

**Efeitos do treinamento físico na resposta imunológica de ratos
expostos à vincristina**

Viviane Nogueira de Zorzi

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

v_n_vivinogueira@hotmail.com

Luiza Minato Sagrillo

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

lu.sagrillo@hotmail.com

Michele Rechia Fighera

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

mfighera@yahoo.com.br

Luiz Fernando Royes

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

nandoroyes@yahoo.com.br

Silvio Teixeira da Costa

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Aron Ferreira da Silveira

Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

aronfer@gmail.com

Resumo

A Vincristina (VCR) é um quimioterápico amplamente utilizado na clínica. Alterações imunológicas são alguns dos efeitos do quimioterápico mais apresentados pelos pacientes. O presente estudo tem como objetivo avaliar se o exercício aeróbico prévio (6 semanas de natação, 1h/dia, 5 dias/semana, sobrecarga de 5% do peso corporal) poderia melhorar os déficits imunológicos em ratos Wistar posteriormente tratados com o quimioterápico Vincristina. A administração da Vincristina foi realizada com dose única semanal de 0,5mg/kg, durante duas semanas, com dose acumulada de 1mg/kg, via intraperitoneal. No 15º dia os ratos foram submetidos à retirada de sangue para

análise do sistema imunológico pelo hemograma e dano ao DNA pelo teste Picogreen. Observou-se uma diminuição significativa no número de leucócitos, plaquetas e nos níveis de eritrócitos nos ratos tratados com o quimioterápico, assim como significativo dano no DNA celular. No entanto, o exercício foi capaz de proteger dessa diminuição das células do sistema imune e do dano causado ao DNA no grupo que praticou o exercício e recebeu o quimioterápico. Portanto, o exercício físico mostrou-se protetor contra a diminuição das células do sistema imune e dano ao DNA causado pelo tratamento com o quimioterápico em ratos.

Palavras chave: exercício físico, quimioterapia, vincristina, sistema imunológico

Introdução

No tratamento das neoplasias humanas, a quimioterapia tem sido a conduta de escolha, mesmo estando amplamente documentado que esses medicamentos podem provocar efeitos colaterais indesejáveis, como alterações imunológicas e depressão medular, dependendo do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga (Pagnano *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2005).

O sistema imunológico é formado por uma série de células e moléculas, distribuídas pelo organismo, imprescindíveis para a sua defesa frente a infecções e/ou situações que comprometam a sua integridade. (Córdova, 1994). Sabe-se que o sulfato de vincristina é um quimioterápico que atua interrompendo a divisão celular. Os efeitos adversos de vincristina incluem citotoxicidade, ou seja, as células são danificadas, e isso resulta em mielossupressão moderada, caracterizada pela diminuição da produção de células sanguíneas, como eritrócitos e leucócitos, e de plaquetas na medula óssea (Nak *et al.*, 2005).

Nesse contexto, o exercício físico surge como uma estratégia de proteção ao sistema imune devido às adaptações fisiológicas que a prática proporciona. Alguns estudos vêm demonstrando que o exercício físico

moderado (<60% do VO₂máx) parece estar relacionado ao aumento da resposta dos mecanismos de defesa orgânica. (Brines,1996; Cannon, 1993). Além disso, diversos estudos realizados no campo da imunologia do exercício constataram que a função imune pode ser imunomodulada pela prática de exercícios físicos (Akimoto 2003; Weider, 2003).

Portanto, sabendo que o câncer, assim como seu tratamento, afetam diretamente a qualidade de vida dos pacientes, já que ocasionam importante imunodrepressão, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício físico preventivos nos parâmetros imunológicos e de DNA em ratos expostos ao tratamento quimioterápico com Vincristina.

Objetivo Geral

Objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício físico prévios nos parâmetros imunológicos e de DNA em ratos expostos ao quimioterápico Vincristina.

Objetivos específicos

- Avaliar dano ao sistema imunológico através de Hemograma após tratamento com quimioterápico Vincristina;
- Avaliar um possível dano ao DNA causado pelo quimioterápico, através do teste de dano ao DNA, *PicoGreen*.

