

O exercício físico protege o equilíbrio dinâmico e coordenação motora de ratos tratados com vincristina

Physical exercise protects dynamic balance and motor coordination of rats treated with vincristine

Luiza Minato Sagrillo^{1*}, Viviane Nogueira de Zorzi², Luiz Fernando Freire Royes², Michele Rechia Figuera³, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman⁴, Maria Fernanda Manica Rizzi Cattani¹, Aron Ferreira da Silveira¹

1. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.
2. Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.
3. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.
4. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil.

RESUMO

Introdução: O exercício físico tem se mostrado um importante modulador do sistema antioxidante e neuroprotetor em diversas doenças e tratamentos que afetam o sistema nervoso central.

Objetivo: avaliar o efeito do exercício físico no equilíbrio, coordenação motora, atividade locomotora exploratória e no balanço oxidativo e imunológico de ratos tratados com Vincristina.

Métodos: 40 ratos adultos foram randomizados em dois grandes grupos: grupo exercício (6 semanas de natação, 1h/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga de 5% do peso corporal) e grupo sedentário. Após o protocolo de treinamento, os ratos foram tratados com uma dose semanal de 0,5mg/kg de sulfato de Vincristina (2 semanas) ou com a mesma dosagem de NaCl a 0,9%. Os testes comportamentais foram realizados 1 e 7 dias após cada dose de Vincristina. No dia 15 foram realizadas as análises bioquímicas do cerebelo.

Resultados: O exercício físico foi capaz de proteger contra a perda de equilíbrio e coordenação motora e teve efeito per se na atividade locomotora exploratória. Neutralizou o estresse oxidativo e reduziu o dano imunológico e de DNA causados pela Vincristina até 15 dias após o término do protocolo de treinamento.

Conclusão: observou-se que o treinamento físico prévio protege do dano motor induzido pela Vincristina.

Palavras-chave: Exercício Físico, Estresse Oxidativo, Neuroproteção, Cerebelo.

ABSTRACT

Introduction: Physical exercise has been shown to be an important modulator of the antioxidant system and neuroprotective in several diseases and treatments that affect the central nervous system.

Aim: to evaluate the effect of physical exercise in dynamic balance, motor coordination, exploratory locomotor activity and in the oxidative and immunological balance of rats treated with vincristine (VCR).

Methods: 40 adult rats were divided into two groups: exercise group (6 weeks of swimming, 1h/day, 5 days/week, with overload of 5% of body weight) and sedentary group. After training, rats were treated with 0.5mg/kg of vincristine sulfate for two weeks or with the same dose of 0.9% NaCl. The behavioral tests were conducted 1 and 7 days after each dose of VCR. On day 15 we carried out the biochemical analyzes of the cerebellum.

Results: The physical exercise was able to protect against the loss of dynamic balance and motor coordination and, had effect per se in the exploratory locomotor activity, and neutralize oxidative stress, damage DNA and immune damage caused by VCR up to 15 days after the end of the training protocol.

Conclusion: we observed that previous physical training protects of the damage motor induced by vincristine.

Key-words: Exercise, Oxidative Stress, Neuroprotection, Cerebellum.

Recebido em: 23 de Junho de 2020; Aceito em: 4 de Agosto de 2020.

Correspondência: Luiza Minato Sagrillo. Av. Roraima nº 1000 Cidade Universitária Bairro - Prédio 26 - Camobi, Santa Maria – RS, 97105-900. lu.sagrillo@hotmail.com

Introdução

O câncer é a maior causa de mortalidade nos países desenvolvidos [1]. Devido ao crescimento e envelhecimento da população, projeta-se que a taxa de incidência aumente em todo o mundo, principalmente nos países menos desenvolvidos, onde 82% da população mundial vive [2].

Além de ser um investimento anual de alto custo, o tratamento do câncer é considerado um dos problemas mais desafiadores da medicina. As drogas antitumorais costumam ter um índice terapêutico mais baixo, o que significa a dose terapêutica muito próxima da dose tóxica [3]. A Vincristina (VCR) é um quimioterápico com função antimitótica que foi amplamente incorporado a esquemas quimioterápicos com múltiplos agentes para um grande número de doenças, incluindo leucemia linfoblástica aguda, linfomas, sarcomas, neuroblastoma e tumores nos rins, fígado, pulmão, cérebro e mama entre outras. É o mais utilizado em pacientes pediátricos e, apesar de seu ótimo desempenho, frequentemente apresenta neurotoxicidade dose limitante, o que pode ser devastador [4]. Como efeitos colaterais pode-se apresentar alterações no equilíbrio através de danos vestibulares devido à agressão ao oitavo nervo craniano, tontura, nistagmo, vertigem [5] e neuropatia periférica [4].

Embora os mecanismos moleculares da neurotoxicidade induzida pela quimioterapia ainda não tenham sido totalmente elucidados, estudos mostraram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumento da peroxidação lipídica no tecido cerebral de ratos expostos a VCR. Assim, indicando uma associação entre quimioterapia e aumento do estresse oxidativo, o que pode levar a uma redução da viabilidade dos neurônios [6,7]. Nesse sentido, terapias que modulam positivamente o sistema antioxidante podem ser ferramentas importantes no tratamento de várias doenças e toxicidades que afetam o sistema nervoso.

Existem evidências dos benefícios gerais para a saúde do exercício físico regular, tanto em pessoas saudáveis como em várias doenças [8], que variam com a duração e intensidade do exercício, bem como com a idade, estado de saúde prévio e gênero do praticante [9]. O exercício físico é capaz de modular o sistema imunológico, aumentando o número de células *natural killer* e linfócitos circulantes, diminuindo as chances de o organismo contrair infecções [10]. Sob essas condições, o sistema imunológico estaria melhor qualificado para combater o câncer.

Estudos em modelos experimentais demonstraram que o exercício físico também modula positivamente o sistema antioxidante, aumentando o conteúdo e / ou a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (SOD, CAT e GPx) no músculo e cérebro de ratos [11,12], além de melhorar a taxa de sobrevivência dos neurônios de Purkinje, diminuindo a expressão de astrócitos reativos [13]. Ozbeily *et al.* [14] demonstraram o potencial papel protetor do exercício de natação (efeito crônico), que reduziu o dano oxidativo cerebral induzido pelo estresse, além de melhorar os níveis de ansiedade e funções cognitivas. No entanto, não são completamente compreendidos os efeitos do exercício físico prévio na proteção dos danos cerebelares após quimioterapia com VCR. Assim, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese que o exercício físico altera o equilíbrio dinâmico e a coordenação motora, a atividade locomotora exploratória e o balanço oxidativo e imunológico de ratos tratados com VCR.

Métodos

O manuscrito foi escrito de acordo com as diretrizes da ARRIVE.

