

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DISTÚRBIOS DA
COMUNICAÇÃO HUMANA**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO EQUILÍBRIO E
NO METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO DE
RATOS TRATADOS COM VINCRISTINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luiza Minato Sagrillo

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO EQUILÍBRIO E NO
METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO DE RATOS
TRATADOS COM VINCRISTINA**

Luiza Minato Sagrillo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audição e Equilíbrio, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana.**

Orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira (UFSM)
Coorientador: Prof. Silvio Teixeira da Costa (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Minato Sagrillo, Luiza

Efeito do exercício físico no equilíbrio e no metabolismo oxidativo-inflamatório de ratos tratados com vincristina / Luiza Minato Sagrillo.-2015.

86 p.; 30cm

Orientador: Aron Ferreira da Silveira

Coorientador: Silvio Teixeira da Costa

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, RS, 2015

1. Exercício físico 2. Vincristina 3. Estresse oxidativo 4. Equilíbrio corporal 5. Neurotoxicidade I. Ferreira da Silveira, Aron II. Teixeira da Costa, Silvio III. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Luiza Minato Sagrillo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Biblioteca Central Manoel Marques de Souza "Conde de Porto Alegre" - Avenida Roraima, nº 1000. Cidade Universitária. CEP 97105-900. Santa Maria, RS. Fone (0xx) 55 32208651

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação
Humana**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO EQUILÍBRIO E NO
METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO DE RATOS
TRATADOS COM VINCRISTINA**

Elaborada por
Luiza Minato Sagrillo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof^a Dra. Anaelena Bragança de Moraes (UFSM)

Dra. Maria Fernanda Manica-Cattani (UFSM)

Santa Maria, 28 de setembro de 2015

“Dedico este trabalho à minha querida família,

Razão de tudo.”

AGRADECIMENTOS

A Deus que é o mantenedor da minha fé e esperança.

Aos meus pais, Dilmar e Cristina, que apesar da saudade, respeitaram minhas ausências e sempre tiveram os meus sonhos como parte de suas metas pessoais. Agradeço pelo incansável desejo e esforço para que eu me tornasse todos os dias uma pessoa melhor. E, por me mostrarem que eu sempre posso ir mais longe. À ambos, minha profunda gratidão e amor eterno!

Ao meu irmão, Leonardo, por ser meu melhor amigo, meu confidente. Aquele que se orgulha das minhas conquistas e vibra comigo. Que, mesmo de longe, se mantém presente nas minhas melhores lembranças de infância e nos meus melhores planos para o futuro.

À minha “dinda”, Sandra, que é na verdade minha segunda mãe, por cuidar de mim com tanto amor e zelo e por torcer incansavelmente pelo meu sucesso. Agradeço pelas preces, pelas massagens, pelos passeios, pelos almoços de domingo... Por tudo o que de alguma forma trouxe e sempre trará alento pra minha alma.

Ao meu namorado, Andre, por acompanhar o meu crescimento pessoal e profissional com incentivo, amor e respeito. Por ter me ensinado a resolver problemas com paciência e bom humor. Por ser meu parceiro de viagens e de vida.

Às colegas de graduação, Carolina Dalla Costa e Carolina Veloso, que iniciaram a vida acadêmica comigo e dedicam, até hoje, um pedacinho do seu coração e um espaço do seu tempo para reencontros e incentivos diários ao meu crescimento.

Aos meus amigos de infância e àqueles que tive o prazer de conhecer durante minha trajetória, pela compreensão dos momentos importante em que não pude estar presente.

À minha querida prima Dr^a Michele Sagrillo, pela paciência em me auxiliar desde a elaboração do projeto de pesquisa, como também, na conquista de materiais necessários para o desenvolvimento desta.

Ao meu orientador, professor Aron, por me possibilitar chegar ao tão querido título de Mestre e por toda a confiança em meu trabalho, e, também, ao meu coorientador, professor Silvio pela disponibilidade.

Ao professor Luiz Fernando Royes e a sua esposa e também professora Michele Fighera pela extrema dedicação à ciência e por compartilharem carinhosamente seu espaço de trabalho e de busca de conhecimento para que eu pudesse concluir esta pesquisa.

A “grande família” do Laboratório de Bioquímica do Exercício, em especial a Viviane que foi minha fiel escudeira na realização deste trabalho, mas também, Aninha, Iuri,

Busanello, Gustavo, Rogério, Maurinho e todos que de alguma forma me ajudaram com conhecimento ou “mão de obra”.

A Dr^a Maria Fernanda Manica-Cattani por compartilhar seus conhecimentos comigo e me auxiliar na escrita deste trabalho.

A Beatriz do Laboratório de Biogenômica, ao Zé do Lasrafto e aos demais do “Laboratório da Cris” por cederem espaço para minha pesquisa e por não medirem esforços em me ajudar.

Aos alunos que orientei e ensinei, neste período, tanto na disciplina de docência orientada como quando professora temporária na Universidade Federal do Pampa. Agradeço o enorme crescimento profissional que esta experiência me proporcionou. Foi com vocês que tive a certeza de estar trilhando o caminho certo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, bem como aos professores do curso de Fisioterapia da UFSM, por todos os ensinamentos que me foram transmitidos.

À Universidade Federal de Santa Maria por disponibilizar um espaço físico tão rico de possibilidades acadêmicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

*“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas, Graças a Deus,
não sou o que eu era antes.”*

Marthin Luther King

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO EQUILÍBRIO E NO METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO DE RATOS TRATADOS COM VINCRISTINA

AUTORA: LUIZA MINATO SAGRILLO
ORIENTADOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA
COORIENTADOR: SILVIO TEIXEIRA DA COSTA

A vincristina é um quimioterápico usado para diversos tipos de cânceres, e tem como um dos principais efeitos colaterais o comprometimento da função motora e equilíbrio, bem como o desbalanço oxidativo e inflamatório. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do exercício físico no equilíbrio e no metabolismo oxidativo-inflamatório de ratos tratadas com Vincristina. Para isso, ratos com peso entre 270-300g foram divididos em dois grupos: Grupo treinado (n=20, 6 semanas de natação, 1h/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga de 5% do peso corporal) e Grupo sedentário (n=20, natação placebo em um tanque com água a 5cm de profundidade, sem carga extra). Após as 6 semanas os dois grupos (n=20 de cada) foram tratados com dose única semanal de 0,5mg/kg de sulfato de vincristina, durante duas semanas, totalizando uma dose acumulada de 1 mg/kg, por via intraperitoneal. Os ratos utilizados nos grupos controle (n=10 treinados e n=10 sedentários) receberam a mesma dose de solução salina (NaCl). Para análise da função motora e equilíbrio foram realizados, após as aplicações de quimioterapia, nos dias 1, 7, 8 e 15 os testes *Rotarod* (equilíbrio), *Grip-Test* (força muscular), Campo aberto (exploração) e o Placa quente (sensibilidade periférica). Ao final das avaliações (dia 15) foram retiradas as amostras de cerebelo para análise de estresse oxidativo (DCFH, SOD e CAT) e amostras de sangue para análise de *Picogreen* e hemograma. Na avaliação comportamental, observou-se uma diminuição do equilíbrio corporal nos ratos expostos à VCR e, também, uma proteção significativa do exercício físico. Não houve diminuição significativa da força muscular e da exploração no campo aberto dos ratos expostos à VCR, mas houve efeito *per se* do exercício físico, que aumentou a força muscular e a distância percorrida e o tempo de exploração em pé no Campo aberto nos ratos treinados. Houve alteração significativa na sensibilidade periférica nos ratos tratados e o exercício físico prévio foi capaz de normalizar este dano. Nas análises bioquímicas observamos um efeito protetor significativo do exercício físico nos ratos treinados/VCR, uma vez que os níveis de ROS foram diminuídos (análise de DCFH) e as enzimas do sistema antioxidante do cerebelo SOD e CAT modularam positivamente. Na análise de *Picogreen*, observamos uma proteção do exercício físico contra o dano de DNA no grupo treinado/VCR. No hemograma os ratos treinados/VCR, mantiveram os parâmetros analisados dentro dos valores de referência quando comparados aos sedentários/VCR. Sendo assim, o exercício físico mostrou-se um grande aliado na proteção do equilíbrio corporal e do sistema imunológico frente à toxicidade do quimioterápico Vincristina.

Palavras-chave: Exercício físico. Natação. Quimioterapia. Vincristina. Neurotoxicidade. Cerebelo. Equilíbrio. Comportamento. Ratos.

ABSTRACT

Master's Thesis
Post-Graduation Program in Human Communication Disturbance
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF THE TRAINING EXERCISE ON BALANCE AND OXIDATIVE-INFLAMMATORY METABOLISM IN RATS EXPOSED TO VINCRISTINA

AUTHOR: LUIZA MINATO SAGRILLO
ADVISOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA
CO-ADVISOR: SILVIO TEIXEIRA DA COSTA

The Vincristine is a chemotherapy used for various types of cancers, and is one of the major side effects the impairment of motor function and balance, as well as the oxidative and inflammatory unbalance. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of physical exercise on the balance and in the oxidative metabolism of rats treated with anti-inflammatory Vincristine. For this, rats weighing between 270-300 g were divided into two groups: Trained Group (n = 20, 6 weeks of swimming, 1:00/day, 5 days/week, with 5% overload body weight) and Sedentary Group (n = 20, placebo swimming in a tank with water to 5 cm deep, with no extra charge). After 6 weeks the two groups (n = 20 of each) were treated with a single dose of weekly 0, 5 mg/kg of vincristine sulfate, for two weeks, totaling a cumulative dose of 1 mg/kg intraperitoneal. The rats used in control groups (n = 10 n = 10 trained and sedentary) received the same dose of saline (NaCl). For analysis of motor function and balance were performed after chemotherapy applications, on 1, 7, 8,15 days: *Rotarod* tests (balance), Grip Test (muscle strength), the Open field (exploration) and the hot plate (peripheral sensitivity). At the end of the assessment (day 15) cerebellum samples were taken for analysis of oxidative stress (DCFH, SOD and CAT) and blood samples for analysis of *Picogreen* and CBC. In behavioral assessment, there was a decrease in body balance in rats exposed to the VCR and, also, a significant protection of physical exercise. There was no significant decrease in muscle strength and exploitation in the open field of rats exposed to VCR, but there was no effect per se of physical exercise, which increased muscle strength and the distance and the operating time standing in the open field in mice. There was significant change in peripheral sensitivity in mice treated and prior exercise was able to normalize this damage. In biochemical analysis we observed a significant protective effect of exercise in trained/VCR rats, once ROS levels were reduced (DCFH analysis) and antioxidant system enzymes of the cerebellum SOD and CAT modulated positively. In the analysis of observed *Picogreen* exercise protection against DNA damage in the trained/VCR group. The CBC trained /VCR rats they kept the parameters analyzed within the reference values when compared to sedentary/VCR. Therefore, the exercise proved to be a great ally in protecting the body and balance the immune system front of chemotherapy toxicity Vincristine.

