. *Condroitinase abc e células tronco mesenquimais no tratamento de rattus norvegicus submetidos a trauma agudo da medula espinhal*. 2013. 80p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, C. M. O.; OLIVEIRA, K. M.; LAVOR, M. S. L.; SILVA, J. F.; ROSADO, I. R.; TAGUCHI, T. M.; FUKUSHIMA, F. B.; CALDEIRA, F. M. C.; TORRES, B. B. J.; MILANI, P. F.; AZEVEDO, S. C.; MOTTA, G. R.; SIANO, G. F.; GOES, A. M.; SERAKIDES, R.; MELO, E. G. Benefits of chondroitinase abc associated with mesenchymal stem cells in acute spinal cord injury in rats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.70(3), p.857-872, 2018.

SIMON, C. M.; SHARIF, S.; TAN, R. P.; LAPLACA, M. C. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *Journal of Neurotrauma*, v. 26(4), p. 563-574, 2009.

SMITH, P. M.; JEFFERY, N. D. Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury. *Brain Pathology*, v. 16(2), p. 99-109, 2006.

SNYDER, H. R.; DAVIS, C. S.; BICKERTON, R. K.; HALLIDAY, R. P. 1 - [5-Arylfurfurylidene) amino] hydantoins. A new class of muscle relaxants. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 10(5), p. 807-810, 1967.

TARLOV, I. M.; KLINGER, H. Spinal cord compression studies. II- Time Limits for Recovery After Acute Compression in Dogs. *A.M.A Archives of Neurology & Psychiatry*, v. 71(3), p. 271-290, 1954.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*, v. 75(1), p. 15-26, 1991.

TATOR, C. H. Epidemiology and general characteristics of the spinal cord injury patient. In: *Contemporary Management of Spinal Cord Injury*, cap. 2, p. 9-13, 1995.

TERLAU, H.; OLIVERA, B. M. Conus Venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, v. 84(1), p. 41-68, 2004.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Wiley-Blackwell, 2ªed., 2012, 776p.

TORRES, B. B. J. *Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular agudo experimental*. 2008. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TORRES, B. B. J. *Dantrolene e células tronco mesenquimais no tratamento do trauma medular agudo em ratos Wistar*. 2014. 80p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TORRES, B. B. J.; CALDEIRA, F. M. C.; GOMES, M. G.; SERAKIDES, R.; VIOTT, A. M.; BERTAGNOLLI, A. C.; FUKUSHIMA, F. B.; OLIVEIRA, K. M.; GOMES, M. V.; MELO, E. G. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 91, p. 530-536, 2010.

TSUTSUMI, Y.; YAMAMOTO, K.; MATSUURA, S.; HATA, S.; SAKAI, M.; SHIRAKURA, K. The treatment of neuroleptic malignant syndrome using dantrolene sodium. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 52(4), p. 433-438, 1998.

UCHITEL, O. D. Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon*, v.35(8), p. 1161-1191, 1997.

VALENTINO, K.; NEWCOMB, R.; GADBOIS, T.; SINGH, T.; BOWERSOX, S.; BITNER, S.; JUSTICE, A.; YAMASHIRO, D.; HOFFMAN, B. B.; CIARANELLO, R.; MILJANICH, G.; RAMACHANDRAN, J. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90(16), p. 7894-7897, 1993.

VANDER HEIDEN, M. G.; THOMPSON, C. B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology*, v. 1(8), p. 209-216, 1999.

VINK, R.; MCINTOSH, T. K.; DEMEDIUK, P.; FADEN, A. I. Decrease in total and free magnesium concentration following traumatic brain injury in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 149(2), p. 594-599, 1987.

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

XU, W.; CHI, L.; XU, R.; KE, Y.; LUO, C.; CAI, J.; QIU, M.; GOZAL, D.; LIU, R. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 43, p. 204-213, 2005.

ZHANG, N; YIN, Y.; XU, S.; WU, Y.; CHEN, W. Inflammation and apoptosis in spinal cord injury. *Indian Journal of Medical Research*, v. 135, p. 287-296, 2012.

ZHANG, Z.; KREBS, C. J.; GUTH, L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Experimental Neurology*, v. 143, p. 141-152, 1997.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *Physiology*, v. 19(3), p. 124-128, 2004.

ZUCCHI, R.; RONCA, S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacological Reviews*, v.49(1), p. 1-51, 1997.

8 - ANEXO

Anexo 1 : Certificado CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da ômega - conotoxina MVIIC associada ao dantrolene no trauma medular agudo de ratos", protocolo do CEUA: 368/2017 sob a responsabilidade de Eliane Goncalves de Melo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/02/2018.

Belo Horizonte, 23/03/2018.

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 - ceua@prpq.ufmg.br