Animais e diretrizes éticas

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os ratos eram adultos jovens e pesavam entre 270 e 300g. Foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas a uma temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, com comida e água *ad libitum*. Todos os protocolos foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (090/2014). E o número de animais utilizados foi o mínimo possível para fornecer efeitos consistentes em nossos resultados.

Desenho experimental

Para este estudo, foram elaborados protocolos com duas etapas: 1) Exercício físico: os animais foram divididos em dois grandes grupos: exercício ($n = 20$), submetidos a um protocolo de natação de seis semanas, e sedentário ($n = 20$). 2) Quimioterapia: os animais foram divididos em quatro grupos de estudos: exercício + VCR; exercício + solução salina; sedentário + VCR; sedentário + solução salina. No primeiro dia após o final do protocolo da etapa 1 (dia 0), em cada grande grupo, os ratos foram tratados intraperitonealmente com Vincristina (VCR; $n = 10$) ou com solução salina (Salina; $n = 10$) na dose de 0,5mg/kg. Este tratamento foi repetido após sete dias. Nos dias 1 (24 horas após a primeira dose de VCR), 7 (sete dias após a primeira dose), 8 (24 horas após a segunda dose) e 15 (sete dias após a segunda dose) os animais foram submetidos a testes de avaliação do comportamento locomotor exploratório e equilíbrio corporal. No dia 15, os animais foram sacrificados e os tecidos cerebelar e sanguíneo foram coletados para análise bioquímica (Figura 1).

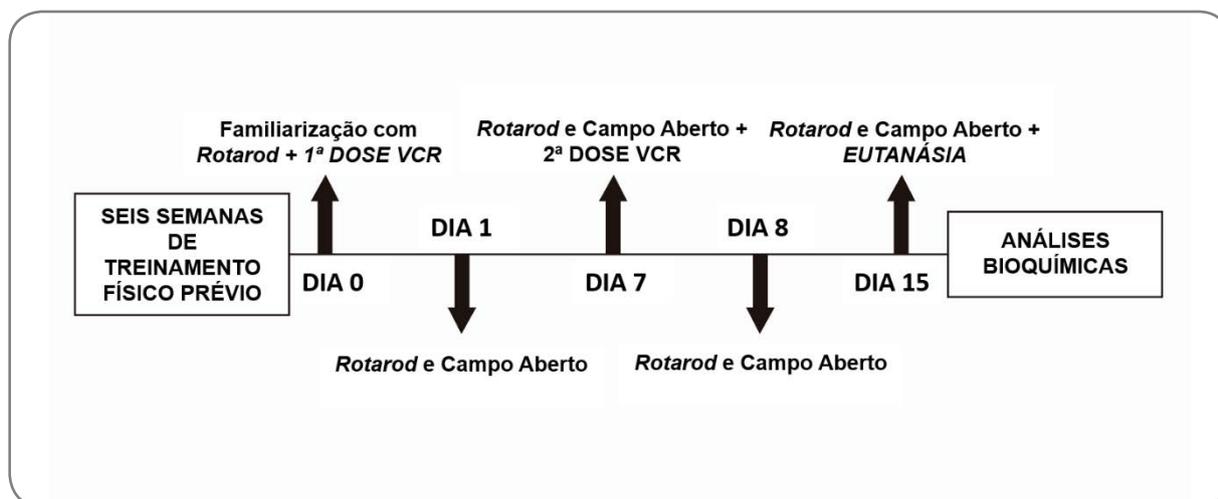


Figura 1 - Desenho de estudo.

Protocolo de treinamento físico

O protocolo foi baseado nos estudos de Gobatto *et al.* [15] e Souza *et al.* [16]. No período de seis semanas, os ratos selecionados para o grupo exercício e exercício + VCR foram submetidos ao treinamento de natação, realizado em tambor circular de plástico (diâmetro, 120cm, profundidade, 90cm), preenchido com água mantida a uma temperatura de $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O treinamento consistiu em nadar diariamente por 60 minutos, cinco dias por semana, durante seis semanas, entre 9:00 e 11:00. A primeira

semana foi um período de adaptação para nadar sem pesos. Em seguida, os ratos foram submetidos ao treinamento de natação com carga de trabalho (5% do peso corporal) para melhora da resistência. O grupo de ratos sedentários foi colocado em um tanque separado com pouca água (5cm de profundidade) a $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 5 dias/semana, sem carga extra. Quando completado o protocolo de seis semanas, ambos os grupos receberam tratamento com VCR ou com solução salina conforme randomização.

Protocolo de quimioterapia

O sulfato de VCR foi dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%) e administrado em duas doses de 0,5mg/kg (pelo peso corporal calculado no dia), com intervalo de uma semana entre elas, gerando uma dose cumulativa de 1,0mg/kg. O grupo controle recebeu a mesma dose de solução salina somente. Para a administração da quimioterapia, foi escolhida a via intraperitoneal, pois a cinética do medicamento é muito semelhante à via intravenosa, utilizada em humanos [17].

Testes comportamentais

Teste Rotarod

No teste *rotarod* (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA), os ratos foram colocados individualmente no topo da haste rotatória (com diâmetro de 4cm), de modo que a locomoção para a frente fosse necessária para evitar uma queda. Os animais foram testados usando uma velocidade constante de 18 rpm por um tempo máximo de 5 minutos. A latência para a queda foi registrada automaticamente por uma placa magnética contida no próprio aparelho. Nos primeiros dois dias após o término do protocolo de natação, a cada rato foi permitido familiarizar-se com o dispositivo a uma velocidade constante de 18rpm [18]. O teste foi realizado nos dias 1, 7, 8 e 15 e incluiu um teste prévio, ainda sem tratamento medicamentoso, para avaliação do equilíbrio basal (dia 0).

Atividade locomotora exploratória

Para avaliar a atividade locomotora exploratória e espontânea dos ratos, usamos o teste de campo aberto, conforme descrito por Shabani *et al.* [18] e modificado neste estudo. Resumidamente, os animais foram colocados em uma área quadrada (56cm de largura x 56cm de comprimento x 20cm de altura), com subdivisões no chão indicando pequenos quadrantes que definiam as áreas central e periférica. A locomoção, em campo, foi rastreada por um período de 4 minutos e gravada usando uma câmera monocromática de alta resolução. Os resultados foram armazenados e analisados com o software *Ethovision* (v.8). A distância total percorrida (mm) e o número de cruzamentos (n) foram calculados para comparação posterior entre os grupos [18]. A avaliação do teste de campo aberto foi realizada após a administração do medicamento nos dias 1, 7, 8 e 15, para observar se as mudanças comportamentais entre os grupos eram dependentes do tempo.

Análise ex vivo

No dia 15, sete dias após o último tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação. O tecido sanguíneo foi coletado e o cerebelo foi exposto por remoção dos ossos parietal e occipital e congelado a -80°C para preservação da estrutura e, posteriormente, análises bioquímicas.

