

Treinamento de natação protege do desequilíbrio em 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

mrfighera@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. Entre os efeitos colaterais descritos, devido a sua toxicidade, estão às alterações do equilíbrio e na coordenação motora. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do exercício aeróbico prévio (6 semanas de natação, 1h/dia, 5 dias/semana, sobrecarga de 5% do peso corporal) em aspectos comportamentais de ratos Wistar 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. Um dia e 7 dias depois de cada dose os ratos foram avaliados com testes de equilíbrio (*Rotarod*), de exploração (Campo Aberto) e de força muscular (*Grip-Test*). Observou-se uma diminuição significativa do equilíbrio corporal e do comportamento exploratório nos ratos expostos à vincristina com proteção significativa do exercício físico. Não houve diminuição significativa da força muscular nos ratos tratados com VCR, porém o exercício por si só aumentou a força muscular e a distancia percorrida pelos ratos que fizeram natação. Portanto, o exercício físico mostrou-se protetor contra a perda de equilíbrio e diminuição da exploração observada nos ratos expostos ao quimioterápico.

Palavras chave: exercício físico, quimioterapia, vincristina, equilíbrio, comportamento.

Introdução

O tratamento dos cânceres é atualmente, um dos problemas mais desafiadores da medicina (Chabner Habner& Roberts, 2005). Os quimioterápicos antineoplásicos são bastante utilizados, pois a terapia com estes medicamentos atinge igualmente as metástases disseminadas pelo corpo. Entretanto, há desvantagens importantes a serem consideradas principalmente aquelas relacionadas aos seus efeitos colaterais, pois em sua grande maioria estes medicamentos apresentam baixo índice terapêutico, ou seja, dose terapêutica muito próxima à dose tóxica (Fukumasu, 2008).

A Vincristina (VCR) é um quimioterápico antineoplásico amplamente utilizado na clínica. Entre os seus efeitos colaterais estão descritos alterações do equilíbrio através de danos vestibulares por agressão ao oitavo nervo craniano, tontura, nistagmo, vertigem (Anvisa, 2008) e neuropatia periférica (Krarup-Hansen *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento com quimioterápicos, em um grande número de pacientes, está associado a imparidades em habilidades motoras e cognitivas (Ahles & Saykin 2002).

Sabe-se que o exercício contínuo pode contribuir na melhora da força muscular e assim contribuindo na coordenação e equilíbrio corporal. A prática regular de atividade física reduz as oscilações corporais devido aos efeitos do exercício tanto sobre os sistemas sensoriais quanto no sistema motor (Mann et al., 2008). O estudo de Lee, *et al.* (2014) verificou que exercícios em esteira aliviam disfunção motora de coordenação e equilíbrio. Já é sabido que quando praticado regularmente, os exercícios proporcionam uma série de benefícios à pacientes em tratamento de câncer, sendo observado: redução da fadiga (causada principalmente pela medicação), redução de náuseas, melhora na força muscular, melhor controle do peso, melhora na capacidade aeróbia e, principalmente, observa-se uma melhora na qualidade de vida do paciente (Bianchini, Kaaks, Vainio, 2002; Burnham, Wilcox, 2002).

A partir disso, considerando a relevância do exercício físico preventivo, e a necessidade de estratégias que visem a minimização dos efeitos tóxicos e colaterais do quimioterápico em pacientes em tratamento do câncer, surge a hipótese de que a prática de exercício físico regular poderia proteger dos efeitos deletérios no comportamento motor.

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício físico prévio no comportamento (coordenação motora, equilíbrio e força muscular) de ratos expostos ao quimioterápico Vincristina.

Objetivos específicos

- Avaliar a coordenação motora e o equilíbrio dos ratos através do teste *Rotarod*;
- Avaliar o comportamento motor e exploratório dos ratos através do teste de Campo Aberto;
- Avaliar a força muscular dos ratos com o Grip Test.