Keywords: Physical exercise. Swimming. Chemotherapy. Vincristine. Neurotoxicity. Cerebellum. Balance. Behavior. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração referente à Metodologia deste estudo

FIGURA 1	Desenho experimental	29
FIGURA 2	Desenho ilustrativo do Teste <i>Rotarod</i> . Google imagens.	32

Ilustrações referentes ao artigo “Efeito protetor do treinamento de natação no equilíbrio corporal e na função motora de ratos tratados com Vincristina”

FIGURA 1	Análise do efeito da VCR no equilíbrio corporal dos ratos Treinado e dos ratos Sedentários, avaliados no <i>Rotarod</i> nos períodos pré-quimioterapia (dia 0), um e sete dias após a primeira dose (dias 1 e 7) e um e sete dias após a segunda dose do quimioterápico (dias 8 e 15). Valores obtidos por médias.	46
FIGURA 2	Análise do efeito da VCR na força muscular dos ratos Treinado e dos ratos Sedentários, avaliada com o <i>Grip-Test</i> , um e sete dias após a primeira dose (dias 1 e 7) e um e sete dias após a segunda dose do quimioterápico (dias 8 e 15). Valores obtidos por média.	47
FIGURA 3	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 tempo de exploração em pé.	48
FIGURA 4	A atividade exploratória espontânea medida no Campo Aberto. A Grupo Treinado/ NaCl; B Grupo Treinado/ VCR; C Grupo Sedentário/ NaCl; D Grupo Sedentário/ VCR.	49
FIGURA 5	Análise do efeito da VCR na sensibilidade periférica dos ratos Treinados e dos ratos Sedentários, avaliada com o teste da Placa Quente, sete dias após a primeira dose (dia 7) e sete dias após a segunda dose do quimioterápico (dia 15).	50

Ilustrações referentes ao artigo “Efeito protetor do treinamento de natação no metabolismo oxidativo-inflamatório de ratos tratados com Vincristina”

FIGURA 1	Análise do estresse oxidativo pelo aumento do grupo peroxilas no DCFH.	65
FIGURA 2	Análise das enzimas antioxidantes. A Atividade da SOD, demonstrada em units/mg de proteína. B Atividade da enzima Catalase (CAT), demonstrada em units/mg de proteína..	66
FIGURA 3	Análise de hemograma. Leucócitos totais - valores expressos em $10^3/\text{mm}^3$.	
FIGURA 4	Análise de hemograma. Plaquetas - valores expressos em $10^3/\text{mm}^3$.	68

- FIGURA 5 Análise de hemograma. Eritrócitos - valores expressos em $\times 10^6$. 68
- FIGURA 6 Análise de fragmentação de DNA pelo método *Picogreen*, expressos em porcentagem do controle. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DCFH	Dihidroclorofluoresceína
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
et al.	E colaboradores
i.p.	Intraperitoneal
rpm	Rotações por Minuto
SOD	Superóxido Dismutase
UFSC	Universidade Federal de Santa Maria
VCR	Vincristina

LISTA DE SÍMBOLOS

NaCl	Cloreto de sódio
cm	Centímetros
±	Desvio padrão
g	Gramas
°C	Graus centígrados
h	Horas
kg	Kilograma
≤	Menor ou igual
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm/s	Milímetros por segundo
mM	Milimol
μL	Microlitro
nmol	Nanomol
n	Número
pH	Potencial de hidrogênio
%	Porcentagem
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

LISTA DE ANEXOS

Anexo A Comprovante de aprovação da Comissão de Ética em 86
Experimentação Animal

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1 SISTEMA VESTIBULAR E EQUILÍBRIO	20
2 VINCRISTINA	22
3 EXERCÍCIO FÍSICO E QUIMIOTERAPIA	24
3.1 Estresse oxidativo	25
3.2 Sistema imunológico	26
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo geral	28
4.2 Objetivos específicos	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 Logística do estudo	29
5.2 Animais	29
5.3 Treinamento físico	30
5.4 Administração do Sulfato de Vincristina	30
5.5 Estudo do comportamento motor e do equilíbrio	31
5.5.1 Avaliação do equilíbrio corporal no <i>Rotarod</i>	31
5.5.2 Avaliação da força muscular com <i>Grip-Test</i>	32
5.5.3 Avaliação do comportamento motor no Campo Aberto	32
5.5.4 Avaliação da sensibilidade periférica na Placa Quente	33
5.6 Análises bioquímicas	33
5.6.1 Medida do Dihidroclorofluorsceína (DCFH)	34
5.6.2 Atividade da enzima Catalase (CAT)	34
5.6.3 Análise da expressão da Superóxido Dismutase (SOD)	34
5.6.4 Análise sanguínea para estimativa imunológica	35
5.6.5 Análise dos níveis de DNA livre no plasma por fluorímetro (DNA <i>Picogreen</i>)	35

5.7	Análise estatística	36
6	RESULTADOS	37
	ARTIGO 1: “Efeito protetor do treinamento de natação no equilíbrio corporal e na função motora de ratos tratados com Vincristina”	38
	ARTIGO 2: “Efeito protetor do treinamento de natação no metabolismo oxidativo-inflamatório de ratos tratados com Vincristina”	56
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ANEXO	85

INTRODUÇÃO

O tratamento dos cânceres é atualmente, um dos problemas mais desafiadores da medicina (CHABNER e 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). Esta droga também é capaz de causar alterações imunológicas e depressão medular, dependendo do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga (PAGNANO et al., 2000; PEREZ et al., 2005).

Além disso, sabe-se que há um aumento de peroxidação lipídica no tecido cerebral de ratos expostos à Vincristina, indicando associação do quimioterápico com estresse oxidativo (MARTINS et al., 2011). O sistema nervoso central (SNC) é mais suscetível a danos oxidativos, pois apresenta grande atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, associada à elevada concentração de ferro livre e lipídios polinsaturados, e baixos níveis de enzimas antioxidantes (TERMINASSIAN, 2006). A crescente associação de alguns quimioterápicos com estresse oxidativo tem alertado as pesquisas para a busca de estratégias que visam a prevenção contra ação de radicais livres no tecido nervoso.

As caracterizações de elementos celulares individuais e suas conexões sinápticas no cerebelo são essenciais para o entendimento da precisão e compreensão dos mecanismos de coordenação motora (HIRONO et al., 2012). Ainda existem poucos estudos sobre a sensibilidade diferencial dos neurônios do cerebelo, astrócitos e células neoplásicas aos medicamentos quimioterápicos. O estudo *in vitro* de Wick et al. (2004), evidenciou que os quimioterápicos Cisplatina,

Lomustina, Vincristina e Cloridrato de Topotecana reduziram a viabilidade celular de neurônios cerebelares. Neste estudo, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foi o que preveniu a morte celular neuronal induzida pelos quimioterápicos. Nesse sentido, terapias que modulem positivamente o sistema antioxidante podem ser importantes ferramentas no tratamento de diversas doenças e toxicidades que afetem o SNC.

Além de importante modulador do sistema imunológico (KRZYWKOWSKI et al., 2001; NIEMAN, 2001), estudos em modelos experimentais mostraram que o exercício físico aumenta a expressão de BDNF (GRIESBACH, HOVDA e GOMEZ-PINILLA, 2009) e modula positivamente o sistema antioxidante, aumentando o conteúdo e/ou atividade das enzimas Superóxido desmutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidases (GPx) tanto no músculo como no cérebro de ratos (RAMBO et al., 2009; STEINER e PHILBERT, 2011). Porém ainda é incipiente estudos sobre os benefícios do exercício físico em conjunto à tratamentos com quimioterápicos.

1 SISTEMA VESTIBULAR E EQUILÍBRIO

O equilíbrio corporal é fundamental para que os seres humanos possam adotar posturas e realizar movimentos com harmonia e conforto físico e mental (GANANÇA et al. 2000). Para tanto o equilíbrio corporal é mantido pelo funcionamento conjunto de três estruturas: o sistema vestibular, o sistema visual e o sistema proprioceptivo. A manutenção do equilíbrio geral é realizada pelo sistema vestibular. Esse sistema detecta as sensações de equilíbrio, auxiliando na coordenação dos movimentos da cabeça e dos olhos, e nos ajustes da postura corporal. Disfunções neste sistema podem resultar em sensações desagradáveis como vertigem, náusea e uma sensação de desequilíbrio acompanhada de movimentos incontrolláveis dos olhos, o nistagmo (AFIFI e BERGMAN, 2008).

A posição do corpo, o movimento dos olhos e a percepção espacial são controlados pelo sistema vestibular, com o objetivo de manter o equilíbrio corporal e a complexa interação entre o sensorial e o motor que nos previne de quedas. Quando ocorre uma alteração visual, proprioceptiva ou vestibular surgem alterações, que caracterizam o desequilíbrio. Caso essa alteração seja de origem vestibular, vários sintomas ocorrem, sendo a tontura o mais comum e o que mais afeta a qualidade de vida do indivíduo (POPPER, 2001).

O sistema proprioceptivo-vestibular constitui o ponto inicial de contato do ser humano com o ambiente. O sistema vestibular é composto por três componentes fundamentais: um sistema sensorial periférico, um processador central e um mecanismo de resposta motora. O sistema periférico é constituído de um conjunto de sensores do movimento, os quais enviam informações ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao complexo nuclear vestibular e ao cerebelo, sobre a velocidade angular da cabeça, a aceleração linear e a orientação cefálica em relação ao eixo gravitacional. O SNC processa esses sinais e os combina com outras informações sensoriais, para estimar a orientação cefálica (HERDMAN, 2002).

Tradicionalmente o cerebelo tem sido visto como uma parte do sistema nervoso central motor responsável pela iniciação e regulação dos movimentos padrões, recebendo estímulos primariamente do córtex motor, órgãos vestibulares e

dos receptores proprioceptivos (LEINER, LEINER e DOW, 1986). Ele exerce uma influência reguladora sobre a atividade muscular, recebendo impulsos originados em receptores das articulações, tendões, músculos, pele e também de órgãos terminais do sistema visual, auditivo e vestibular, sendo que esses impulsos não são conscientes, mas essenciais para o controle do movimento (HENNEMAN, 1982). O córtex cerebelar de mamíferos, incluindo humanos, possui uma citoarquitetura caracterizada por três camadas: a camada molecular, a camada das células de Purkinje e a camada granular (VOOGD, 2003).

Os principais sinais de disfunção cerebelar incluem instabilidade postural, falta de controle motor durante a execução de atividades motoras e perda do sincronismo e do planejamento apropriado das ações motoras. Essas disfunções podem ocorrer separadamente ou combinadas, refletindo a região ou regiões específicas do cérebro afetadas (BARCO, ENGEBY e RIBAL, 2001).

Devido à regularidade de seus neurônios, sua organização e seus circuitos (BRAVIN et al., 1999) o cerebelo tem sido alvo de muitos estudos, incluindo a ação de fármacos anticarcinogênicos.

2 VINCRISTINA

Evidências mostram que os quimioterápicos que atravessam a barreira hematoencefálica estão associados com relevante neurotoxicidade (PELS et al., 2003). No estudo feito por Wick e colaboradores (2004) foi observado que a cisplatina, a lomustina (CCNU), o cloridrato de topotecana e a vincristina induziam a morte celular em cultura de neurônios granulares de cerebelo, em condições bem estabelecidas.