Medida de dihidroclorofluoresceína (DCFH)

A geração potencial de EROs através dos tratamentos foi monitorada usando um agente fluorescente, 2,7'-diclorofluoresceína (DCF). Este ensaio foi baseado na seguinte suposição química: diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é capaz de se difundir através das membranas celulares [19]. Uma vez dentro das células, essa molécula é desacetilada pela ação das enzimas esterase intracelulares, formando a dihidroclorofluoresceína (DCFH), um produto não fluorescente. O DCFH na presença de EROs é oxidado (preferencialmente peróxidos, hidroperóxidos e NO) para uma diclorofluoresceína altamente fluorescente (DCF). Assim, quanto maior a absorvância detectada, o que significa maior fluorescência, maior a ocorrência de compostos oxidantes. Os resultados do DCFH foram expressos em porcentagem do controle.

DNA livre por fluorímetro - Picogreen

Para análise da fragmentação do DNA, foi utilizado o método *picogreen*. Essa técnica quantifica o DNA liberado no meio devido à apoptose celular para detectar citotoxicidade. Também pode ser usado como uma medida de genotoxicidade ao expor uma molécula de DNA pura a um composto específico. Para esta técnica, foi utilizado plasma sanguíneo e os procedimentos seguindo o protocolo descrito por Ha *et al.* [20]. Resumidamente, em 1,5mL de microtubo foram adicionados 80µL de 1X tampão TE, 10 µL da amostra e 10µL do reagente *picogreen* diluído (1:10) e homogeneizado 10 vezes. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 a 30 minutos. Em seguida, as amostras foram lidas no fluorímetro em comprimentos de onda: excitação de 480nm, emissão de 520nm. As amostras do grupo controle continham um dsDNA conhecido. O ensaio foi realizado em triplicata. A interpretação dos valores obtidos é dada de tal maneira que, quanto maior o valor da fluorescência, mais livre o DNA existente no meio, indicando a morte celular. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

Análise de sangue

O hemograma foi realizado em todos os grupos no final do tratamento para observar os principais efeitos do treinamento com VCR e natação no sistema imunológico. Foram considerados os valores de plaquetas, leucócitos totais e hematócrito no sangue. Essa análise foi realizada no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria, pelos profissionais responsáveis pelo exame no local, com a observação da pesquisadora responsável por este estudo.

Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi analisada espectrofotometricamente pelo método descrito por Aebi [21], que envolve o monitoramento do desaparecimento de H₂O₂ na presença da enzima no comprimento de onda de 240nm. Após o tratamento das células cerebelares, foi adicionada uma alíquota de tecido em tampão fosfato de potássio 50mM, com pH 7,0. A reação enzimática foi iniciada pela adição de H₂O₂. Os resultados foram expressos em unidades/mg de proteína.

Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Para verificar a atividade da SOD foi realizado um ensaio descrito por Misra e Fridovich [22], em que uma parte da amostra de cerebelo foi devidamente homogeneizada em um volume de 40 (p/v) com Tris-HCl 10mM (pH 7,4). A SOD foi expressa em unidades/mg de proteína.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada no SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2 (SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, EUA). Para comparação das variáveis bioquímicas entre os quatro grupos, foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni para dados não paramétricos. Para comparar as variáveis comportamentais entre os quatro grupos e entre as várias avaliações, foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey para comparação entre grupos e pelo teste de perfil de contraste para comparação entre avaliações. Com as variáveis, foram transformadas em ranks devido à ausência de distribuição normal. Para a análise de correlação entre os dados comportamentais e bioquímicos, foi realizado o teste de correlação de Spearman, no qual o delta dos valores encontrados para cada rato foi utilizado como média de cada dia de avaliação e comparado com os resultados bioquímicos do mesmo animal. Quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de correlação de Spearman (representado pela letra r), maior será a correlação. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

Resultados

A amostra foi composta por dez ratos em cada grupo experimental. Os resultados demonstraram um efeito benéfico do exercício físico na proteção contra a perda do equilíbrio corporal e da coordenação motora, induzida pela administração de VCR, através da modulação no sistema antioxidante e imunológico.

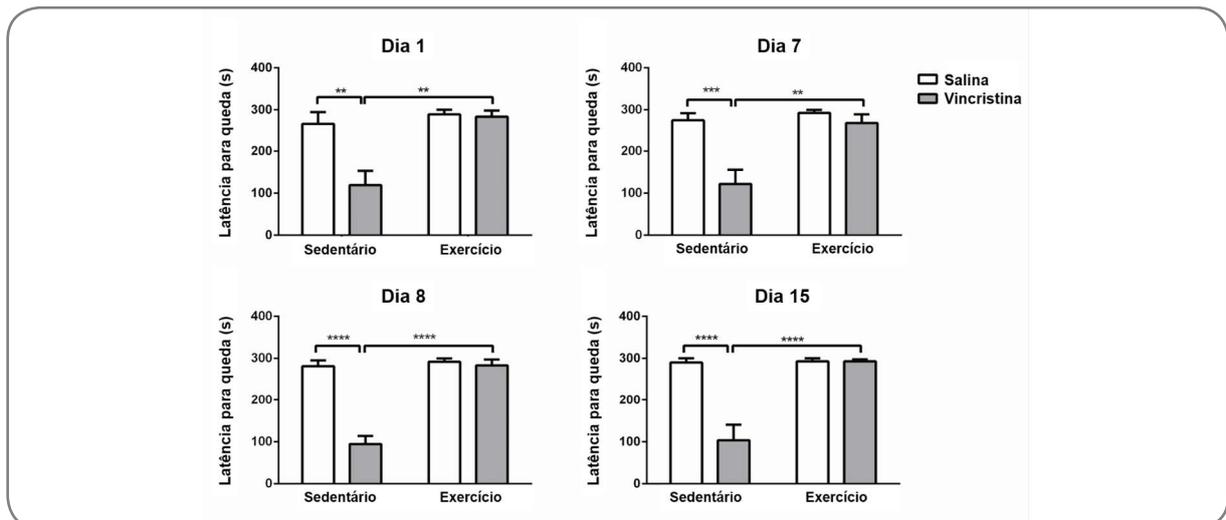
Testes comportamentais

Efeito protetor do exercício físico contra os danos no equilíbrio dinâmico e coordenação motora, induzidos pelo tratamento com VCR, no teste Rotarod

O treinamento físico parece ter minimizado os danos causados pelo VCR, tendo os ratos treinados um desempenho melhor no teste de equilíbrio quando comparados aos ratos sedentários. O efeito protetor do treinamento físico foi mantido desde o primeiro (dia 1, $F(1,23)=8,299$, $p=0,0084$) até o último dia de avaliação (dia 15, $F(1,23) = 21,37$; $p = 0,0001$). Conforme mostrado na figura 2, o tratamento com VCR afetou o equilíbrio dos ratos sedentários, que permaneceram no rotarod por períodos mais curtos quando comparados aos ratos não tratados. O dano durou em todos os dias de avaliação (dia 1, $F(1,23) = 9,758$; $p = 0,0048$ até o dia 15, $F(1,23) = 21,37$; $p = 0,0001$. Figura 2).