Materiais e Métodos

Logística do estudo

O estudo consistiu de 8 semanas de experimento, envolvendo 6 semanas de treinamento físico (natação) e 2 semanas de tratamento com quimioterápico Vincristina. Para a realização deste estudo os animais foram divididos em dois grupos com relação a prática de natação: exercício físico (n=20) e sedentários (n=20). Após o período de natação, em cada grupo, os ratos foram tratados ou com VCR (n=10) ou com solução salina (n=10). Para melhor entendimento deste estudo, realizamos o desenho experimental, abaixo (Figura I). Nos dias 0 e 7 os animais receberam o tratamento quimioterápico. Nos dias 1, 7, 8 e 15 os animais foram sujeitos aos testes de avaliação do equilíbrio, força muscular e do comportamento motor. O teste *Rotarod* envolveu também avaliação do estado basal, sem quimioterapia, no dia 0.

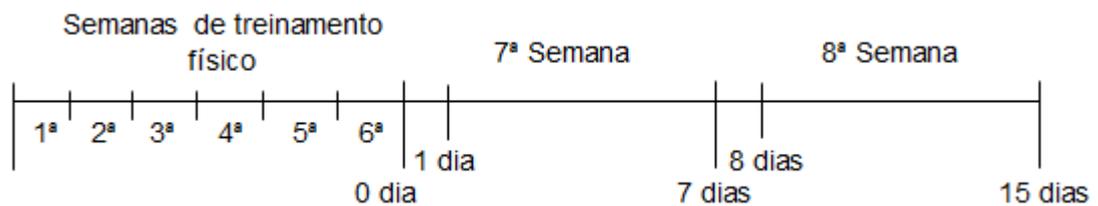


Figura I: Desenho experimental

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 utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 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

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, 120cm; 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 melhorada resistência (Gobatto *et al.*, 2001).

Já os ratos do grupo dos sedentários foram colocados 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. Após as seis semanas, os ratos receberam o tratamento com VCR ou solução salina.

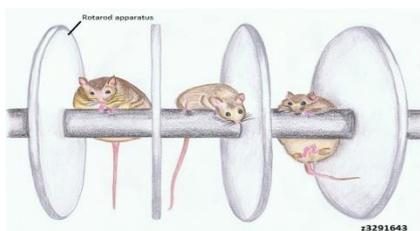
Administração do Sulfato de Vincristina

O Sulfato de Vincristina foi dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) e injetado via intraperitoneal com dosagem calculada por peso corporal do dia, em aplicações semanais na dose de 0,5 mg/kg. O tratamento consistiu de 2 semanas e em cada semana foi realizada uma dose de VCR, totalizando uma dose acumulada de 1,0 mg/kg.

Estudo do comportamento motor e do equilíbrio

Teste de equilíbrio no Rotarod: Para avaliação do equilíbrio e coordenação motora foi utilizado o *Rotarod* (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). No qual os ratos, individualmente, foram colocados no topo da haste de rotação (diâmetro de 4cm) voltado para a orientação oposta à do movimento da haste, de modo que a locomoção para a frente fosse necessária a fim de evitar uma queda. Os animais foram testados utilizando-se uma velocidade constante de

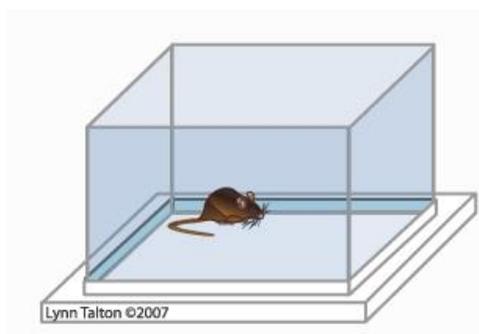
18rpm por um tempo máximo de 5 minutos. A latência para a queda foi automaticamente registrado por uma placa magnética contida no próprio aparelho. Nos primeiros dois dias após o término da natação, a cada rato foi permitido familiarizar-se com o aparelho na velocidade constante de 18rpm.