Materiais e Métodos

Logística do estudo

O estudo consistiu de 8 semanas, sendo 6 semanas de treinamento físico de natação e 2 semanas de tratamento com Vincristina. Para a realização deste estudo os animais foram divididos em dois grupos com relação à prática de natação: grupo exercício físico (n=20) e grupo sedentário (n=20). Após o período de natação, em cada grupo, os ratos foram tratados ou com

quimioterápico (n=10) ou com solução salina (n=10). Ao término do tratamento foi retirado sangue dos animais de todos os grupos para análise imunológica (sangue) e de dano ao DNA (plasma).

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, com peso variando entre 270 – 300g, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas a temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com alimento e água *ad libitum*. Todos os protocolos foram submetidos à avaliação pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria (parecer 090/2014). O número de animais utilizados foi o mínimo possível de modo a fornecer efeitos consistentes de nossos resultados. Os procedimentos experimentais foram realizados durante a fase clara do ciclo (9:00 – 16:00).

Treinamento físico (natação)

No período de seis semanas, os ratos selecionados para o grupo exercício físico, foram submetidos ao exercício de natação em estilo livre realizado em um tambor de plástico circular (diâmetro, 120 cm; profundidade, 90 cm) cheio com água mantida a uma temperatura de $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O treinamento consistiu de natação diária por 60 minutos, cinco dias por semana, durante seis semanas, entre 9:00 e 11:00 da manhã. Na primeira semana de exercício, os animais foram submetidos a um período de adaptação a natação sem pesos. Após o período de adaptação, os ratos foram submetidos ao exercício de natação com uma carga de trabalho (5% do peso corporal), para melhora da resistência (Gobatto *et al.*, 2001).

Já os ratos do grupo dos sedentários foram colocados em um tanque separado com pouca água (5 cm de profundidade) a $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 5 dias/semana, sem carga extra. Após as seis semanas, os ratos receberam o tratamento com VCR ou solução salina.

Administração do Sulfato de Vincristina

O Sulfato de Vincristina foi dissolvido em solução salina e injetado via intraperitoneal com dosagem calculada por peso corporal do dia, em aplicações semanais na dose de 0,5 mg/kg por duas semanas (dose total acumulada de 1,0 mg/kg).

Análise sanguínea para estimativa imunológica

Para o estudo hematológico os ratos foram anestesiados e o sangue foi coletado da artéria caudal dos animais na quantidade de 2ml, em frascos contendo 0,1mg do anticoagulante EDTA (etileno diamino tetra acetato de sódio). O hemograma foi realizado em todos os grupos ao final do protocolo a fim de observar os principais efeitos do quimioterápico Vincristina e/ou do exercício físico no sistema imunológico. Serão considerados os valores de plaquetas, leucócitos, hemoglobina e hematócrito sanguíneos. Este exame foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul pelos profissionais responsáveis pelo exame no local, com a observação da pesquisadora responsável por este estudo.

Análise dos níveis de DNA livre no plasma por fluorímetro (DNA Picogreen)

O Quant-iT™ *Picogreen* dsDNA Reagent (Invitrogen®) é um reagente fluorescenteultrassensível para a quantificação de duplas fitas de DNA em solução, o qual pode detectar concentrações ínfimas de DNA de até 25 pg/mL. O *Picogreen* apenas emite fluorescência quando se liga com o DNA dupla fita. Se esse reagente não está ligado à molécula de DNA não apresenta coloração e, conseqüentemente, não é detectada fluorescência.

Essa técnica pode ser utilizada para a quantificação do DNA liberado no meio devido a apoptose (morte) celular, com o objetivo de detectar citotoxicidade. Pode ser também empregada como uma medida de genotoxicidade quando for utilizada a molécula de DNA pura exposta a um determinado composto. Para a realização desta técnica foi utilizado o plasma sanguíneo e os procedimentos realizados seguiram o protocolo descrito por Há *et al.* (2011). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (%).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através de teste de ANOVA de duas vias, utilizando o programa de produção de gráficos e estatístico GraphPadPrim 6.0. Foram considerados resultados estatisticamente significativos àqueles onde p mostrou igual ou menor a 0,05.