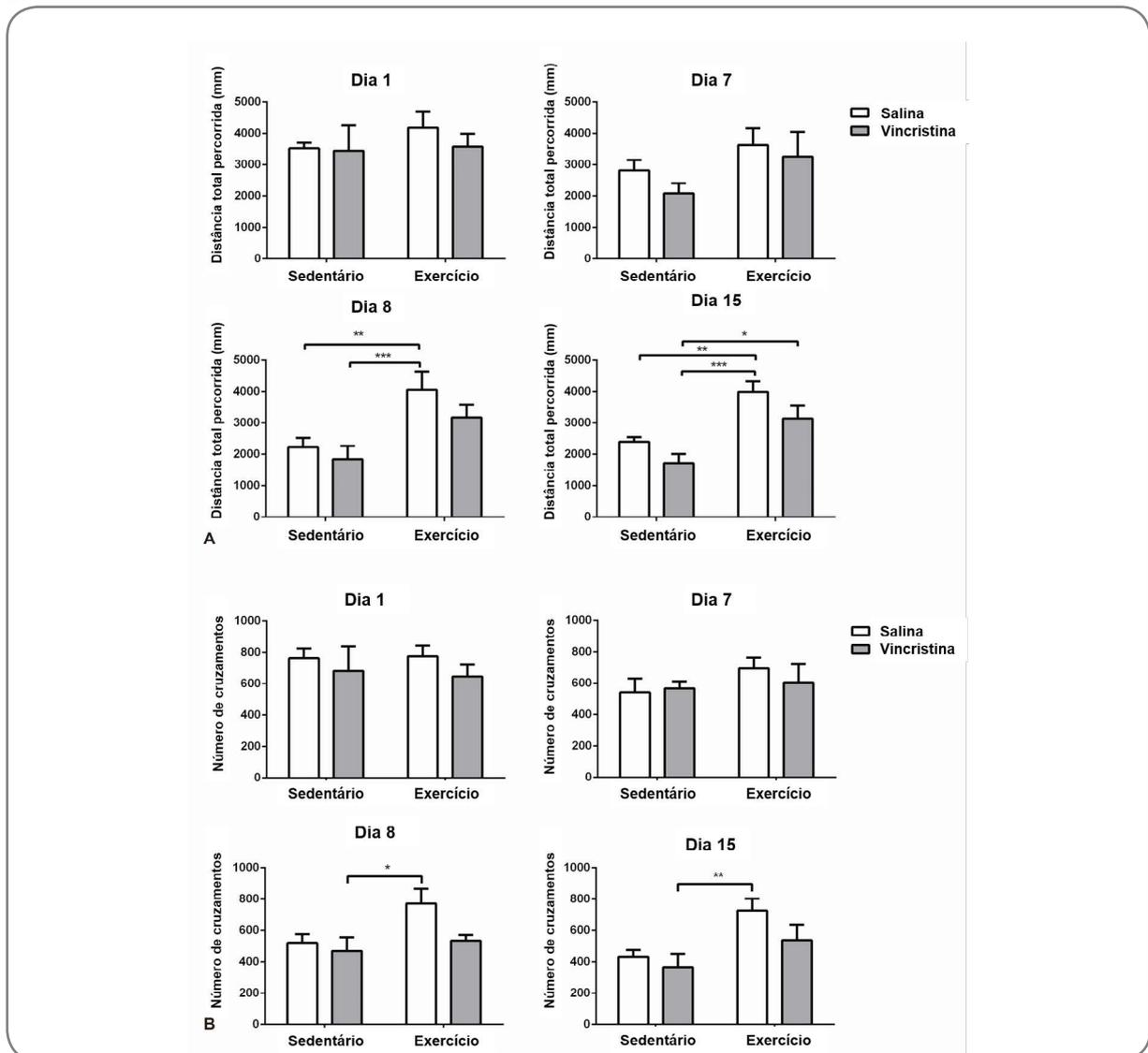
Análise de campo aberto

Os resultados no teste de campo aberto indicam que a VCR não causou efeitos significativos nos parâmetros analisados. Observa-se, no entanto, que os animais treinados mantiveram a atividade locomotora exploratória por mais tempo que os animais sedentários. As diferenças significativas foram demonstradas na distância percorrida no dia 8 ($F(1,20) = 12,97$, $p = 0,0018$) e 15 ($F(1,20) = 23,84$, $p < 0,0001$. Figura 3A) e no número de cruza nos mesmos dias (dia 8, $F(1,24) = 5,155$, $p = 0,0324$ e dia 15, $F(1,24) = 8,487$, $p = 0,0076$. Figura 3B). No último dia da avaliação, houve uma diminuição ainda maior na distância percorrida pelos animais sedentários tratados com VCR ($F(1,20) = 6,226$, $p = 0,0215$), quando comparados aos animais treinados e tratados.



Teste estatístico: ANOVA de medidas repetidas. Valores obtidos por médias. ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Figura 2 - Efeito da VCR no equilíbrio corporal de ratos treinados e sedentários, avaliados no rotarod no pré-tratamento (dia 0), um e sete dias após a primeira dose (dias 1 e 7) e um e sete dias após a segunda dose do medicamento (dias 8 e 15).



A. Distância total movida (mm) e B. Números de cruzamentos. Teste estatístico: ANOVA de medidas repetidas. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Figura 3 - O teste de campo aberto foi realizado no primeiro e no sétimo dia após a primeira dose (dias 1 e 7) e no primeiro e no sétimo dia após uma segunda dose de VCR (dias 8 e 15).

Análises ex vivo

Efeito protetor do exercício físico contra estresse oxidativo e genotoxicidade causados pelo tratamento com VCR.

A análise do DCFH mostrou que o tratamento com VCR levou a um aumento nos níveis de EROs no cerebelo de ratos sedentários ($F(1,20) = 6,729$, $p = 0,0174$) quando comparados ao grupo controle. O treinamento físico minimizou os efeitos tóxicos da exposição a VCR, demonstrando menor dano oxidativo ($F(1,20) = 9,272$, $p = 0,0064$) em animais treinados, quando comparado aos animais sedentários (Figura 4^a). Uma forte correlação entre a DCFH e o delta do rotarod (média dos dias de avaliação: 0, 1, 7 e 15) mostrou que quanto maior o estresse oxidativo gerado pela toxicidade do medicamento, maior o desequilíbrio dos animais no teste do rotarod ($p = 0,002$, $r = -0,74272$. Figura 4B).