A Vincristina (VCR) é um alcalóide, isolado das folhas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Apocynaceae), uma planta, antigamente chamada de *Vinca rosea* L. e popularmente conhecida como Vinca (BRANDÃO et al., 2010). A VCR tem ação antimitótica pois atua ligando-se aos microtúbulos impedindo a formação do fuso acromático, resultando na interrupção da divisão celular (COPPOC, 2009). As principais indicações para o uso destes alcalóides são: leucemia linfocítica aguda; neuroblastoma; tumor de Wilms; câncer de mama; câncer de pulmão de pequenas células; câncer epitelial de ovário; câncer cervical; câncer colorretal; linfomas de Hodgkin; linfomas não-Hodgkin; rabdiossarcoma; sarcoma de Ewing; osteossarcoma; melanoma maligno; tumor de célula germinativa de ovário; micose fungóide; púrpura trombocitopênica idiopática; sarcoma de Kaposi associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (ANVISA, 2009).

Os tratamentos com alcalóides da vinca podem alterar o equilíbrio através de danos vestibulares por agressão ao oitavo nervo craniano. As manifestações incluem dificuldades no equilíbrio, tontura, nistagmo e vertigem. Outro sintoma associado a administração do sulfato de vincristina combinado com outros agentes, como os oncolíticos contendo platina, é a ototoxicidade. Além de serem relatados perda dos reflexos tendinosos profundos, pé caído, ataxia e paralisia com o uso continuado do quimioterápico. Podem ocorrer, ainda, manifestações dos nervos cranianos, incluindo paresia isolada e/ou paralisia dos músculos controlados pelos nervos cranianos motores, na ausência de distúrbio motor (ANVISA, 2009).

O Sulfato de Vincristina não é absorvido pelo trato gastrointestinal, por isso é administrada exclusivamente pela via intravenosa, exigindo cautela em sua administração, pois causa graves danos teciduais quando ocorre extravasamento. É

metabolizada pelo fígado e excretada pela bile. As doses usuais do quimioterápico, por via intravenosa direta, são: 0,01 a 0,03 mg por Kg de peso, como dose única a cada 7 dias; ou 0,4 a 1,4 mg/m² de superfície corporal, como dose única a cada 7 dias. Estudos mostram que após doses únicas de 3 mg/m² podem surgir sintomas neurotóxicos graves em adultos, sendo essa a manifestação dose-limitante para sua administração (VERSTAPPEN et al., 2005; ANVISA, 2008). A administração intratecal inadvertida de VCR é universalmente fatal (HENNIPMAN et al., 2009).

A toxicidade dos fármacos, principalmente quimioterápicos, provoca peroxidação lipídica, considerada um evento fisiopatológico importante em diversas doenças e em danos isquêmicos e traumáticos (BRAUGHLER et al., 1987). A membrana celular é o principal sítio atingido por esta reação bioquímica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído – MDA), culminando com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O SNC é um tecido que consiste substancialmente de membranas e ácidos graxos, o que aumenta a vulnerabilidade dos constituintes da membrana celular aos danos oxidativos e a ação direta dos radicais livres (VEDDER et al., 1999). Além disso, o tratamento com quimioterápicos, em um grande número de pacientes, está associado a imparidades em habilidades motoras e cognitivas. A disfunção cognitiva é tida um efeito colateral a longo prazo (AHLES e SAYKIN, 2002; SEIGERS e FARDELL, 2011) e os déficits são relacionados em sua maioria com a memória, velocidade de processamento, e atenção (CORREA e AHLES, 2008). Esta deficiência pode ser detectada dentro de meses após o início do tratamento e durar até vários anos (AHLES e SAYKIN, 2002).

Segundo a ANVISA (2009), alguns pacientes podem apresentar queda na contagem de leucócitos e plaquetas, particularmente quando a terapia prévia ou a própria doença reduziu a função da medula óssea. Recomenda-se fazer um hemograma completo antes da administração de cada dose. A ocorrência de leucopenia ou de infecção exige rigorosa ponderação antes de ser administrada a dose subsequente. Outras reações como perda de cabelo, parestesia, descoordenação motora, diminuição das sensações, diminuição dos reflexos tendinosos profundos e cansaço muscular podem persistir durante todo o período de tratamento.

3 EXERCÍCIO FÍSICO E QUIMIOTERAPIA

Nas últimas décadas os efeitos benéficos da atividade física sobre o sistema nervoso central (SNC) têm sido evidenciados, sugerindo um papel protetor contra uma variedade de distúrbios psicológicos e neurológicos (VAN PRAAG et al., 1999; HILLMAN, ERICKSON e KRAMER, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que o exercício físico é benéfico em uma série de modelos de doenças do SNC, como, Esclerose Múltipla, doenças de Huntington, Parkinson, Alzheimer e epilepsia (ARIDA et al., 1999; LAURIN et al., 2001; TILLERSON et al., 2003; KOHL et al., 2007; BENEDETTI et al., 2009). Em um estudo realizado por Griesbach et al. (2007), em que o exercício voluntário com ratos foi iniciado duas semanas após o traumatismo crânio encefálico leve, observou-se aumento dos marcadores da plasticidade sináptica, concomitante com a melhora no desempenho dos animais em testes de aprendizado e memória.

Assim, o exercício melhora a função cognitiva e melhora a disfunção motora (KIM et al., 2011; HEO et al., 2014) e pode, também, atenuar deficiências neurológicas após várias lesões cerebrais tais como isquemia cerebral, hemorragia, e doença de Parkinson (SUNG et al., 2012; MCDONNELL et al., 2013). O estudo de Lee, *et al.* (2014) verificou que exercícios em esteira aliviam disfunção motora de coordenação e equilíbrio, reduzindo a perda de células de Purkinje através da supressão dos astrócitos reativos no cerebelo de ratos com doença de Alzheimer. Estes resultados sugerem que exercício em esteira melhorou a taxa de sobrevivência de neurônios de Purkinje via infra-regulação dos astrócitos reativos.

Os efeitos do exercício físico sobre a saúde geral são bem descritos, principalmente sobre o sistema cardiovascular e metabolismo (BOOTH, CHAKRAVARTHY e SPANGENBURG, 2002). 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 e WILCOX, 2002). Alguns trabalhos têm direcionado ao entendimento das bases

neurobiológicas desses benefícios. Dessa forma, vários autores mostraram que o exercício físico voluntário e aeróbico forçado aumenta a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (VAN PRAAG et al., 1999; RADAK et al., 2006; DIETRICH, ANDREWS e HORVATH, 2008) e que, a ativação desse fator trófico está relacionada com a sobrevivência e diferenciação celular, assim como, com o aumento da resistência ao estresse oxidativo (KLUMPP e LIPOWSKY, 2005; LEEDS et al., 2005).

Neste sentido, muitas vantagens com a prática de exercícios aeróbios, regulares e com moderadas intensidades estão relacionadas ao tratamento de indivíduos com câncer e por isso constituem um importante aliado durante o tratamento quimioterápico e por radiação (BURNHAM e WILCOX, 2002).

3.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo corresponde ao evento resultante do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou do nitrogênio (RNS) sendo que as espécies reativas podem ser formadas a partir de fontes exógenas como fumo, radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos (MALAVÈS, 2003). Tal desequilíbrio é responsável por várias ações deletérias no nosso organismo, como peroxidação de lipídios, carbonilação de proteínas e danos ao DNA das células, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais de vários tecidos e órgãos (ZOPPI et al., 2003). O organismo humano desenvolveu sistemas de defesa para lidar com o estresse oxidativo. Essa defesa inclui sistemas enzimáticos, compostos principalmente pelas enzimas SOD, GPx, e CAT, e o sistema antioxidante não-enzimático representado pelas vitaminas A, C, E e D, e a GSH (GUTTERIDGE, 1995), que são reconhecidamente muito eficientes na detoxificação de ROS (MCLEAN et al., 2005)

Os radicais livres produzidos pelo organismo têm alta reatividade e meia vida curta (VOSS e SIEMS, 2006). Por este motivo, sua determinação *in vivo* não é viável. Em contrapartida os lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, após

serem modificados pelas espécies reativas, tem uma meia vida maior, o que os torna marcadores ideais do estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

Em comparação com outros órgãos, o cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, pois possui menor atividade das enzimas SOD, CAT e GPx e menor quantidade de GSH (DRINGEN, 2000), por utilizar grande quantidade de oxigênio e por conter uma grande quantidade de ferro e de ácidos graxos poliinsaturados (DRINGEN, 2000; JOVANOVIC e JOVANOVIC, 2011). Martins et al. (2011) observaram um aumento da peroxidação lipídica no tecido cerebral de ratos expostos à Vincristina, indicando associação do quimioterápico com estresse oxidativo.

Os benefícios à saúde em geral e na prevenção de doenças pelo exercício são bem conhecidos. Entretanto, o exercício crônico também representa uma forma de estresse oxidativo para o organismo e pode alterar o balanço entre oxidantes e antioxidantes. Uma série aguda de exercícios pode aumentar a atividade de algumas enzimas antioxidantes sem nova síntese protéica. Esta atividade de proteção é limitada as características enzimáticas individuais e o tecido envolvido. Como estratégia a longo prazo, as células podem aumentar a síntese protéica de enzimas antioxidantes para controlar o estresse oxidativo (AGUIAR, ADERBAL, PINHO, 2007).

3.2 Sistema imunológico

A aplasia-hipoplasia da medula óssea é caracterizada pela diminuição de todas as linhagens celulares da medula óssea (medula óssea aplásica ou pancitopeniaaplásica) ou dos precursores eritróides (aplasia ou hipoplasia de hemácias ou aplasia isolada de hemácias). Causam anemia ou citopenias combinadas que podem ser induzidas por uma grande variedade de distúrbios ou agentes e estados de desnutrição protéica (VITURI et al., 2000). Os quimioterápicos figuram como causadores em potencial dessas aplasias/ hipoplasias medulares (NELSON e COUTO, 1998). A avaliação de toxicidade à medula óssea (MO) é

realizada, principalmente, através do hemograma, cálculo dos índices hematimétricos (VCM, CHCM) e contagem de plaquetas.

Dentre os efeitos colaterais importantes que ocorrem com uso do quimioterápico Vincristina, está a leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos no sangue) e como consequência a essa alteração no sistema imunológico há um aumento da suscetibilidade à infecções (ANVISA, 2009).

No entanto, a resposta imunológica varia de acordo com a quantidade de células envolvidas no combate da infecção. Com isso, aumentará também a quantidade de nutrientes necessários para manter a atividade defensiva, sendo a glutamina o principal recurso. A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no músculo e no plasma (BURNHAM e WILCOX, 2002), também encontrada em vários outros tecidos humanos. O tecido muscular mostra-se como responsável pela maior produção desse aminoácido (ROGERO e TIRAPGUI, 2003). Evidências mostram que exercício físico menos extenuante mantém as concentrações plasmáticas de glutamina normais ou até as implementam (pós exercício), tendo então melhores condições para a atuação imunológica (CASTELL, 2002)

Assim, o sistema imunológico é altamente influenciado pelo exercício (KRZYWKOWSKI et al., 2001; NIEMAN, 2001), de maneira distinta de acordo com o tipo, duração e principalmente com a intensidade dos exercícios (ROGERO e TIRAPGUI, 2003). Alguns estudos sugerem haver uma melhor modulação da função imunológica em pessoas com câncer, que realizam exercício físico, devido ao incremento do número de células *Natural Killer* (NK) e linfócitos circulantes (JONSDOTTIR, 2000). Nessas condições o sistema imunológico estaria mais qualificado para combater o câncer.