Google imagens

Figura II: Teste Rotarod

Teste de Campo Aberto: Para avaliar o comprometimento motor dos ratos expostos à VCR, foram testadas as suas atividades em Campo Aberto. Os animais foram colocados numa área (1,4 m de diâmetro) e a locomoção na área foi rastreada ao longo de um período de 4 min, registados utilizando uma câmara monocromática de resolução elevada e armazenados e analisados com Software Ethovision (v.8). A distância total movimentada (mm), a média de velocidade (mm/s), e quantidade de cruzamentos indicando a exploração do ambiente pelo animal foi calculada para posterior comparação entre grupos (Alimoradie *al*, 2012; Pourmohammadie *al*, 2012).



Google Imagens

Figura III: Teste de Campo Aberto

Avaliação da força muscular no Grip-Test: Como medida de força muscular e também de equilíbrio foi utilizado o *Grip-Test* (ou teste do reflexo de

preensão) em conformidade com van Wijk (2008). Neste teste o desempenho de cada rato é medido pelo tempo que este permanece suspenso. Para isso, cada animal foi aleatoriamente submetido a três ensaios com um intervalo de descanso de 30min entre as tentativas. O *Grip-Test* foi realizado um e sete dias depois de cada aplicação de quimioterápico.

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

Estudo do comportamento motor e equilíbrio

No tratamento com Vincristina observou-se uma diminuição no equilíbrio avaliado pelo teste *Rotarod* ($F(3, 22)=20,89$; $p\leq 0,05$). Ou seja, os ratos dos grupos tratados com Vincristina permaneceram no *Rotarod* períodos significativamente mais curtos que os grupos tratados com solução salina. A perda do equilíbrio aumentou progressivamente em função do tempo de exposição ($F(4,88)=4.549$; $p\leq 0,05$). Porém, nos ratos treinados previamente e tratados com VCR e salina, o exercício físico foi capaz de proteger quando comparado ao grupo sedentário com VCR ($F(12,88)=2.563$; $p\leq 0,05$. Figura IV).

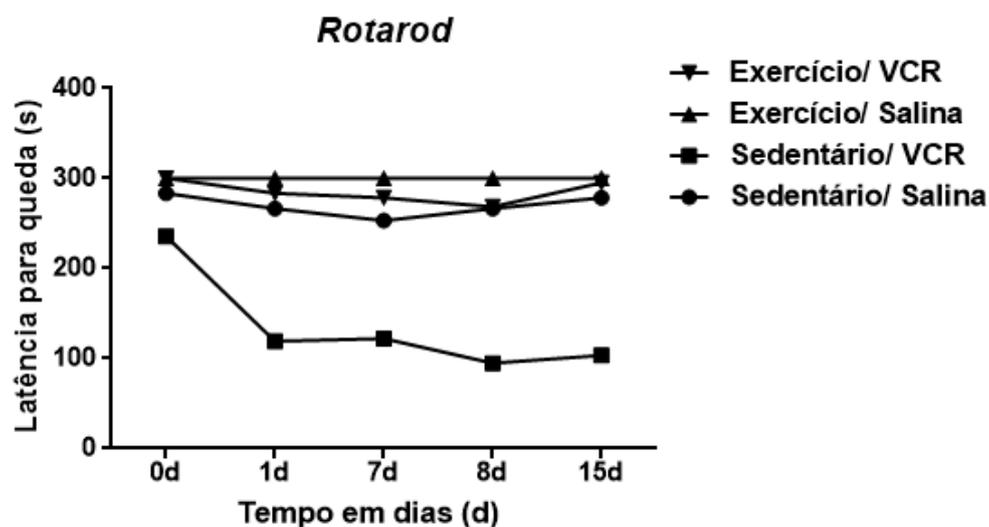
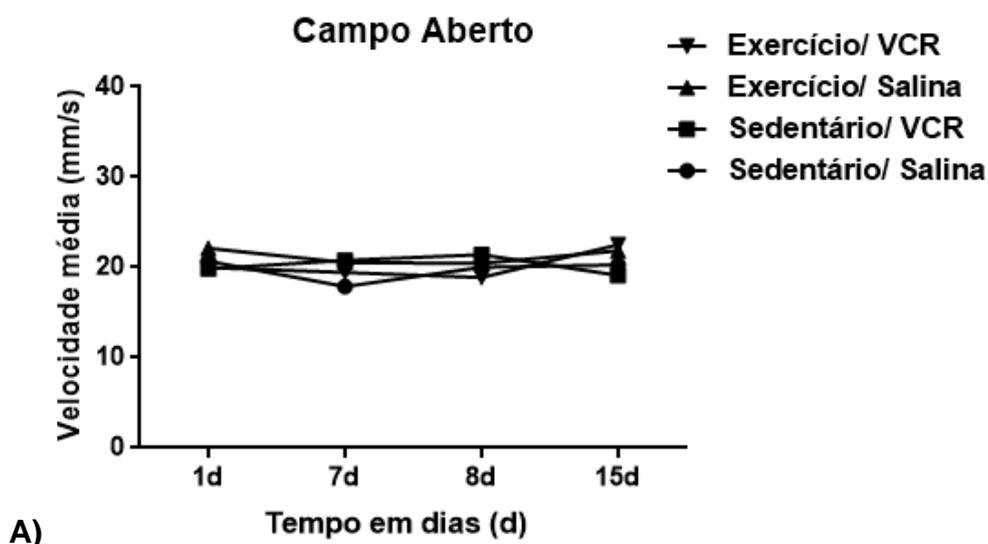