Ratos tratados com VCR apresentaram maior dano ao DNA ($F(1,24) = 19,87$, $p = 0,0002$) em comparação com os não tratados, demonstrando o potencial genotóxico dessa droga. O treinamento físico foi capaz de proteger contra esse dano ($F(1,24) = 7.650$, $p = 0,0107$. Figura 4C). A correlação moderada entre picogreen e delta do rotarod mostrou que quanto maior a genotoxicidade gerada pela droga, maior o desequilíbrio dos animais no teste do rotarod ($p = 0,0037$, $r = -0,61801$. Figura 4D).

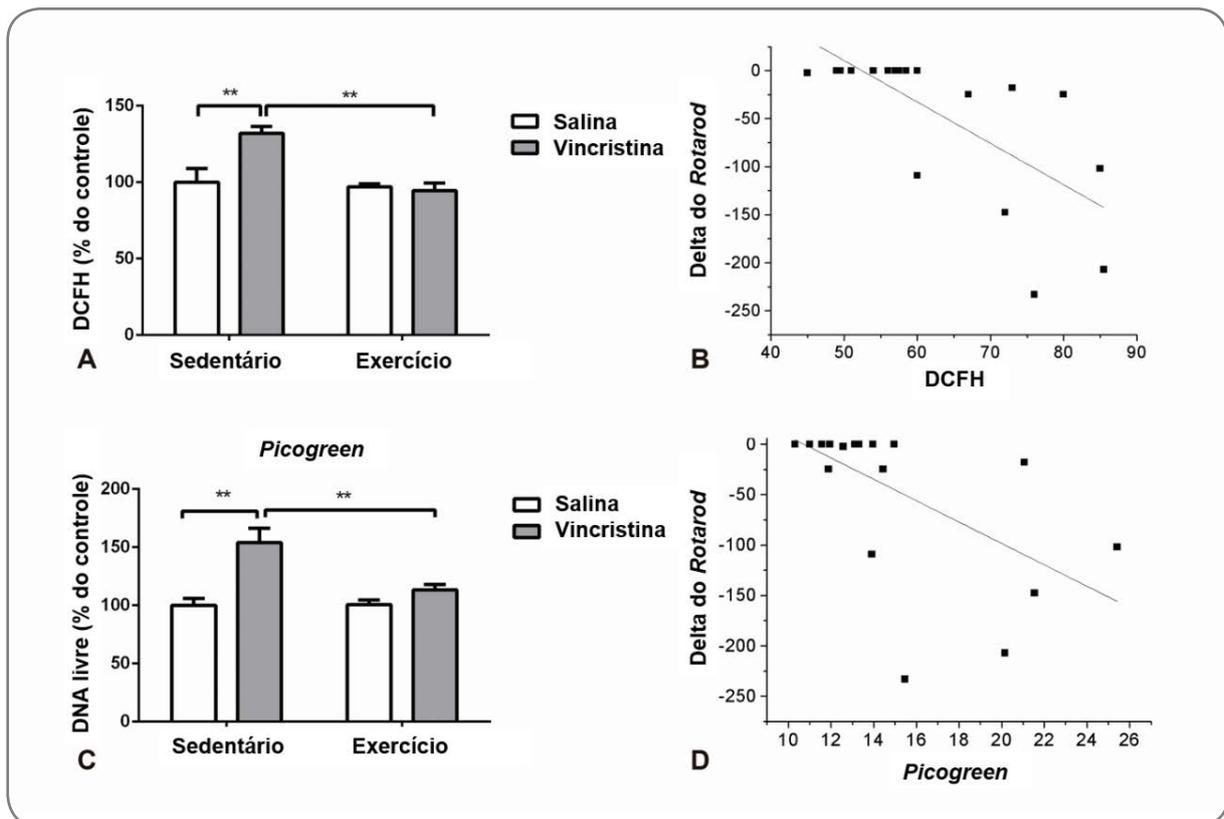


Figura 4 - A. Análise do estresse oxidativo pelo aumento do grupo peroxil na DCFH. Resultado expresso pela porcentagem de controle; B. Análise de correlação entre os testes rotarod (delta) e DFCH: $p < 0,01$; $r = -0,74272$; C. Análise da fragmentação do DNA pelo método picogreen. Resultado expresso como uma porcentagem do controle; e D. Análise de correlação entre os testes de rotarod (delta) e picogreen: $p < 0,01$; $r = -0,61801$. P = valor P e r = coeficiente de correlação de Spearman. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Efeito protetor do exercício físico contra os danos imunológicos causados pelo tratamento com VCR

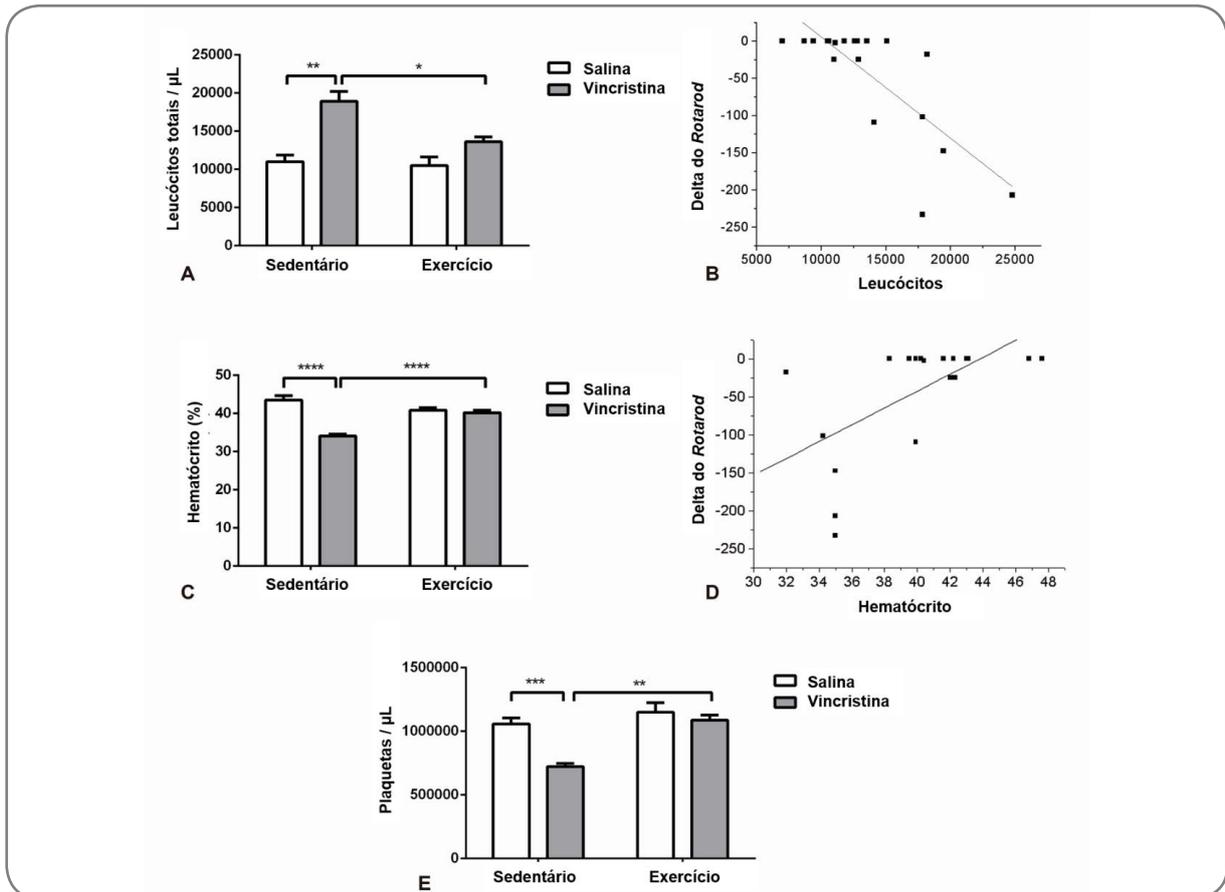
Nas análises hematológicas, tendo em vista que o valor de referência para a contagem total de leucócitos é de 7.300 - 12.660/ μ L, observou-se que o tratamento com VCR causou leucocitose, ou seja, um aumento no número de leucócitos em ratos sedentários ($F(1,20) = 30,05$, $p < 0,0001$), indicando maior efeito tóxico geral nos ratos tratados com VCR quando comparados aos animais do grupo controle. O treinamento físico reduziu significativamente esse efeito tóxico ($F(1,20) = 5,602$, $p = 0,0281$, Figura 5A). Esses dados mostraram uma correlação negativa com o teste do rotarod ($p < 0,0001$; $r = -0,77183$, Figura 5B), indicando que quanto maior o efeito tóxico geral (leucocitose), menor a capacidade de manter o equilíbrio no teste. Além disso, apresentou correlação moderada e forte, respectivamente, com as análises oxidativas de DCFH ($p=0,0075$; $r=0,5783$) e picogreen ($p = 0,0002$; $r = 0,73268$), indicando que o mesmo efeito de toxicidade causada pelo tratamento com VCR no cerebelo, também foi capaz de causar danos imunológicos gerais.