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). Porém, há poucos estudos a este respeito.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos do exercício físico no comportamento (função motora e equilíbrio), bem como, nos parâmetros bioquímicos oxidativos do cerebelo e imunológicos de ratos expostos à Vincristina.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o equilíbrio corporal dos ratos por meio do teste *Rotarod*;
- Avaliar a força muscular através do *Grip-Test*;
- Avaliar o comportamento motor dos ratos através do teste de Campo Aberto;
- Avaliar a sensibilidade periférica dos ratos com o teste da Placa Quente;
- Analisar os parâmetros de estresse oxidativo através da taxa de produção de radicais livres e níveis de enzimas antioxidantes do cerebelo;
- Avaliar o dano ao sistema imunológico através do exame de Hemograma;
- Avaliar a cito-genotoxicidade do quimioterápico Vincristina pela fragmentação do DNA pelo ensaio do DNA *PicoGreen* no plasma sanguíneo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Logística do estudo

O estudo consistiu de oito semanas de experimento (tempo de duração), envolvendo seis semanas de treinamento físico (natação) e duas semanas de tratamento com quimioterápico Vincristina. Para a realização deste estudo os animais foram divididos em dois grupos com relação a prática de natação: treinados (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 um desenho experimental (Figura 1). Nos dias 0 e 7 os animais receberam o tratamento quimioterápico. Nos dias 1, 7, 8 e 15 os animais foram submetidos a testes de avaliação do equilíbrio e do comportamento motor. E no dia 15, após avaliação funcional, os animais foram eutanasiados e os tecidos cerebelar e sanguíneo foram coletados para análises bioquímicas.

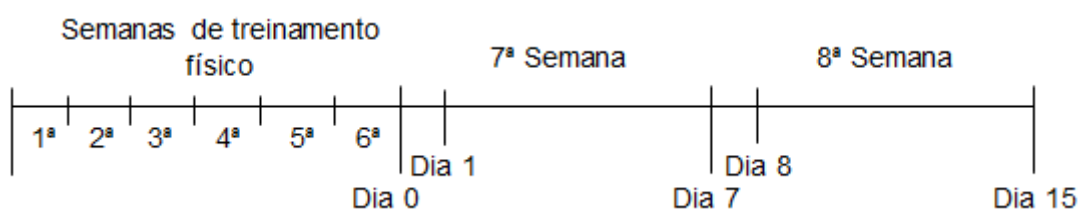


Figura 1: Desenho experimental

5.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, com peso variando entre 270 e 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 (9:00h – 16:00h).

5.3 Treinamento Físico

No período de seis semanas, os ratos selecionados para o grupo dos treinados 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 exercício consistiu de natação diária por 60 minutos, cinco dias por semana, durante seis semanas, entre 9:00h e 11:00h 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 sedentário 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 dois grupos receberam o tratamento com VCR ou com NaCl. O protocolo de natação escolhido já teve comprovada a sua eficácia em relação à proteção ao sistema nervoso central (córtex cerebral), bem como ao sistema imunológico (GOBATTO, et al., 2001; SOUZA, et al., 2009).

5.4 Administração do Sulfato de Vincristina

A via intraperitoneal em ratos é classicamente utilizada para substituir a via intravenosa, dadas as dificuldades da utilização desta última via, e por isso foi a

escolhida neste estudo. A via intraperitoneal substitui a intravenosa, uma vez que a cinética do fármaco é bastante semelhante nesta espécie (NADULSKA, KLUKOWSKA e DYBA, 2002).

O Sulfato de Vincristina foi dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) e administrado em duas doses de 0,5 mg/kg (dosagem calculada por peso corporal do dia) e com intervalo de uma semana entre elas, gerando uma dose acumulada de 1,0 mg/kg. Os ratos selecionados para controle receberam a mesma dosagem de solução salina.

5.5 Estudo do comportamento motor e do equilíbrio

5.5.1 Avaliação do equilíbrio corporal 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 (Figura 2). 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 (SHABANI et al., 2011). O teste foi realizado nos dias 1, 7, 8 e 15 e, incluiu um teste inicial, sem tratamento quimioterápico, para avaliação do estado basal (dia 0).

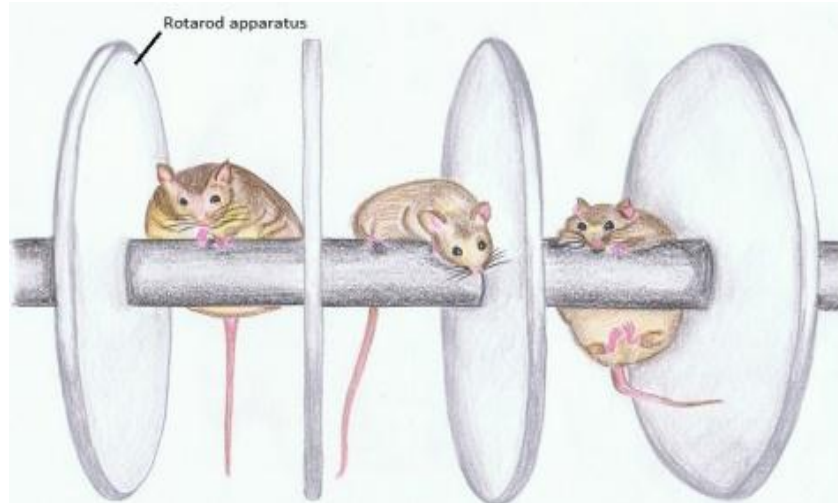


Figura 2: Desenho ilustrativo do teste *Rotarod*. Google imagens.

5.5.2 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 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 30 min entre as tentativas. O *Grip-Test* foi realizado após as aplicações de quimioterapia nos dias 1, 7, 8 e 15, para observação das alterações na força muscular entre grupos em função do tempo.

5.5.3 Avaliação do comportamento motor no Campo Aberto

Para avaliar o comprometimento motor dos ratos expostos à VCR, foram testadas as suas atividades em Campo Aberto. Teste descrito por Shabani et al. (2011) e modificado neste estudo. Os animais foram colocados numa área quadrada (56 cm de largura x 56 cm de comprimento x 20 cm de altura), com subdivisões no piso que indicavam pequenos quadrantes que definiam as áreas central e periférica. A locomoção na área foi rastreada ao longo de um período de 4 min, registados por

meio de uma câmera 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 tempo de exploração em pé, foram calculados para posterior comparação entre grupos (SHABANI et al., 2011).

A avaliação do teste Campo Aberto foi realizado após as aplicações de quimioterapia nos dias 1, 7, 8 e 15, para observação das alterações comportamentais entre grupos em função do tempo.

5.5.4 Avaliação da sensibilidade periférica na Placa Quente

Os efeitos potenciais da VCR na função do nervo sensorial (sistema nervoso periférico) foram avaliados pelo teste da Placa Quente. O modelo experimental foi inicialmente descrito por Woolfe e Macdonald (1944) como modelo específico para a detecção de substâncias analgésicas de efeito central. Este modelo utiliza a temperatura como estímulo nociceptivo. Dessa forma, os nociceptores (fibras C e A δ , principalmente) são estimulados após a ativação dos receptores vaniloides, especificamente os receptores do tipo VR-1, que possuem limiar de ativação em 43°C, e os receptores do tipo VRL-1, que possuem limiar de ativação em 52°C. Sendo assim, os animais foram colocados em uma placa aquecida (socrel Hot DS37 modelo prato, Ugo Basile, Itália) à 52 \pm 0,2°C e o tempo foi calculado até que o primeiro episódio de sensibilidade ao calor fosse percebido (latência). Este incluiu: pulo, retirada da pata traseira e posterior lambadura da pata (TITA et al., 2001). Este teste foi realizado nos dias 7 e 15.

5.6 Análises bioquímicas

Os animais foram eutanasiados por decapitação no dia 15 do experimento. O cerebelo foi exposto por remoção dos ossos parietal e occipital e foi congelado a -80°C para conservação da estrutura e posterior análises bioquímicas.

5.6.1 Medida do Dihidroclorofluoresceína (DCFH)

O potencial geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) pelos tratamentos foi monitorada por meio de uma sonda fluorescente, a 2,7'- diclorofluoresceína (DCF). Este ensaio foi baseado no seguinte pressuposto químico: o diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é capaz de se difundir através de membranas celulares. Dentro das células esta molécula é deacetilada pela ação das enzimas esterases intracelulares. Esta reação forma, por sua vez, um produto não-fluorescente, a dihidroclorofluoresceína (DCFH). A DCFH na presença de EAOs é oxidada (preferencialmente peróxidos, hidroperóxidos e NO●) passando para uma forma altamente fluorescente a diclorofluoresceína (DCF). Assim, quanto maior a fluorescência detectada pela maior absorbância avaliada pelo fluorímetro, maior a ocorrência de compostos oxidantes. Os resultados do DCFH foram expressos em porcentagem do controle (%).

5.6.2 Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da enzima Catalase (CAT) foi analisada espectrofotometricamente pelo método de Aebi (1984), que envolve o monitoramento do desaparecimento de H₂O₂ na presença da enzima no comprimento de onda de 240 nm. Após o tratamento das células cerebelares, uma alíquota destas foi adicionada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e a reação enzimática foi iniciada pela adição de H₂O₂. Os resultados foram expressos em Units/mg de proteína.

5.6.3 Análise da expressão da Superóxido Dismutase (SOD)

Para verificar a expressão da Superóxido Dismutase (SOD), uma parte do cerebelo foi homogenizada adequadamente num volume de 40 (w/v) com Tris-

HCl10mM (pH 7.4), e o ensaio foi realizado conforme o método descrito por Misra e Fridovich (1972). A SOD foi expressa por Units/mg de proteína.

5.6.4 Análise sanguínea para estimativa imunológica

Para o estudo hematológico o sangue foi coletado da veia hepática no momento do sacrifício, 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. Foram 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.

As contagens de hemácias, leucócitos e a determinação da hemoglobina foram realizadas por contador eletrônico de células^d, e os esfregaços sanguíneos foram corados pelo panótico rápido, como recomenda Jain, Mcvie e Smith (2000). O volume globular foi determinado pelo método do micro-hematócrito (FELDMAN et al., 2000). A contagem de plaquetas foi realizada diluindo-se o sangue em oxalato de amônia a 1% em pipeta de Thomas para glóbulos vermelhos, obtendo-se diluição final de 1:100. A proteína plasmática total foi determinada quebrando-se o capilar utilizado para a determinação do hematócrito, acima da camada de células, transferindo-se o plasma para o refratômetro (FELDMAN et al., 2000; JAIN, MCVIE e SMITH, 2000).

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

O Quant-iT™ *Picogreen* dsDNA Reagent (Invitrogen®) é um reagente fluorescente ultrasensível 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 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). Primeiramente pipetamos 80 μ L de TE 1X, adicionamos 10 μ L da amostra e 10 μ L do reagente *Picogreen* diluído. Homogeneizou-se em 8 pelo menos 10 vezes. As amostras são incubadas a temperatura ambiente por no mínimo 5 e no máximo 30 minutos. A técnica foi realizada em triplicata contendo uma triplicata com um dsDNA conhecido, ou seja com um valor conhecido de DNA calf. A leitura em fluorímetro deu-se nos seguintes comprimentos de onda: 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

5.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, utilizando o programa de produção de gráficos e estatístico GraphPad Prism 6.0. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles onde $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de dois manuscritos.