Figura IV: Teste de equilíbrio realizado no *Rotarod* nos períodos pré-quimioterapia, um e sete dias após a primeira dose e um e sete dias após a segunda dose.

No presente estudo, a administração do fármaco Vincristina não diminuiu significativamente a velocidade dos animais ($F(3, 20)=0,2990$; $p>0,05$, Figura V(A) no teste de Campo Aberto. Entretanto, a distância total percorrida ($F(9,80)=0,5862$; $p\leq 0,05$, figura V.B) e o número de cruzamentos realizados pelos animais durante o teste ($F(3, 96)=5,691$; $p\leq 0,05$, figura V.C), diminuiriam significativamente no grupo que recebeu o quimioterápico quando comparado ao grupo que fez exercício prévio e recebeu VCR também, indicando que o quimioterápico tem efeito negativo na exploração do ambiente e que o exercício tem capacidade de reduzir esses danos.



A)

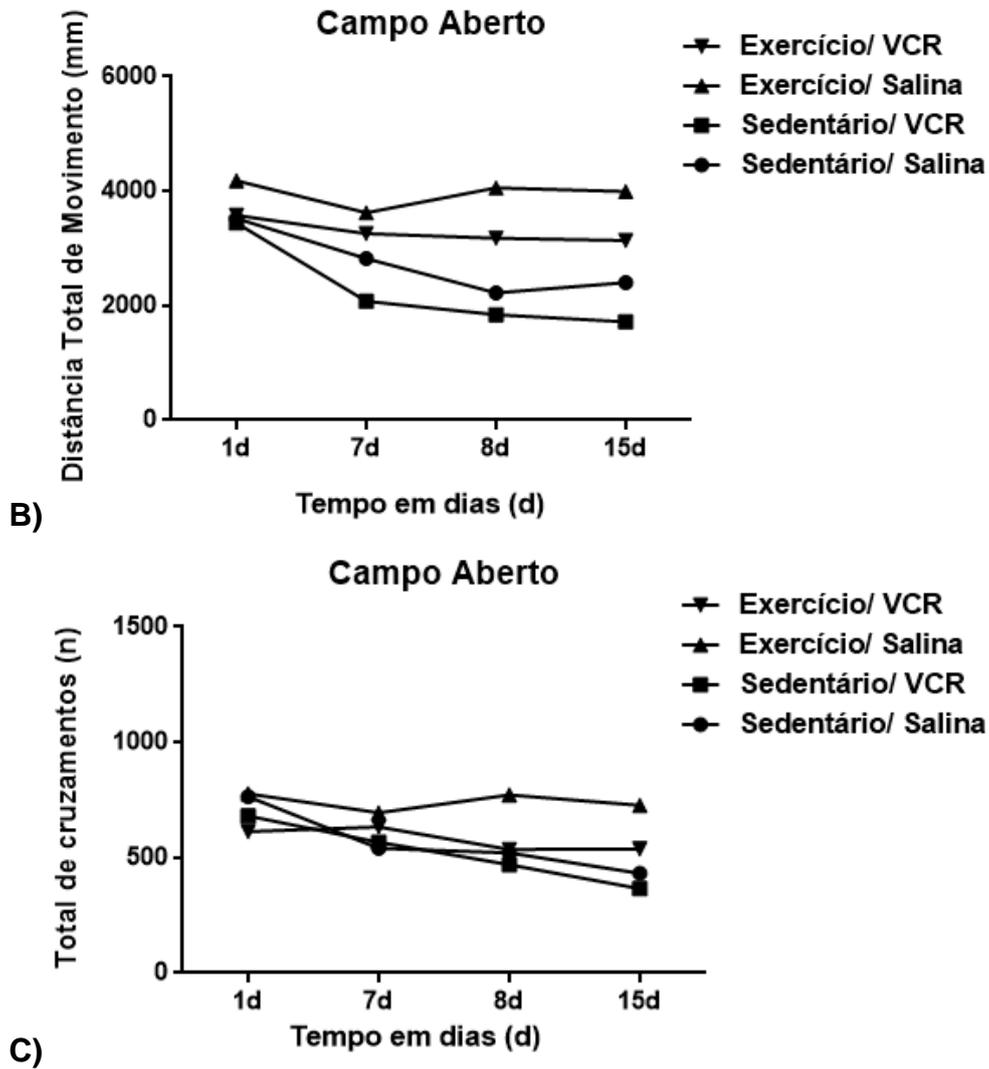


Figura V: Teste de Campo Aberto realizado um e sete dias após a primeira dose (dias 1 e 7) e um e sete dias após a segunda dose de quimioterapia (dias 8 e 15). **A.