Observou-se também que o tratamento com VCR reduziu os níveis de hematócrito (representados por % de hemácias; valor de referência entre 41,1 e 51,1%) em ratos sedentários ($F(1,16) = 51,17$; $p < 0,0001$) quando comparados aos que não receberam tratamento, o que significa déficit de glóbulos vermelhos no organismo e pode ser indicativo de anemia. O treinamento físico prévio minimizou esse dano ($F(1,16) = 38,72$, $p < 0,0001$, Figura 5C). Houve correlação moderada entre a análise do hematócrito e do DCFH ($p = 0,0062$; $r = -0,58997$, Figura 5D), indicando que quanto maior o estresse oxidativo, menores os níveis de glóbulos vermelhos no sangue e, consequentemente, maior a chance de anemia.

Além disso, considerando os valores de referência para contagens de plaquetas de 840.000 a 1.240.000/ μ L, pode-se observar que a VCR causou diminuição da contagem de plaquetas em ratos sedentários ($F(1,17) = 16,14$, $p = 0,0009$) em comparação com ratos do grupo controle, sugerindo que esta droga tem efeitos tóxicos no sistema imunológico. O exercício físico foi capaz de proteger os danos causados pelo medicamento, uma vez que diferiu significativamente do grupo sedentário ($F(1,17) = 7,727$, $p = 0,0128$, Figura 5E), até 15 dias após o protocolo de treinamento, em todas essas análises.

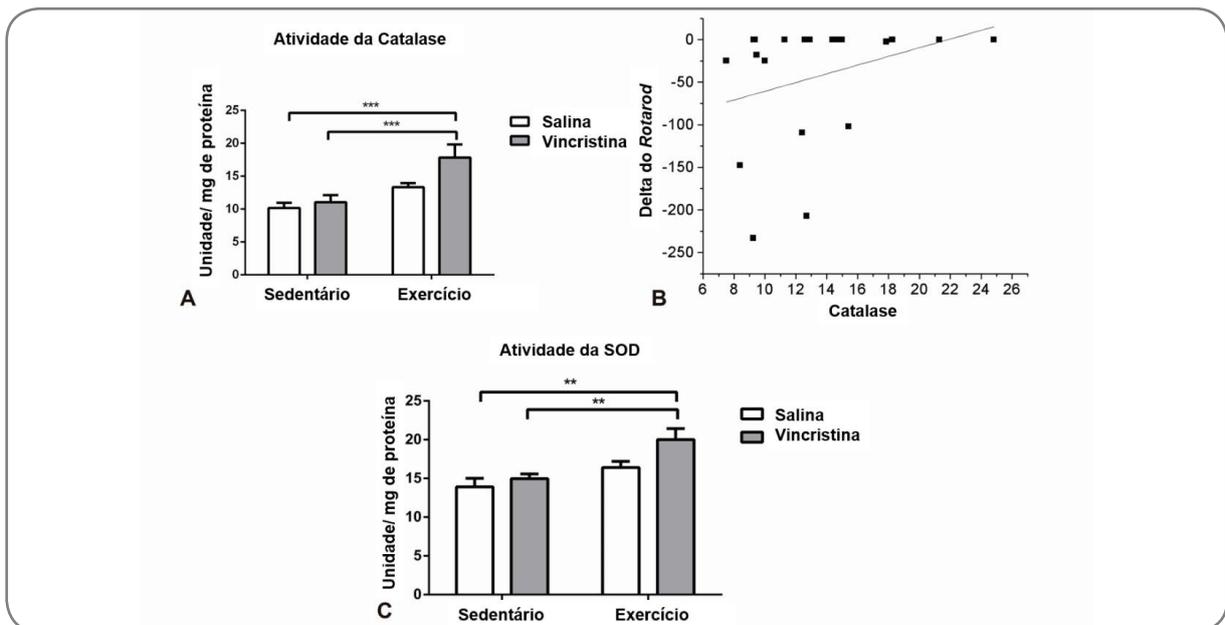
Efeito protetor do exercício físico na melhora do sistema antioxidante

O treinamento físico prévio aumentou a atividade antioxidante das enzimas CAT e SOD nos animais tratados com VCR ($F(1,20) = 16,13$; $p = 0,0007$ e $F(1,5) = 12,34$, $p = 0,0031$) em comparação com animais sedentários, também tratados com a droga (Figura 6A e 6C). Houve uma correlação positiva entre a atividade da CAT e os testes de rotarod ($p = 0,0500$; $r=0,43640$, Figura 6B), que mostraram que a melhora no sistema antioxidante dos animais devido ao treinamento físico protegeu do desequilíbrio os ratos tratados com VCR.