ARTIGO 1

“Efeito protetor do treinamento de natação no equilíbrio corporal e na função motora de ratos tratados com Vincristina”

Luiza Minato Sagrillo^{*1,2}, Viviane Nogueira de Zorzi², Michele Rechia Fighera^{3,5}, Luiz Fernando Royes^{2,4}, Maria Fernanda Mânica-Cattani⁶, Aron Ferreira da Silveira^{1,7}

¹ Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana: Audição e Equilíbrio. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

² Laboratório de Bioquímica do Exercício. Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Programa de Pós graduação em Farmacologia. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas. Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁵ Departamento de Neuropsiquiatria. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁶ Laboratório de Biogenômica. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁷ Departamento de Morfologia. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*** Autor correspondente: lu.sagrillo@hotmail.com**

**EFEITO PROTETOR DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO NO EQUILÍBRIO
CORPORAL E NA FUNÇÃO MOTORA DE RATOS TRATADOS COM
VINCRISTINA**

***PROTECTIVE EFFECT OF SWIMMING TRAINING ON BODY BALANCE AND ON
MOTOR FUNCTION OF RATS TREATED WITH VINCRISTINE***

RESUMO: A Vincristina (VCR) é um quimioterápico muito utilizada em vários tratamentos de cânceres como as leucemias, porém um dos principais efeitos colaterais são os danos ao sistema motor e cognitivo-comportamental. Nos últimos tempos estudos vem mostrando que o exercício físico é benéfico para o tratamento de diversas doenças que afetam o sistema nervoso central. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do exercício físico no equilíbrio e na função motora de ratos tratados com VCR. Ratos wistar (270 e 300g) foram tratados com dose única semanal de 0,5mg/kg de VCR por duas semanas, totalizando uma dose acumulada de 1 mg/kg, por via intraperitoneal. Os ratos dos grupos controles foram tratados com solução salina (0,9% NaCl). Antes do tratamento os ratos foram treinados por seis semanas com natação 1 h / dia, 5 dias/semana, com sobrecarga de 5% do peso corporal denominado grupo treinado, ou com natação placebo em um tanque com água a 5 cm de profundidade, sem carga extra que foi chamando de grupos sedentário. Os testes *Rotarod* (equilíbrio), *Grip-Test* (força muscular), Campo aberto (exploração) e o Placa quente (sensibilidade periférica) foram conduzidos nos dias 1 e 7 após cada aplicação de VCR. Como resultados observou-se que o treinamento de natação neutralizou os efeitos deletérios do quimioterápico em relação ao equilíbrio corporal. Sugere-se um efeito per se do exercício, pois este aumentou a distância percorrida pelos ratos treinados, porém não houve efeito significativo no movimento de exploração no campo aberto nem aumento de força muscular. O exercício físico neutralizou o dano de sensibilidade periférica provocado pela VCR. Esse conjunto de resultados sugere que o exercício físico pode neutralizar os efeitos neurotóxicos do VCR, e poder ser usado junto com a quimioterapia.

Palavras-chave: exercício físico; natação; quimioterapia; vincristina; comportamento; equilíbrio corporal; ratos.

ABSTRACT: The Vincristine (VCR) is a widely used chemotherapy in various cancers such as leukaemia, however one of the major side effects are damage to the motor system and cognitive-behavioral. Recently studies has shown that exercise is beneficial for the treatment of various diseases affecting the central nervous system. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of physical exercise on the balance and on motor function of rats treated with VCR. Wistar rats (270 and 300 g) were treated with a single dose of weekly 0, 5 mg/kg of VCR for two weeks, totaling a

cumulative dose of 1 mg/kg intraperitoneal. The group controls rats were treated with saline solution (0.9% NaCl). Before treatment the rats were trained for six weeks with swimming 1:00/day, 5 days/week, with 5% overload body weight trained group, or with placebo swimming in a tank with water to 5 cm deep, without extra charge which was calling from sedentary groups. *Rotarod* tests (balance), Grip Test (muscle strength), the open field (exploration) and the hot plate (peripheral sensitivity) were conducted on days 1 and 7 after each application of VCR. As a result it was observed that the training of swimming has undermined the deleterious effects of chemotherapy relative to body balance. It suggests an effect per se, because this increased the distance travelled by the trained rats, but there was no significant effect on the movement of farm in open country or increase muscle strength. Exercise neutralized the damage caused by the peripheral sensitivity VCR. This set of results suggests that exercise can counteract the neurotoxic effects of the VCR, and can be used in conjunction with chemotherapy.

Keywords: physical exercise; swimming; chemotherapy; Vincristine; behavior; body balance; rats

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que representa a primeira causa de morte nos países desenvolvidos e, dentro de poucas décadas, também será a principal causa de mortalidade em todos os continentes, independentemente do nível socioeconômico (BRAY et al., 2012). Além de ser um investimento anual de alto custo, o tratamento de cânceres, em sua grande maioria, é considerado como um dos problemas mais desafiadores da medicina. Isto por que drogas anti-tumorais na maioria das vezes apresentam algum efeito colateral danoso ao indivíduo em tratamento. Entre os efeitos tóxicos mais frequentes, estão os do sistema nervoso periférico e central, como consequência os indivíduos apresentam distúrbios no equilíbrio corporal, como labirintite, quedas e na função motora como tremores e perda da força muscular (CHABNER e ROBERTS, 2005).

Atualmente os alcalóides da família da Vinca vem sendo utilizados como quimioterápicos, por que estes apresentam função antimetabólica, ou seja, atuam ligando-se aos microtúbulos impedindo a formação do fuso acromático, resultando na interrupção da divisão celular (COPPOC, 2009). A Vincristina (VCR) é um quimioterápico dessa família é muito utilizado no tratamento de tumores malignos como leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, câncer de mama, linfomas, osteossarcoma entre outros (ANVISA, 2008). Apesar de sua grande atuação a VCR apresenta muitos efeitos colaterais entre eles estão as 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). O mecanismo de ação deletério da VCR, ainda é pouco elucidado, mas pesquisas mostram que uma das explicações pode ser o desbalanço oxidativo, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no cérebro, causando assim, uma redução da viabilidade dos neurônios (WICK et al., 2004).

Existem evidências dos benefícios à saúde em geral da prática regular de exercício físico, tanto em pessoas saudáveis como em diversas doenças: diabetes mellitus, asma, obesidade, hipertensão, artroses e artrites (WARBURTON, NICOLI E BREDIN, 2006; MONZILLO et al., 2003). No entanto, os efeitos do exercício físico no

sistema nervoso central ainda apresentam resultados insuficientes. Evidências tem mostrado que exercícios moderados aumentam a cognição, uma vez que o cérebro é responsivo à atividade física (ARIDA et al., 2004). Isso quer dizer que a atividade física apresenta potencial na prevenção e tratamento de danos traumáticos cerebrais (MATTSON, 2000), assim como em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (SCANDALIS et al., 2001) e a doença de Alzheimer (WOLF et al., 2006).

O exercício físico é considerado uma prevenção primária atuando diretamente na causa para prevenir a ocorrência de doenças, e também como tratamento auxiliar na reabilitação como no caso de infarto do miocárdio. Porém, os estudos mostrando os benefícios do exercício físico durante o tratamento de quimioterápico ainda são insuficientes. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos protetores do exercício físico nas alterações da função motora (comportamento motor e equilíbrio) em ratos tratados com Vincristina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Logística do estudo

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, com peso variando entre 270 e 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 (9:00h – 16:00h).

Para a realização deste estudo os animais foram divididos em dois grupos com relação à prática de natação: treinados (n=20) e sedentários (n=20). Após o período de natação de seis semanas, em cada grupo, os ratos foram tratados ou

com Vincristina (VCR; n=10) ou com solução salina (0,9% NaCl; n=10) nos dias 0 e 7, segundo o desenho experimental deste estudo (Figura 1), respeitando assim, o intervalo de uma semana entre as aplicações. Nos dias 1, 7, 8 e 15 os animais foram submetidos a testes de avaliação do equilíbrio corporal e do comportamento motor. No dia 15 os animais foram eutanasiados.

Treinamento físico

O protocolo de natação escolhido já teve comprovada a sua eficácia em relação à proteção ao sistema nervoso central (córtex cerebral) (GOBATTO et al., 2001; SOUZA et al., 2009). A descrição é feita a seguir:

No período de seis semanas, os ratos selecionados para o grupo dos treinados 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 exercício consistiu de natação diária por 60 minutos, cinco dias por semana, durante seis semanas. 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 melhorar a resistência cardiorrespiratória (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 dos dois grupos receberam o tratamento com Vincristina ou com solução salina.

Administração de Quimioterapia

O Sulfato de Vincristina foi dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) e administrado em duas doses de 0,5 mg/kg (dosagem calculada por peso corporal do

dia), com intervalo de uma semana entre elas, gerando uma dose acumulada de 1,0 mg/kg. Os ratos selecionados para controle receberam a mesma dosagem de NaCl.

Nos ratos a via intraperitoneal é classicamente utilizada para substituir a via intravenosa, uma vez que a cinética do fármaco é bastante semelhante nesta espécie (NADULSKA, KLUKOWSKA e DYBA, 2002), e por isso foi a escolhida neste estudo.

Estudo do comportamento motor e do equilíbrio

Para a avaliação do equilíbrio corporal foi utilizado o *Rotarod* (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). Os ratos, individualmente, foram colocados no topo da haste de rotação (diâmetro de 4cm) de modo que a locomoção para 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 (SHABANI et al., 2011). O teste foi realizado nos dias 1, 7, 8 e 15 e, incluiu um teste inicial, sem tratamento quimioterápico, para avaliação do estado basal (dia 0).

Como medida de força muscular foi utilizado o *Grip-Test* em conformidade com Wijk (2008). Neste teste o desempenho de cada rato é medido pelo tempo que este permanece suspenso em um arame afixado a 20 cm do solo. 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 após as aplicações de quimioterapia nos dias 1, 7, 8 e 15, para observação das alterações de força muscular entre grupos em função do tempo.

Para avaliar o comprometimento motor dos ratos expostos à VCR, foram testadas as suas atividades em Campo Aberto. Teste descrito por Shabani et al. (2011) e modificado neste estudo. Os animais foram colocados numa área quadrada (56 cm de largura x 56 cm de comprimento x 20 cm de altura), com subdivisões no piso que indicavam pequenos quadrantes que definiam as áreas central e periférica.

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 tempo de exploração em pé (s), foram calculados para posterior comparação entre grupos (SHABANI et al., 2011). A avaliação do teste Campo Aberto foi realizado após as aplicações de quimioterapia nos dias 1, 7, 8 e 15, para observação das alterações comportamentais entre grupos em função do tempo.

Os efeitos potenciais da VCR na função do nervo sensorial (sistema nervoso periférico) foram avaliados pelo teste da Placa Quente. Este modelo utiliza a temperatura como estímulo nociceptivo. Sendo assim, os animais foram colocados em uma placa aquecida (socrel Hot DS37 modelo prato, Ugo Basile, Itália) a $52 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e o tempo foi calculado até que o primeiro episódio de sensibilidade ao calor fosse percebido (latência). Este incluiu: pulo, retirada da pata traseira e posterior lambadura da pata (TITA et al., 2001). Este teste foi realizado nos dias 7 e 15 após cada dosagem de quimioterapia.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através de teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, confirmada pelo teste de post hoc de Tukey, utilizando o programa de produção de gráficos e estatístico GraphPad Prism 6.0. Foram considerados resultados estatisticamente significativos àqueles onde $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

A amostra incluiu um total de 40 ratos, sendo 10 de cada grupo experimental. Os resultados demonstraram efeito benéfico do exercício físico na proteção do equilíbrio corporal e na função motora de ratos tratados com VCR, no modelo de administração descrito.