** Média de velocidade de deslocamento em mm/s; **B.** Distância total de deslocamento em mm e **C.** Total de cruzamentos realizados, indicando a exploração do ambiente pelos animais.

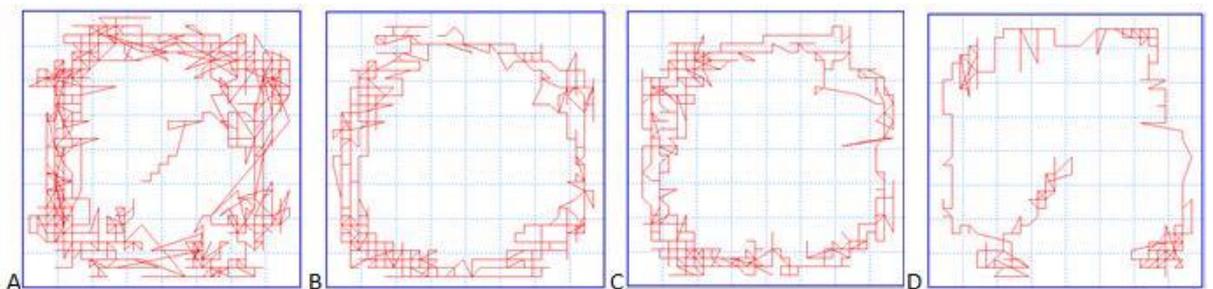


Figura VI: A atividade exploratória espontânea medida no Campo Aberto apresentou-se alterada nos ratos tratados com Vincristina (VCR) no sétimo dia após a segunda dose do quimioterápico (dia 15). Dose acumulada de 10,0mg/kg. Isto é visível quando comparamos o trajeto realizado pelas animais de cada grupo, indicando que a VCR provocou distúrbio na função motora dos animais e o exercício físico prévio foi capaz de reduzir esta disfunção. **A** Grupo Exercício/ Salina; **B** Grupo Exercício/ VCR; **C** Grupo Sedentário/ Salina; **D** Grupo Sedentário/ VCR.

No *Grip-Test* não foi observado dano significativo na força muscular dos ratos tratados com Vincristina ($F(9, 80)=0,4588$; $p>0,05$. Figura VII). Mas pode-se notar um efeito *per se* do exercício físico para o aumento da força muscular.