A. Leucócitos totais - valores expressos em μL ; **B.** Análise de correlação entre os testes rotarod (delta) e os leucócitos totais: $p < 0,0001$; $r = -0,77183$; **C.** Hematócrito - valores expressos em %; **D.** Análise de correlação entre os testes rotarod (delta) e o hematócrito: $p < 0,01$; $r = -0,58997$; **E.** Plaquetas - valores expressos em μL . $P =$ valor de P e $r =$ coeficiente de correlação de Spearman. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figura 5 - Análise de hemograma.



A. Atividade da enzima Catalase (CAT), demonstrada em unidades/mg de proteína, e **B.** Análise de correlação de Spearman entre os testes de rotarod (delta) e a atividade da enzima CAT: $p < 0,05$; $r = 0,43640$; **C.** Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), demonstrada em unidades/mg de proteína. $p =$ valor P e $r =$ coeficiente de correlação de Spearman. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 6 - Análise das enzimas antioxidantes.

Discussão

O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar se o exercício físico altera o equilíbrio dinâmico e a coordenação motora, a atividade locomotora exploratória e o balanço oxidativo e imunológico de ratos tratados com Vincristina (VCR). Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia os efeitos do exercício físico na prevenção da toxicidade induzida pela VCR.

A dose antitumoral efetiva e o tempo de tratamento com VCR ainda não estão bem estabelecidos na literatura. A VCR pode ser administrada a pacientes pediátricos com peso inferior a 10kg (superfície corporal $<1\text{m}^2$) a 0,05-0,065mg/kg semanalmente, e em crianças com peso superior a 10kg (superfície corporal $\geq 1\text{m}^2$), uma dose de injeção em bolus. Os alcaloides da vinca de 1,5-2,0mg/m² podem ser administrados semanalmente. Para adultos, a dose comum é de 1,4mg/m² por semana [23]. Além disso, existem poucas pesquisas relacionadas à toxicidade da VCR no cerebelo. A pesquisa atual foi baseada na dosagem descrita por Shabani *et al.* [18] em que as funções do cerebelo dos ratos foram profundamente afetadas pela exposição a VCR e foram observados déficits cognitivos, comportamentais e de função motora na dose cumulativa de 1,0mg/kg. Neste estudo, a possível via de deterioração do equilíbrio e do comportamento motor causado pelo dano cerebelar não foi avaliada, nem foram realizadas análises bioquímicas para observar as causas dos achados. No presente estudo, decidiu-se analisar a estrutura sanguínea e cerebelar no sétimo dia após a última dose, pois a imunossupressão e o estresse oxidativo são maiores após o sétimo dia de aplicação da VCR [24,25].

É sabido que a neurotoxicidade periférica e outras alterações motoras induzidas pela VCR provocam um importante déficit de equilíbrio dinâmico e coordenação motora [26,27], no entanto, o dano cerebelar induzido pela droga pode corroborar esse achado. O teste do rotarod, usado como referência para dano cerebelar [28] demonstrou que a latência para a primeira queda no dispositivo foi menor nos animais tratados em comparação aos não tratados com VCR. O tempo de latência é a principal medida obtida na barra rotacional e reflete o produto de quatro fatores principais envolvidos na função motora do roedor: 1) equilíbrio dinâmico; 2) coordenação motora; 3) planejamento motor; 4) aprendizado motor; e 5) condições físicas gerais e neuromusculares [29]. No presente estudo, a análise de DCFH e picogreen mostrou que esse desequilíbrio pode estar relacionado ao aumento dos danos oxidativos, imunológicos e ao DNA cerebelar causados pela administração do medicamento.

Observou-se que o treinamento físico protegeu contra danos no equilíbrio e coordenação motora induzidos pela administração do medicamento até 15 dias após o término do protocolo de treinamento. A proteção pode ser explicada por uma modulação positiva do sistema antioxidante devido ao aumento das atividades das enzimas SOD e CAT, o que demonstra que, de alguma forma, os animais que realizaram treinamento físico prévio possuem o organismo mais bem preparado para combater o aumento do estresse oxidativo causado pela VCR. Esse resultado concorda com algumas evidências que sugerem que as respostas adaptativas ao exercício moderado envolvem um aumento nas defesas antioxidantes e redução na produção de oxidantes basais [16,30]. Além disso, os animais tratados com VCR apresentaram danos ao DNA. Drogas antitumorais podem causar danos ao DNA, e os alcaloides da vinca, como a VCR, induzem citotoxicidade através da interação com a tubulina. Os efeitos bioquímicos e biológicos nos microtúbulos incluem competição pelo transporte intracelular de aminoácidos, inibição da purina, síntese de proteínas de RNA e DNA e ruptura lipídica da membrana celular [31]. Neste estudo, o treinamento físico atuou como

genoprotetor, no reparo e proteção do DNA [32], minimizando os efeitos deletérios da droga.

Segundo a literatura, o exercício físico melhora a função cognitiva e melhora a disfunção motora em ratos [33]. No presente estudo, a atividade locomotora exploratória dos animais foi demonstrada por meio de rastreamento por software em teste de campo aberto que demonstrou que o treinamento físico foi capaz de aumentar a distância total percorrida e o número de cruzamentos quando comparado ao grupo de animais sedentários. O exercício também foi capaz de manter os níveis totais de leucócitos, hematócrito e plaquetas dos animais tratados com VCR dentro dos valores de referência e foi observado com isso, uma melhor condição do rato para manter também o equilíbrio dinâmico e a coordenação motora no teste rotarod. Portanto, o treinamento físico mostrou-se determinante para manter um bom estado físico e imunológico durante o tratamento com VCR. A mielossupressão pode ser associada a qualquer alcaloide da vinca como resultado de tratamento prolongado, tratamento não intencional de altas doses ou em pacientes altamente suscetíveis [28]. Essa condição é um efeito colateral comum entre pacientes submetidos à quimioterapia [34] e influencia diretamente a qualidade de vida das pessoas com câncer. Nos estudos realizados por Valenti [35] e Stephenson [36] com sobreviventes de câncer, observou-se que aqueles que se exercitaram antes do diagnóstico obtiveram uma melhor qualidade de vida do que pacientes que não se exercitam.

Como limitação, trata-se de um estudo experimental e, portanto, os achados não podem ser estendidos à prática clínica. No entanto, a partir dos resultados positivos encontrados, incentivamos pesquisas futuras que utilizem exercícios físicos moderados em humanos, a fim de entender melhor as possíveis vias de proteção do equilíbrio dinâmico e da coordenação motora em indivíduos que serão tratados com quimioterapia.