Na figura 1 podemos observar que o grupo de ratos treinados e tratados tanto com VCR e NaCl tiveram melhor desempenho no equilíbrio quando comparados com o grupo sedentário tratado com VCR, isto demonstra que o exercício físico foi capaz de proteger contra os danos causados pelo quimioterápico ($p=0,002$). No dia 15, a média de tempo no *Rotarod* para o Grupo Sedentário/ NaCl (Controle) foi de $283,3\pm 38,2$ e o Grupo Sedentário/VCR foi de $103,5\pm 44,5$, mostrando diferença significativa entre eles. Já a média do Grupo Treinado/VCR foi de $295,0\pm 21,9$ mostrando grande semelhança com o grupo controle. Com isso, podemos inferir que o treinamento de natação neutralizou o efeito da VCR.

Já os ratos do Grupo Sedentário/VCR permaneceram no *Rotarod* períodos significativamente mais curtos quando comparados ao seu respectivo grupo controle bem como aos Grupos Treinados (VCR ou NaCl). A perda do equilíbrio aumentou progressivamente em função do tempo de exposição.

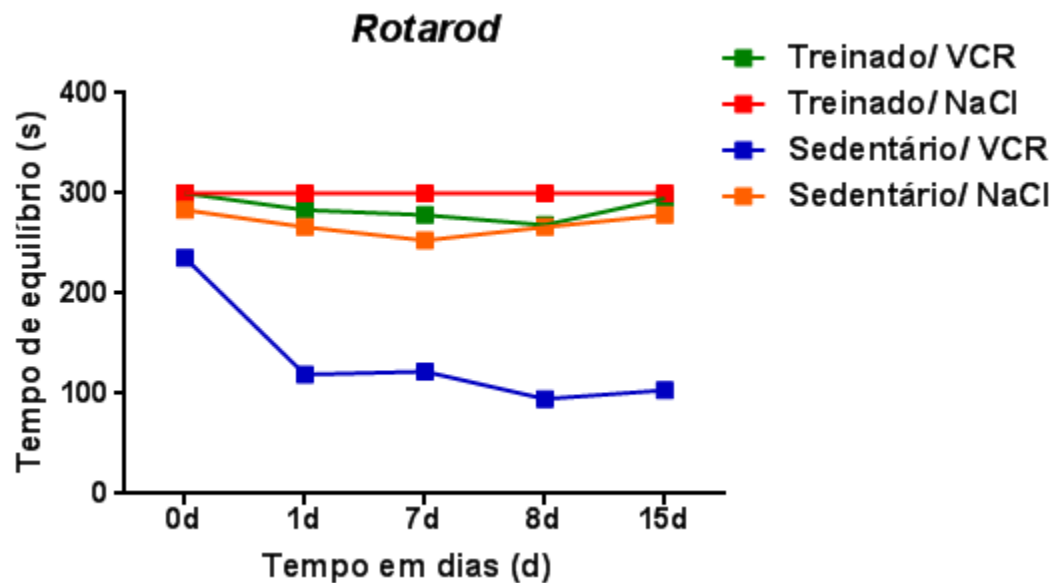


Figura 1: Efeito da VCR no equilíbrio corporal dos ratos Treinado e dos ratos Sedentários, avaliados no *Rotarod* nos períodos pré-quimioterapia (dia 0), um e sete dias após a primeira dose (dias 1 e 7) e um e sete dias após a segunda dose do quimioterápico (dias 8 e 15). Valores obtidos por médias.

No *Grip-Test* não foi observada diferença significativa da força muscular entre os Grupos Sedentário/NaCl ($5,6\pm 1,4$) e Sedentário/VCR ($4,0\pm 0,9$), com $p=0,284$. Isso mostra que a VCR, da maneira que foi administrada, não influencia

negativamente na força muscular dos ratos. No entanto pode-se observar que os ratos do Grupo Treinado/ VCR ($7,6\pm 1,5$) tiveram um resultado melhor e significativo em comparação com o Grupo Sedentário/VCR ($p=0,004$) (Figura 2).

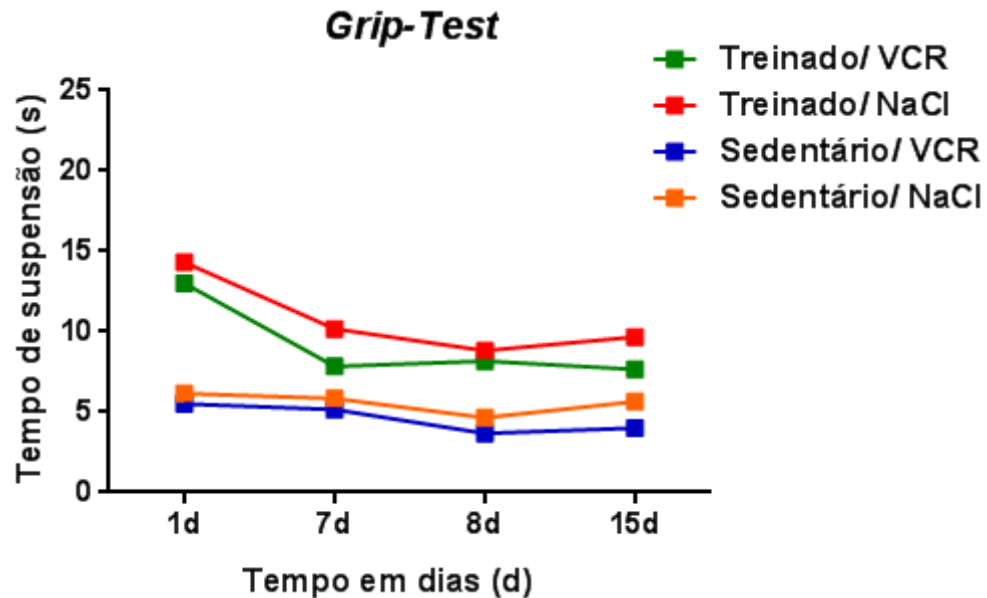
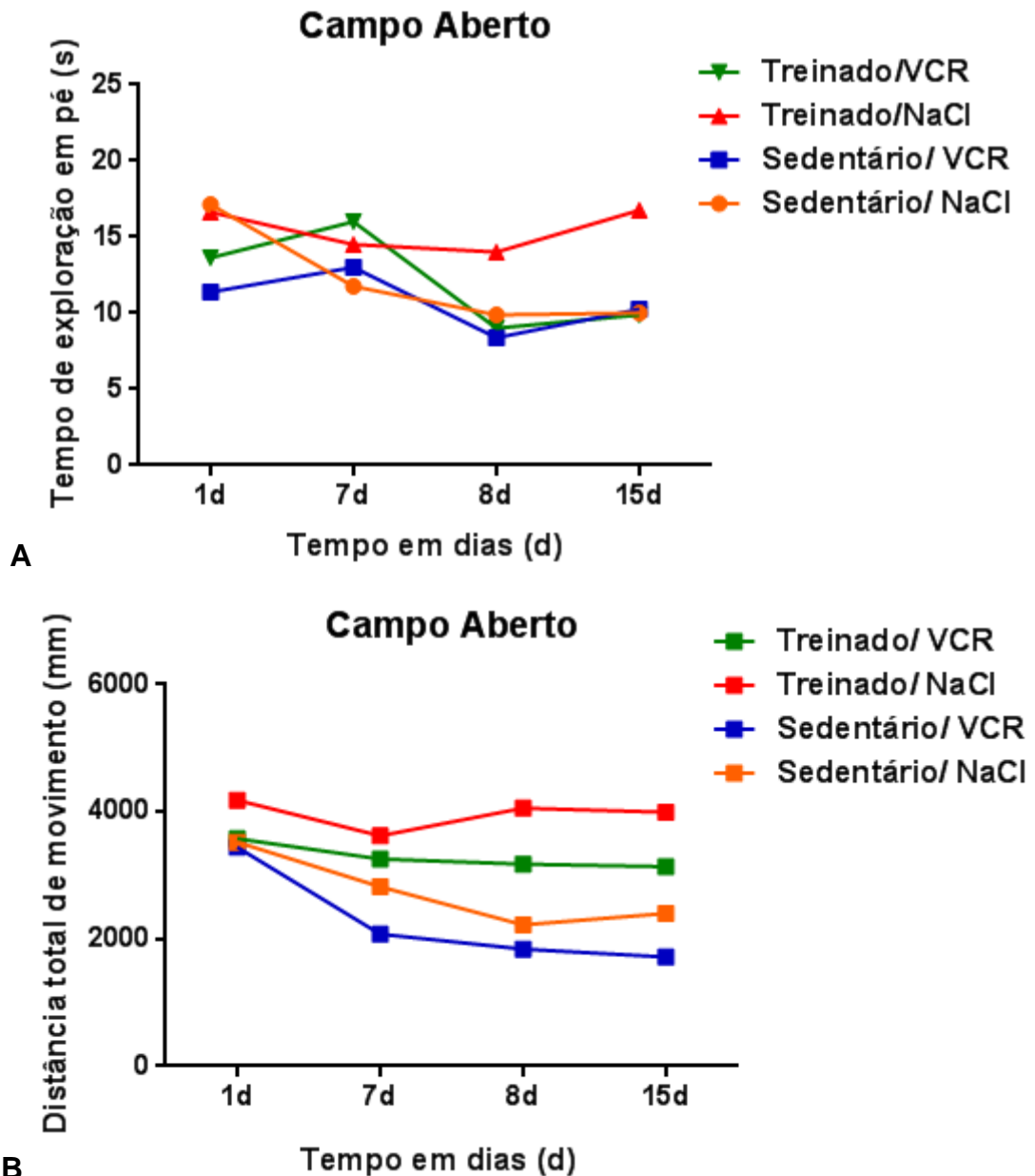


Figura 2: Efeito da VCR na força muscular dos ratos Treinado e dos ratos Sedentários, avaliada com o *Grip-Test*, um e sete dias após a primeira dose (dias 1 e 7) e um e sete dias após a segunda dose do quimioterápico (dias 8 e 15). Valores obtidos por média.

No presente estudo, a administração do fármaco Vincristina não diminuiu significativamente o tempo de exploração em pé ($p=0,166$), nem a distância total percorrida ($p=0,776$), nem a velocidade média dos animais ($p=0,990$) no Campo Aberto. No dia 15, a média do tempo de exploração em pé do Grupo Sedentário/NaCl foi de $10,0\pm 2,47$ e do Grupo Sedentário/VCR foi de $10,25\pm 2,42$. Já o Grupo Treinado/NaCl teve média de $16,75\pm 2,35$, mostrando diferença significativa do grupo controle ($p=0,005$) e, sendo assim, um efeito *per se* do treinamento de natação sobre a exploração do ambiente pelos animais (Figura 3).

Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa para o tratamento com VCR nos parâmetros do Campo Aberto analisados, pode-se perceber alteração na atividade exploratória espontânea no grupo que recebeu quimioterapia, através do rastreamento do software utilizado no teste. Alteração esta, que foi neutralizada pelo exercício físico (Figura 4).