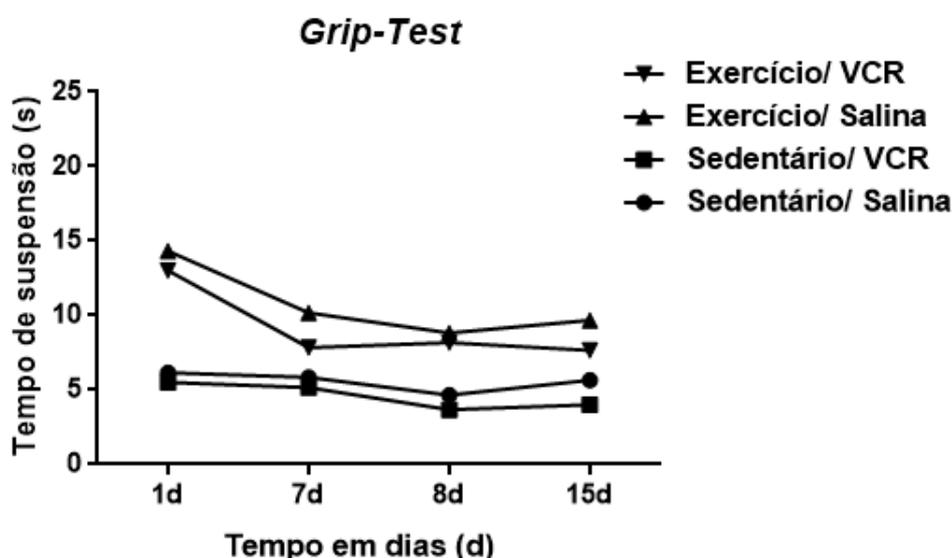


Fig. VII: Análise do efeito da VCR na força muscular, avaliada com o *Grip-Test*, um e sete dias após a aplicação da primeira dose, e um e sete dias após a aplicação da segunda dose.

DISCUSSÃO

Os componentes dos Alcalóides da Vinca, presentes na Vincristina, induzem neuropatia periférica crônica de forma já bem conhecida, mas a sua neurotoxicidade motora ainda não está bem elucidada. Estudos observaram déficits cognitivos, comportamentais e de função motora na dose acumulada de 1,0mg/kg (Shabani *et al.*, 2012).

Não observamos diminuição significativa da força muscular nos ratos tratados com VCR. Apesar disso, houve um aumento significativo da força muscular nos ratos treinados, em comparação com os sedentários, benefício este do exercício, que por si só é bastante conhecido pela literatura.

Em nosso estudo, os déficits importantes da função motora e do equilíbrio corporal foram amenizados significativamente nos ratos que realizaram treinamento de natação previamente ao tratamento com o quimioterápico. É visto que o exercício melhora a função cognitiva e melhora a disfunção motora (Heo *et al*, 2014; Kim *et al*, 2011).

Em nosso estudo, observamos uma diminuição significativa do equilíbrio corporal e da função motora nos ratos tratados com o quimioterápico Vincristina. No *Rotarod* o tempo de permanência dos animais tratados foi significativamente menor em comparação ao grupo controle, ou seja, os animais tratados com o quimioterápico caíram mais cedo nesse teste quando comparados ao grupo que fez o treinamento de natação.

O grupo exercício/vincristina teve o tempo de latência aumentado, ou seja, o exercício físico prévio foi capaz de proteger da perda de coordenação e equilíbrio, ambos causados pelo quimioterápico. Esse resultado pode ser devido ao ganho de força proporcionado com o exercício, assim como de coordenação, o que impediu que esses animais caíssem logo do teste. O estudo de Lee *et al*. (2014) verificou que exercícios em esteira aliviam disfunção motora de coordenação e equilíbrio, na doença de Alzheimer.