Resultados

Análise sanguínea

Tendo como valores de referência 7.300 – 12.660 μ L para leucócitos totais, podemos observar que os ratos expostos ao quimioterápico VCR apresentaram significativa leucocitose, indicando reação do organismo a um processo inflamatório instalado ($F(1, 20)=30,05$ $p<0,05$). Os animais que realizaram exercício físico prévio apresentaram significativa diminuição no processo inflamatório comparado aos sedentários, visto que os leucócitos totais aumentaram em relação dos valores de referência ($F(1, 20)=5,602$ $p<0,05$; Figura I A).

Além disso, podemos observar importante plaquetopenia (diminuição no número de plaquetas) nos ratos tratados com VCR, sugerindo que este medicamento tenha efeitos tóxicos à medula óssea com comprometimento do seu funcionamento normal ($F(1,17)=16,14$ $p<0,05$). O exercício físico foi capaz de proteger deste dano ($F(1, 17)=7,727$ $p<0,05$; Figura I B).

Observamos também, que os níveis de eritrócitos (representados pela % de hematócrito, no hemograma) foram reduzidos no grupo tratado com VCR ($F(1,17)=40,31$ $p<0,05$). Este é um valor de referência para o controle da anemia provocada pela quimioterapia. O exercício físico foi capaz de proteger contra esse dano ($F(1,17)=36,44$ $p<0,05$; Figura I C).

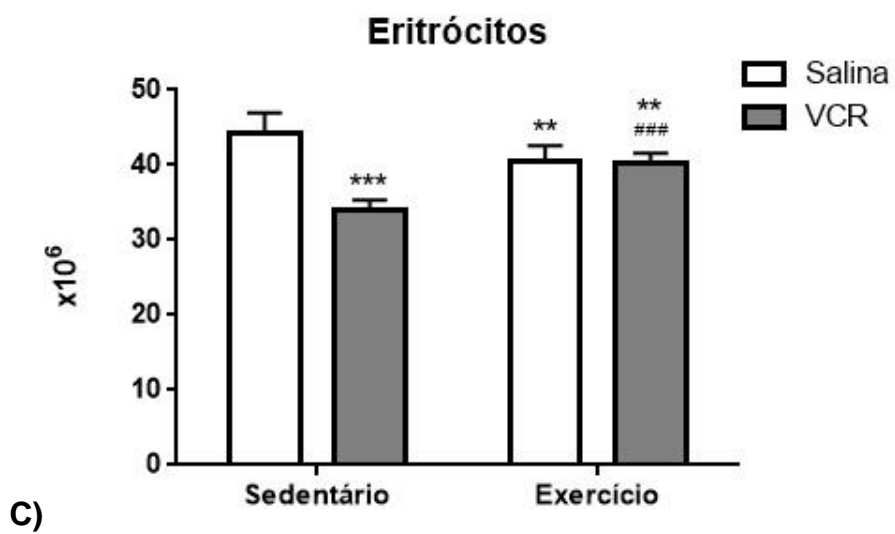
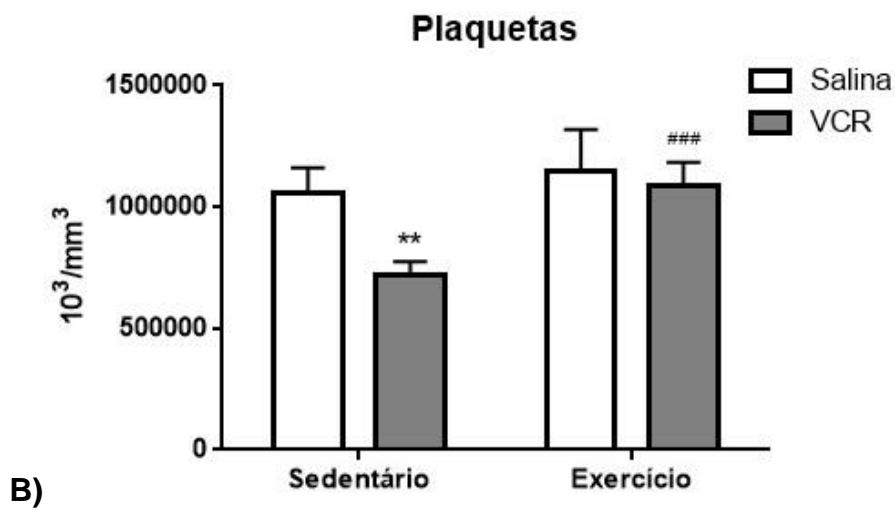
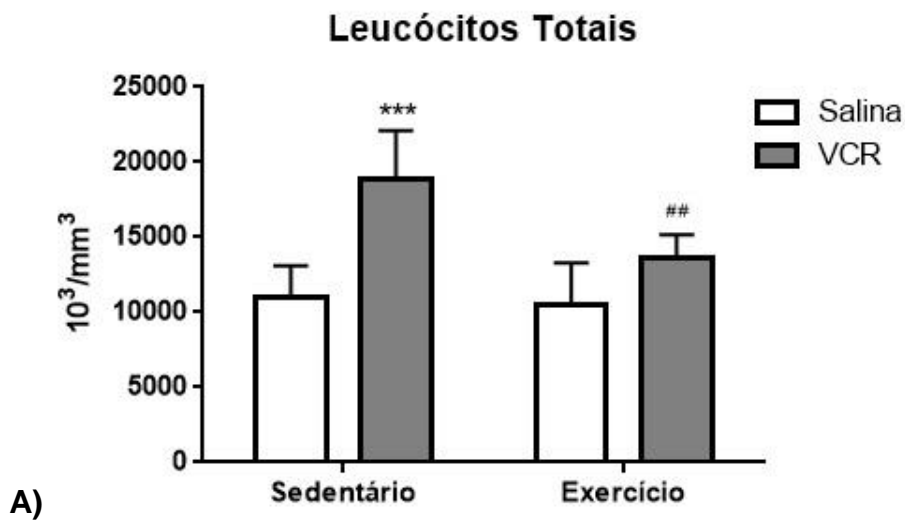