No dia 15, também, a média da distância total percorrida pelo Grupo Sedentário/NaCl foi de $2402,6 \pm 324,3$ e pelo Grupo Sedentário/VCR $1719,5 \pm 324,3$, demonstrou tendência a diminuição da distância, mas esta não foi significativa para o tratamento com VCR. Porém, a média do Grupo Treinado/NaCl foi de $3993,3 \pm 359,9$ indicando diferença significativa do grupo controle ($p=0,001$) e, sendo assim, um efeito *per se* do treinamento de natação (Figura 3).



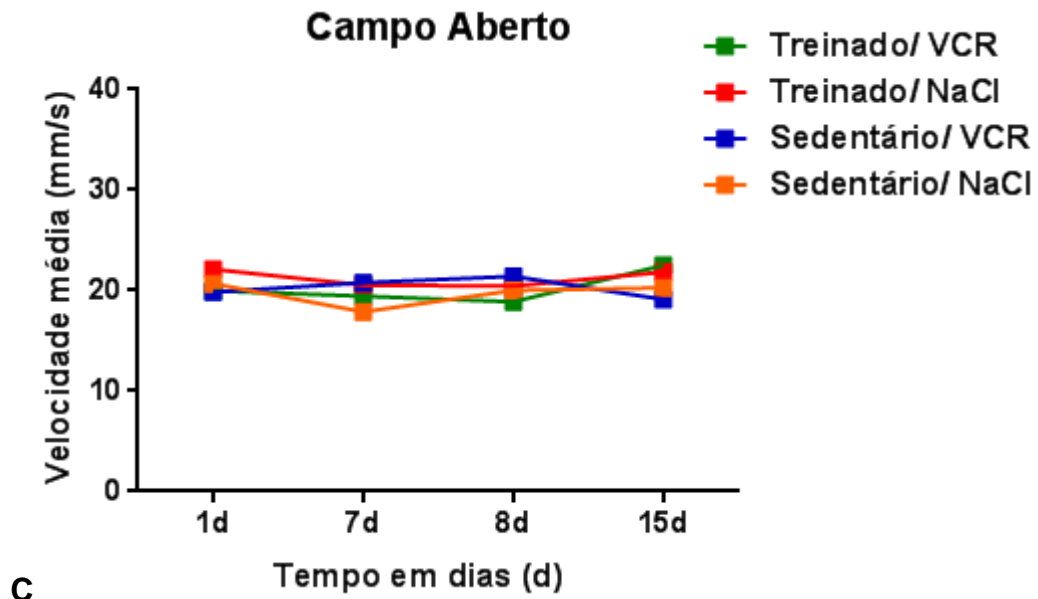


Figura 3: Teste de Campo Aberto realizado um e sete dias após a primeira dose (dias 1 e 7) e um e sete dias após a segunda dose de quimioterapia (dias 8 e 15). **A** Tempo de exploração em pé; **B** Distância total de deslocamento em mm e **C** Média de velocidade de deslocamento em mm/s.

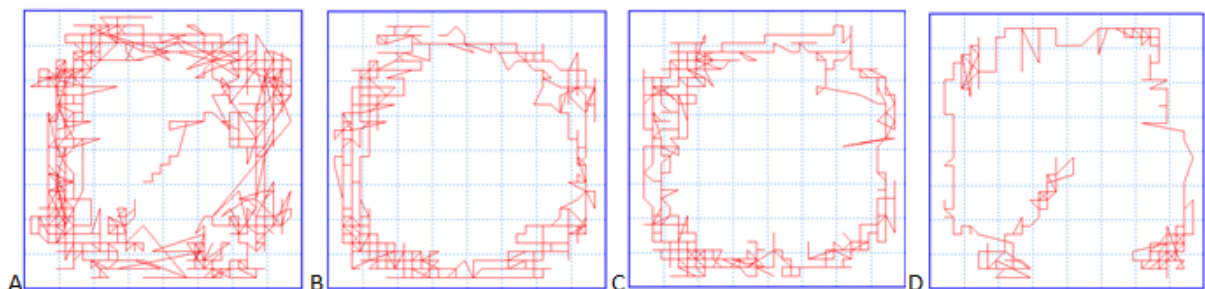


Figura 4: A atividade exploratória espontânea medida no Campo Aberto apresentou-se alterada nos ratos tratados com Vincristina (VCR) no sétimo dia após a segunda dose do quimioterápico (dia 15). Dose acumulada de 10,0mg/kg. Isto é visível quando comparamos o trajeto realizado pelos animais de cada grupo, indicando que a VCR provocou distúrbio na função motora dos animais e o exercício físico prévio foi capaz de reduzir esta disfunção. **A** Grupo Treinado/ NaCl; **B** Grupo Treinado/ VCR; **C** Grupo Sedentário/ NaCl (controle); **D** Grupo Sedentário/ VCR.

Pode-se observar, também, que os ratos do Grupo Sedentário/VCR apresentaram diminuição de sensibilidade a dor, levando mais tempo para reagir ao calor da Placa Quente em comparação com os outros grupos (Figura 5). No dia 15 a média de tempo de latência foi de $8,6 \pm 0,8$ para o Grupo Sedentário/NaCl e de $11,3 \pm 1,4$ para o Grupo Sedentário/VCR, mostrando uma diferença significativa entre

eles ($p=0,022$). Já a média do Grupo Treinado/VCR foi de $8,7\pm 1,2$, assemelhando-se ao resultado do grupo controle e, mostrando assim, que o treinamento de natação neutralizou o efeito da VCR sobre a sensibilidade periférica.

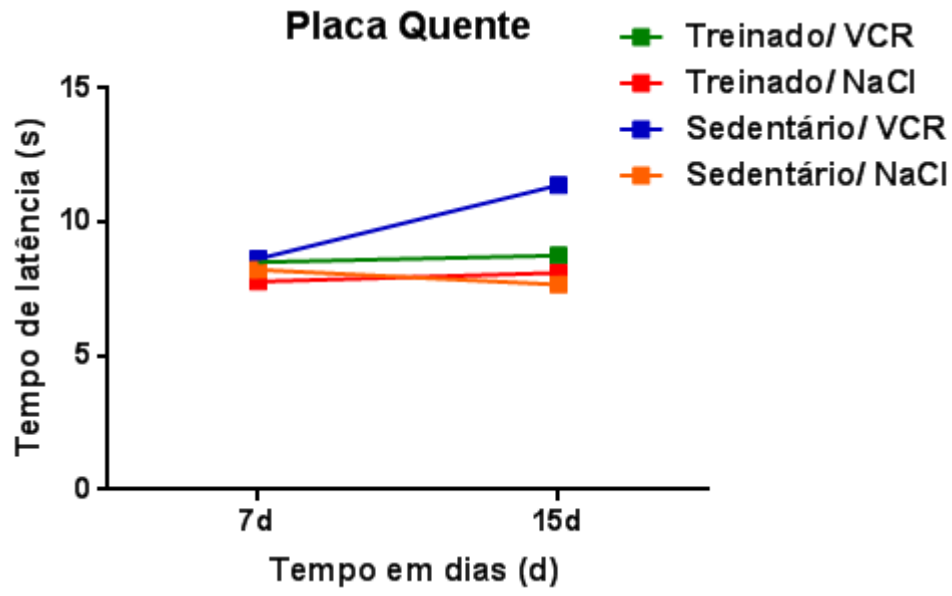


Figura 5: Análise do efeito da VCR na sensibilidade periférica dos ratos Treinados e dos ratos Sedentários, avaliada com o teste da Placa Quente, sete dias após a primeira dose (dia 7) e sete dias após a segunda dose do quimioterápico (dia 15).

DISCUSSÃO

Os componentes dos alcalóides da Vinca, presentes na Vincristina (VCR), induzem neuropatia periférica crônica de forma já bem conhecida, mas a sua neurotoxicidade motora e cognitiva ainda não está bem elucidada. Estas drogas contêm neurotoxinas potentes e produzem lesões generalizadas a nível de córtex, tálamo, giro denteado do hipocampo, e núcleo caudal dependente da dose (RZESKI et al., 2004). As funções do cerebelo de ratos são, também, profundamente afetados por exposição à VCR, sendo observados déficits cognitivos, comportamentais e de função motora na dose acumulada de 1,0mg/kg (SHABANI et al., 2012).

Nesta pesquisa, foi observada uma diminuição significativa do equilíbrio corporal e da função motora nos ratos tratados com o quimioterápico VCR. No

Rotarod o tempo de permanência dos animais tratados foi significativamente menor em comparação ao grupo controle, indicando importante déficit de equilíbrio.

No Campo Aberto não houve uma diminuição significativa na velocidade média, no tempo de exploração em pé e na distância total percorrida pelos animais tratados com VCR (em comparação com o grupo controle) o que vai de encontro ao 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. Nesse estudo, o Tropisetron pré-tratamento foi capaz de normalizar esse problema. Porém, no presente estudo, observou-se que os animais que realizaram exercício físico percorreram uma distância maior que os sedentários e exploraram por mais tempo (em pé) o ambiente. Além disso, os animais que receberam VCR não alteraram muito seu trajeto durante o movimento, indicando que suas atividades exploratórias espontâneas foram reduzidas.

Visualizou-se, também, alteração significativa no teste da Placa Quente, com aumento da latência para a retirada da pata no Grupo Sedentário/ VCR. Isto corrobora com o estudo realizado por Barzegar-Fallah et al. (2014), em que foi utilizada uma dose acumulada um pouco maior, de 1,5mg/kg, foi possível observar que a latência na Placa Quente (indicando dano neuropático periférico) após o sétimo dia de estudo foi significativamente aumentada em animais tratados com VCR em comparação com o grupo controle.

A administração de VCR também causou toxicidade geral visível (frouxidão e diminuição da quantidade de fezes, alopecia e postura anormal que consiste em pé e queda de cabeça) nos ratos tratados e uma diminuição do peso corporal, o que também foi observado no trabalho de Barzegar-Fallah et al. (2014). Apesar disso, não observamos diminuição significativa da força muscular, avaliada pelo *Grip-Test*, nos ratos tratados com VCR. Entretanto, houve um aumento importante da força muscular nos ratos treinados, em comparação com os sedentários, benefício este que já é bastante conhecido pela literatura.

No presente estudo, os déficits importantes da função motora e do equilíbrio corporal foram amenizados notadamente nos ratos que realizaram treinamento de natação prévio ao tratamento com VCR. É visto que o exercício físico melhora a função cognitiva e melhora a disfunção motora (KIM et al., 2011; HEO et al., 2014).

Em um estudo realizado por Griesbach et al. (2007), em que o exercício voluntário com ratos foi iniciado duas semanas após o traumatismo crânio encefálico leve, observou-se aumento dos marcadores da plasticidade sináptica, concomitante com a melhora no desempenho dos animais em testes de aprendizado e memória. Já o estudo de Lee et al. (2014) verificou que exercícios em esteira aliviam disfunção motora de coordenação e equilíbrio, reduzindo a perda de células de Purkinje por meio da supressão dos astrócitos reativos no cerebelo de ratos com doença de Alzheimer.

Os resultados do presente estudo mostram, principalmente, a importância de manter-se ativo fisicamente, visando amenizar possíveis danos causados no equilíbrio corporal e na função motora pela administração sistêmica de quimioterapia, como é o caso da Vincristina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. 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). Acesso em abril de 2015.