No teste de Campo Aberto houve uma diminuição significativa na distância total percorrida pelos animais tratados (em comparação com o grupo controle) o que corrobora com o estudo de Barzegar-Fallah *et al*. (2014), em que, no campo aberto a VCR causou perturbações da marcha, tornando a distância total de movimento e percentagem da duração total do movimento, significativamente reduzidas

Os resultados do nosso estudo mostram dados inovadores, principalmente, com relação à importância do exercício físico como um fator protetor, visto que seus benefícios no equilíbrio corporal e na função motora dos ratos expostos à VCR ficaram evidentes nas avaliações comportamentais deste estudo.

Conclusão

O exercício físico prévio de natação foi capaz de produzir proteção contra o desequilíbrio causado pelo quimioterápico Vincristina no teste *Rotarod*, aumento na distância percorrida no teste de Campo Aberto e na força muscular dos ratos treinados.

Referências Bibliográficas

Ahles, T. A., and Saykin, A. J. (2002). Breast câncer chemotherapy-related cognitive dysfunction. *Clinical Breast Cancer*, 3(3), 84-90.

Alimoradi H, Barzegar-Fallah A, Mohammadi-Rick S, Asadi F, Delfan B. (2012). Pretreatment of CAV combination chemotherapy with tropisetron shows less cardio and neurotoxicity side effects in rats. *Journal of Clinical Toxicology*.(6),2161-0495.

Anvisa- (2008) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25283-1-0\]](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25283-1-0]).

Barzegar-Fallah, A., *et al.* (2014).The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology*. (41,) 1–8

Bianchini, Franca, Kaaks, Rudolf; Vainio; Harri. (2002). Weight Control and Physical Activity in Câncer Prevention. *The International Association for the study of Obesity*, (3), 5-8

Burnham, T.R.; Wilcox,. (2002). A.Effects of exercise on physiological and psychological variables in cancer survivors. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 34(12),1863-7.

Chabner, B.A.,Roberts, T.G. Jr.(2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Rev.Cancer*. (5),65-72.

Fukumasu, H. (2008).Escreveu uma tese:Sobre os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, *Paullinia cupana Mart var.sorbilis*, em modelos

experimentais in vivo e in vitro. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP.

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 molintegrphysiol*(130),21-27.

Heo, Y.M., Shin, M.S., Lee, J.M., Kim, C.J., Baek, S.B., Kim, K.H., Baek, S.S.(2014) Treadmill exercise ameliorates short-term memory disturbance in scopolamine-induced amnesia rats. *Int.Neurorol J.* (18),16–22.

Kim, H., Heo, H.I., Kim, D.H., K.O, I.G., Lee, S.S., Kim, S.E., Kim, B.K., Kim, T.W., J.I, E.S., Kim, J.D., Shin, M.S., Choi, Y.W., Kim, C.J. (2011). Treadmill exercise and methylphenidate ameliorate symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder through enhancing dopamine synthesis and brain-derived neurotrophic factor expression in spontaneous hypertensive rats. *Neurosci. Lett.* (504),35–39.

Krarup-Hansen A. Helveg-Larsen S. Schmalbruch H, Rorth M. Krarup C. (2007). Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: Prospective clinical and neurophysiological studies. *Brain* (130), 1076-88.

Lee J.M., *et al.* (2014). Treadmill exercise improves coordination in Alzheimer's rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*10(5),258-264.

Mann G, Hetsroni I, Mei-Dan O. (2008). Continuous physical activity and the incidence of degenerative changes occurring in the lower limbs. *Harefuah. Apr*,147(4),311-3, 374.

Pourmohammadi, N., Alimoradi H, Mehr, S.,E, Hassanzadeh, G., Hadian M.,R., Sharifzadeh M, *et al.* (2012). Lithium attenuates peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* (110),231–7.

Shabani M, Larizadeh MH, Parsania S, Hajali V, Shojaei A. (2012). Evaluation of destructive effects of exposure to cisplatin during developmental stage: No profound evidence for sex differences in impaired motor and memory performance. *Int J Neurosci.* (122),439–48.

Wijk, N.V, Rijntjes, E., Heijning, B.V. (2008). Perinatal and chronic hypothyroidism impair behavioural development in male and female rats. *Exp. Physiol.* 93(11), 1199–1209.