Figura I: Análise de hemograma. Leucócitos totais - valores de referência: 7.300 - 12.660 (A), Plaquetas - valores de referência: 840.000 - 1.240.000 μ L (B) e Eritrócitos - valores de referência: 41,1 – 51,1% (C), expressos em μ L.** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - em relação ao grupo Sedentário/Salina;## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ - em relação ao grupo Sedentário/ VCR;

Picogreen

Foi observado maior dano de DNA nos ratos tratados com Vincristina em comparação com o controle ($F(1, 16)=28,84$ $p < 0,05$), demonstrando o potencial genotóxico deste quimioterápico. Além disso, observamos efeito protetor significativo do exercício físico ($F(1, 16)=4,703$ $p < 0,05$; Figura II).

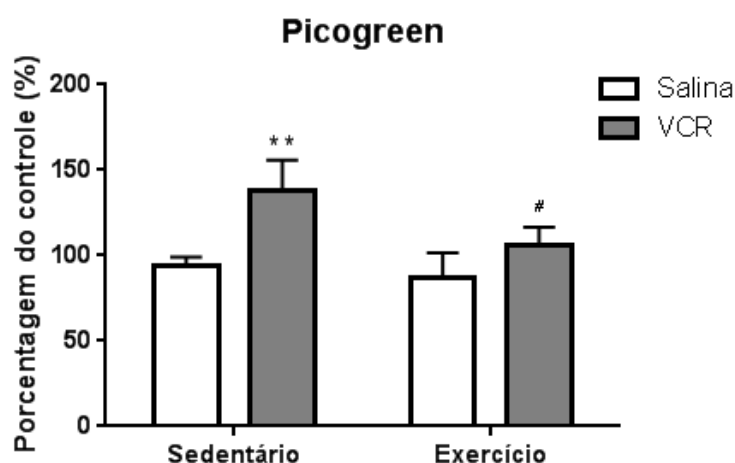


Figura II: Análise de fragmentação de DNA pelo método *Picogreen*, expressos em porcentagem do controle.** $p < 0,01$ em relação ao controle (Sedentário/Salina); # $p < 0,05$ em relação ao Sedentário/ VCR.

Discussão

Devido à grande variação nas doses e variáveis avaliadas em outros estudos, e à falta de pesquisas relacionadas à toxicidade geral da Vincristina, a opção por analisar o sangue no sétimo dia após a última dosagem foi baseada no pressuposto de que a imunossupressão é maior após o sétimo dia da aplicação da VCR. No estudo de Perez *et al.* (2005) observaram maior depressão medular após sete dias da aplicação da VCR. No hemograma observamos

aumento significativo nos níveis de leucócitos nos ratos tratados com VCR indicando uma reação do organismo ao processo inflamatório presente.