Conclusão

A descoberta mais importante do estudo mostra que o exercício aeróbico regular moderado, como a natação, protege o equilíbrio dinâmico e os danos à coordenação motora induzidos pela administração sistêmica da VCR. Também mostra que esse benefício está relacionado ao efeito positivo do exercício como um modulador do sistema antioxidante cerebelar, que aumentou a atividade das enzimas CAT e SOD e reduziu espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA. Além disso, o exercício físico foi capaz de manter os níveis de leucócitos, plaquetas e hematócrito dentro dos limites da normalidade em ratos tratados com a droga e, por si só, manteve a atividade locomotora exploratória dos ratos analisados. O estudo também mostra que, mesmo 15 dias após o treinamento, os efeitos benéficos do exercício ainda podem ser observados.

Vinculação acadêmica

Este artigo representa parte da dissertação de mestrado de Luiza Minato Sagrillo, orientada pelo professor Dr. Aron Ferreira da Silveira no Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Potencial conflito de interesse

Nenhum conflito de interesses com potencial relevante para este artigo foi reportado.

Fontes de financiamento

Não houve fontes de financiamento externas para este estudo.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Sagrillo LM. **Obtenção de dados:** Sagrillo LM, Zorzi VN, Figuera MR, Bonadiman BSR. **Análise e interpretação dos dados:** Sagrillo LM, Zorzi VN, Royes LFF. **Análise estatística:** Sagrillo LM, Zorzi VN. **Obtenção de financiamento:** não se aplica. **Redação do manuscrito:** Sagrillo LM, Cattani MFMR, Bonadiman BSR. **Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante:** Royes LFF, Silveira AF.

Referências

1. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology* 2012;13(8):790-801. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70211-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70211-5)
2. Torre La, Bray F, Siegel EL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Hemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA J Cancer Clin* 2015;65(2):87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
3. Fukumasu H. Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
4. Mora E, Smith LML, Donohoe C, Hertz DL. Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *Am J Cancer Res* 2016;6(11):2016.
5. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2008). [citado 2016 Abril 12]. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25283-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25283-1-0].PDF)
6. Wick A, Wick W, Hirrlinger J, Gerhardt E, Drigen R, Dichgans J *et al.* Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity. *J Neurochem* 2004;91(5):1067-74. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02774.x>
7. Martins DB, Lopes STA, Mazzanti C M, Spanevello R, Schmatz R, Corrêa M *et al.* Peroxidação lipídica em ratos tratados com sulfato de Vincristina e decanoato de nandrolona. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2011;63(1):107-13. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100017>
8. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 2006;174(6):801-9. <https://doi.org/10.1503/cmaj.051351>
9. Etnier JL, Salazar W, Landers DM, Petruzzello SJ, Han M, Nowell P. The influence of physical fitness and exercise upon cognitive functioning: A meta-analysis. *Journal of Sport and Exercise Psychology* 1997;19(3):249-77.
10. Suzuki K. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise. *Biomolecules* 2019;7;9(6):223. <https://doi.org/10.3390/biom9060223>
11. Rambo LM, Ribeiro RL, Oliveira MS, Furian AF, Lima FS, Souza MA *et al.* Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylentetrazol-induced seizures. *Neurochem Int* 2009;55(5):333-40. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.04.007>
12. Steiner SR, Philbert MA. Proteomic identification of carbonylated proteins in 1, 3-dinitrobenzene neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2011;32(4):362-73. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.10.009>
13. Lee JM, Shin MS, Ji ES, Kim TW, Cho HS, Kim CJ *et al.* Treadmill exercise improves motor coordination through ameliorating Purkinje cell loss in amyloid beta23-35-induced Alzheimer's disease rats. *J Exerc Rehabil* 2014;10(5):258. <https://doi.org/10.12965/jer.140163>
14. Ozbeyli D, Gokalp AG, Koral T, Ocal OY, Dogan B, Akakin D *et al.* Protective effect of exercise and sildenafil on acute stress and cognitive function. *Physiol Behav* 2015;1(151):230-7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.07.030>
15. Gobatto CA, Mello MA, Sibuya CY, Azevedo JR, Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;130(1):21-7. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00362-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00362-2)
16. Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD *et al.* Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 2009;50(4):811-23. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01908.x>
17. Nadulska A, Klukowska L, Dyba S. Changes of resistance parameters of femoral bone in adult female rats after application of zoladex and vincristin. In: *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina*, 2002. p.426-430.

18. Shabani M, Larizadeh MH, Parsania S, Shekaari MA, Shahrokhi N. Profound destructive effects of adolescent exposure to vincristine accompanied with some sex differences in motor and memory performance. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90(4):379-86. <https://doi.org/10.1139/y11-132>
19. Ali S, Lebel C, Bonu S. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992;13(3):637-48.
20. Ha TTN, Huy NT, Murao LA, Lan NTP, Thuy TT, Tuan HM, et al. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PloS one* 2011;6(10):25969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025969>
21. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
22. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972;247(21):6960-2.
23. Van den Berg HW, Desai ZR, Wilson R, Kennedy G, Bridges JM, Shanks RG. The pharmacokinetics of vincristine in man. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1982;8(2):215-9. <https://doi.org/10.1007/BF00255487>
24. Sylvania FLSBV, De Oliveira B, Da Silva Hucke ÉET. A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolín®) sobre parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin®). *Ciência Rural* 2005;35(3). <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300015>
25. Barzegar-Fallah A, Alimoradi H, Mehrzadi S, Barzegar-Fallah N, Zendedel A, Abbasi A, Dehpour AR. The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2014;41(1):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.12.002>
26. Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol* 2002;249(1):9-17.
27. Coufal N, Farnaes L. The Vinca Alkaloids. In: *Cancer management in man: chemotherapy, biological therapy, hyperthermia and supporting measures*. Springer; 2011. p.25-37.
28. Lalonde R, Strazielle C. Brain regions and genes affecting postural control. *Progress in Neurobiology* 2007;81(1):45-60. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.005>
29. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Funayama M, Takamatsu Y et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods* 2010;189(2):180-5. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>
30. Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(3):R505-R11. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2003>
31. Chabner BA, Londo DL. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice* 4ª ed. Illinois: Walters Kluwer; 2005.
32. Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int* 2006;49(4):387-92. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.02.004>
33. Heo YM, Shin MS, Lee JM, Kim CJ, Baek SB, Kim KH, Baek SS. Treadmill exercise ameliorates short-term memory disturbance in scopolamine-induced amnesia rats. *Int Neurourol J* 2014;18(1):16-22. <https://doi.org/10.5213/inj.2014.18.1.16>
34. National Heart, Lung and Blood Institute. what is thrombocytopenia? [cited Aug 12]. Disponível: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/immune-thrombocytopenia>.
35. Valenti M, Porzio G, Aielli F, Verna L, Cannita K, Manno R et al. Physical exercise and quality of life in breast cancer survivors. *Int J Medical Sci* 2008;5(1):24. <https://doi.org/10.7150/ijms.5.24>
36. Stephenson LE, Bebb DG, Reimer RA, Culos-Reed SN. Physical activity and diet behaviour in colorectal cancer patients receiving chemotherapy: associations with quality of life. *BMC Gastroenterol* 2009;9(1):60