Ainda, corroborando com o estudo de Perez *et al.* (2005) e também com os achados da Anvisa (2009) a respeito do uso continuado deste quimioterápico, encontramos também importante plaquetopenia (diminuição no número de plaquetas) nos ratos tratados com VCR. Quanto aos níveis de eritrócitos, valores de referência para controle da anemia durante a quimioterapia, observou-se diminuição significativa nos ratos tratados com VCR.

O exercício físico prévio foi capaz de proteger contra essa diminuição nos valores de leucócitos, plaquetas e eritrócitos, sugerindo importante proteção imunológica aos danos causados pelo quimioterápico estudado. Nieman (1994) observou que o exercício físico mantém uma relação com os diferentes componentes envolvidos na resposta imunológica (leucócitos, linfócitos, neutrófilos, macrófagos, citocinas e imunoglobulinas), devido a este promover uma alteração da homeostase orgânica, levando a reorganização da resposta imune diante do desafio imposto ao organismo pela prática do exercício. De acordo com Nieman *et al.*, (2005), a prática de atividade física de intensidade moderada promove um efeito benéfico ao organismo pelo fato de aumentar o tempo dos leucócitos na corrente sanguínea e, conseqüentemente, a vigilância do sistema imune, contribuindo no combate contra os micro-organismos patógenos.

Os estudos atuais tem demonstrado preocupação com a genotoxicidade dos quimioterápicos e com isso desenvolvido métodos que pudessem atuar na diminuição deste dano. No nosso estudo, verificamos que o quimioterápico foi capaz de causar um dano ao DNA e que o exercício físico prévio protegeu da fragmentação de DNA.

Conclusão

Nesse estudo, o quimioterápico Vincristina causou danos ao sistema imunológico e de DNA, os quais foram diminuídos de forma significativa no grupo que fez o exercício prévio. Portanto, a prática de exercício regular pode

ajudar durante a quimioterapia, nos sentido de proporcionar menor expressão dos efeitos colaterais decorrentes do tratamento.

Referências Bibliográficas

Akimoto T, Kumai Y, Akama T, et al. (2003). Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. *Br J Sports Med* 37(1),76-79.

Anvisa,2009.Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=11006622013&pIdAnexo=1923358. Acesso dia 10 de março de 2015.

Brines R, Hoffman-Goetz L, and Pedersen BK (1996). Can you exercise to make your immune system fitter? *Immunol Today*(17), 252-254.

Cannon J, G. (1993). Exercise and resistance to infection. *J Appl Physiol*(74), 973-981.

Córdova A. (1994).Compendio de fisiologia para ciencias de la salud. Madrid: Ind. ed. Interamericana-McGraw-Hill..

Gobatto, C.A., de Mello, M.A., Sibuya, C.Y, de Azevedo, J.R, dos Santos, L.A., Kokubun, E. (2001).Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Compo BiochemPhysiol A MollIntegrPhysiol* 130:21-27.

Há, T. T. N., Huy, N. T., Murao, L. A., Lan, N. T. P., Thuy, T. T., et al. (2011).Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue VirusInfection. *PloS One*.

Nak, D.; Nak, Y.; Cangul, I.T. et al. (2005). A clinical-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J. Vet. Med.*, (52), 366-370.

Nieman D. C.; Nehlsen-Cannarella S. L. (1994). The immune response to exercise. *Semin Hematol*31(2), 166-179.

Nieman D. C.; Henson D.A.; Austin M. D.; Brown V.A. (2005). Immune response to a 30-minute walk. *Med Sci Sports Exerc.* 37(1),57-62.

Pagnano, K.B. et al. (2000). Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. *São Paulo Méd J*, São Paulo, 118 (6), 173-178.

Perez R., R. et al. (2005). A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin®) sobre parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin®). *Ciência Rural*, Santa Maria, 35 (2), 589-595.

Weider T.; Schurr T. (2003). Effect of exercise on upper respiratory tract infection in sedentary subjects. *Br J Sports Med* 37(4), 304-306.