ARIDA, R. M. et al. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neurosci Lett**. 2004;364:135-8.

BARZEGAR-FALLAH, A. et al. The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 41, p. 1-8, Mar 2014.

BRAY F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **Lancet Oncol**. 2012 Aug;13(8):790-801.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G., JR. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, Jan 2005.

COPPOC, G.L. Chemotherapy of neoplastic diseases. In J.E. Riviere & M.G. Papich (Ed.), **Veterinary Pharmacology and therapeutics**. (9th ed.). 2009.

DIETRICH, M. O.; ANDREWS, Z. B.; HORVATH, T. L. Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. **J Neurosci**, v. 28, n. 42, p. 10766-10771, Oct 15 2008.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 130, n. 1, p. 21-27, Aug 2001.

HEO, Y. M. et al. Treadmill exercise ameliorates short-term memory disturbance in scopolamine-induced amnesia rats. **Int Neurobiol J**, v. 18, n. 1, p. 16-22, Mar 2014.

KIM, H. et al. 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**, v. 504, n. 1, p. 35-39, Oct 17 2011.

KLUMPP, S.; LIPOWSKY, R. Active diffusion of motor particles. **Phys Rev Lett**, v. 95, n. 26, p. 268102, Dec 31 2005.

KRARUP-HANSEN, A. et al. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. **Brain**, v. 130, n. Pt 4, p. 1076-1088, Apr 2007.

LEE, J. M. et al. Treadmill exercise improves motor coordination through ameliorating Purkinje cell loss in amyloid beta23-35-induced Alzheimer's disease rats. **J Exerc Rehabil**, v. 10, n. 5, p. 258-264, Oct 2014.

LEEDS, P. et al. Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons. **Neurochem Int**, v. 46, n. 1, p. 61-72, Jan 2005.

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain Res**. 2000;886:47-53.

MONZILLO, L. et al. Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. **Obes Res**. 2003;11:1048-54.

NADULSKA, A.; KLUKOWSKA, L.; DYBA, S. Changes of resistance parameters of femoral bone in adult female rats after application of zoladex and vincristin. **Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med**, v. 57, n. 2, p. 426-430, 2002.

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Int**, v. 49, n. 4, p. 387-392, Sep 2006.

RZESKI, W. et al. Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo. **Ann Neurol**. 56(3): 351-360, 2004

SCANDALIS, T. A. et al. Resistance training and gait function in patients with Parkinson's disease. **Am J Phys Med Rehabil**. 2001;80:38-43.

SHABANI, M. et al. Maternal exposure to the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 produces robust changes in motor function and intrinsic electrophysiological properties of cerebellar Purkinje neurons in rat offspring. **Neuroscience**, v. 172, p. 139-152, Jan 13 2011.

SHABANI, M. et al. Profound destructive effects of adolescent exposure to vincristine accompanied with some sex differences in motor and memory performance. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 90, n. 4, p. 379-386, Apr 2012

SOUZA, M.A, et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, 50(4):811-823, 2009.

TITA, B. et al. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. **Farmacol**, v. 56, n. 5-7, p. 341-343, May-Jul 2001.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, Nov 9 1999.

WARBURTON, D. E. R.; NICOL, C. W.; BREDIN, S. S.D. Health benefits of physical activity: the evidence. **CMAJ**. 6:801-9. 2006.

WIJK, N.V.; RIJNTJES, E.; HEIJNING, B.V. Perinatal and chronic hypothyroidism impair behavioural development in male and female rats. **Exp. Physiol.** 93(11): 1199–1209, 2008.

WOLF, S. A. et al. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP) – 23 model of Alzheimer's disease. **Biol Psychiatry.** 2006.

WOOLFE G.; MACDONALD A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **J Pharmacol Exp Ther** 80(3): 300 - 307, 1944.

ARTIGO 2

“Efeito protetor do treinamento de natação no metabolismo oxidativo-inflamatório de ratos tratados com Vincristina”

Luiza Minato Sagrillo^{*1,2}, Viviane Nogueira de Zorzi², Michele Rechia Fighera^{3,5}, Luiz Fernando Royes^{2,4}, Maria Fernanda Mânica-Cattani⁶, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman⁶, Ivana Cruz Manica^{6,7}, Aron Ferreira da Silveira^{1,7}

¹ Programa de Pós graduação em Distúrbios da Comunicação Humana: Audição e Equilíbrio. Centro de ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

² Laboratório de Bioquímica do Exercício. Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Programa de Pós graduação em Farmacologia. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas. Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁵ Departamento de Neuropsiquiatria. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁶ Laboratório de Biogenômica. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁷ Departamento de Morfologia. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*** Autor correspondente: lu.sagrillo@hotmail.com**

EFEITO PROTETOR DO TREINAMENTO DE NATAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO DE RATOS TRATADOS COM VINCRISTINA

PROTECTIVE EFFECT OF SWIMMING TRAINING ON METABOLISM OXIDATIVE- INFLAMMATORY OF RATS EXPOSED TO VINCRISTINE

RESUMO: O exercício físico tem se mostrado benéfico ao sistema nervoso central e ao sistema imunológico em diversas situações. A Vincristina (VCR) é um quimioterápico usado para diversos tipos de cânceres, e tem como um dos principais efeitos colaterais o comprometimento do equilíbrio e o desbalanço oxidativo-inflamatório. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do exercício físico no metabolismo oxidativo do cerebelo de ratos tratadas com VCR, bem como, seu efeito no sistema imunológico. Para isso, ratos com peso entre 270-300g foram divididos em dois grupos: grupo treinado (n=20, 6 semanas de natação, 1h/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga de 5% do peso corporal) e grupo sedentário (n=20, natação placebo em um tanque com água a 5cm de profundidade, sem carga extra). Após as 6 semanas, os dois grupos (n=10 de cada) foram tratados com dose única semanal de 0,5mg/kg de sulfato de vincristina, durante duas semanas, totalizando uma dose acumulada de 1 mg/kg, por via intraperitoneal. Os ratos utilizados nos grupos controle (n=10 dos treinados e n=10 dos sedentários) receberam a mesma dose de solução salina (NaCl). Sete dias após a última dosagem de quimioterapia, foram retiradas as amostras de cerebelo para análise bioquímica-oxidativa (DCFH, SOD e CAT) e amostras de sangue para análise de *Picogreen* e hemograma. Observamos um efeito protetor do exercício físico nos ratos, uma vez que os níveis de ROS foram diminuídos e as enzimas do sistema antioxidante do cerebelo SOD e CAT modularam positivamente naqueles que treinaram. Na análise de *Picogreen*, observamos uma proteção do exercício físico contra o dano de DNA. No hemograma, os ratos treinados mantiveram os parâmetros analisados dentro dos valores de referência quando comparados aos sedentários tratados com VCR. Sendo assim, o exercício físico de natação mostrou-se um grande aliado na proteção do metabolismo oxidativo-inflamatório frente à toxicidade do quimioterápico Vincristina.

Palavras-chave: exercício físico; natação; quimioterapia; vincristina; neurotoxicidade; cerebelo; ratos

ABSTRACT: Exercise has been shown to be beneficial to the central nervous system and the immune system in various situations. The Vincristine (VCR) is a chemotherapy used for several types of cancers, and is one of the major side effects the commitment to balance the oxidative imbalance and inflammatory. Therefore, the present study aimed to evaluate the protective effect of physical exercise on oxidative metabolism in the cerebellum of rats treated with VCR, as well as their

effect on the immune system. To do this, rats weighing between 270-300 g were divided into two groups: trained group (n=20, 6 weeks of swimming, 1:00/day, 5 days/week, with 5% overload body weight) and sedentary group (n=20, placebo swimming in a tank with water to 5 cm deep, with no extra charge). After 6 weeks, the two groups (n=10 each) were treated with a single dose weekly, totaling a cumulative dose of 1 mg/kg intraperitoneal. The rats used in control groups (n=10 of trained and n=10 of sedentary) received the same dose of saline (NaCl). Seven days after the last dosage of quimioteapia, cerebellum samples were taken for biochemical analysis-oxidative (DCFH, SOD and CAT) and blood samples for analysis of *Picogreen* and CBC. We see a protective effect of exercise in rats, since the levels of ROS were reduced and the system of antioxidant enzymes cerebellum SOD and CAT modulated positively those who trained him. *Picogreen* analysis, it was observed an exercise protection against DNA damage. The CBC, the trained rats maintained the parameters analyzed within reference values when compared to sedentary treated with VCR. Thus, the swimming exercise proved to be a great ally in protecting the oxidative metabolism-inflammatory front chemotherapy toxicity Vincristine.

Keywords: physical exercise; swimming; chemotherapy; Vincristine; neurotoxicity; cerebellum; rats

INTRODUÇÃO

O tratamento dos cânceres é atualmente, um dos problemas mais desafiadores da medicina (CHABNER e ROBERTS, 2005). O Instituto Nacional do Câncer (INCA), em sua *Estimativa 2014*, válida até final do ano de 2015, estimou cerca de 580 mil casos novos da doença neste período e, a previsão foi que o valor alocado no fortalecimento do atendimento em oncologia chegasse a R\$ 4,5 bilhões, também neste período (INCA, 2013).

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).

Os quimioterápicos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. As estruturas normais que se renovam constantemente, como a medula óssea, os pelos e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidas pela ação destes (INCA, 1999). Sendo assim, o tratamento com quimioterapia está constantemente associado com aplasias e hipoplasias ósseas, caracterizando diminuição das células sanguíneas de defesa e anemias.

A Vincristina (VCR) é um alcalóide da vinca que atua nas células, promovendo ruptura do fuso mitótico e, com isso, interrompendo a divisão celular. Esta droga causa alterações imunológicas como a leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos no sangue) e em consequência disso há um aumento da suscetibilidade à infecções (PEREZ et al., 2005; ANVISA, 2009).

Além disso, a VCR é um quimioterápico capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e por isso está associado com relevante neurotoxicidade (PELS et al., 2003). Mecanismos moleculares da neurotoxicidade induzida por quimioterapia ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que há um aumento de peroxidação lipídica no tecido cerebral de ratos expostos à VCR, indicando associação do quimioterápico com aumento do estresse oxidativo (MARTINS et al., 2011). O sistema nervoso central (SNC) é mais suscetível a danos oxidativos, pois

apresenta grande atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, associada à elevada concentração de ferro livre e lipídios polinsaturados, e baixos níveis de enzimas antioxidantes (TER-MINASSIAN, 2006). A crescente associação de alguns quimioterápicos com estresse oxidativo tem alertado as pesquisas para a busca de estratégias que visam à prevenção contra ação de radicais livres no tecido nervoso.

Ainda existem poucos estudos sobre a sensibilidade diferencial dos neurônios do cerebelo, astrócitos e células neoplásicas aos medicamentos quimioterápicos. O estudo *in vitro* de Wick et al. (2004), evidenciou que os quimioterápicos Cisplatina, Lomustina, Vincristina e Cloridrato de Topotecana reduziram a viabilidade celular de neurônios cerebelares. Neste estudo, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foi o que preveniu a morte celular neuronal induzida pelos quimioterápicos. Nesse sentido, terapias que modulem positivamente o sistema antioxidante podem ser importantes ferramentas no tratamento de diversas doenças e toxicidades que afetem o SNC. Estudos em modelos experimentais mostraram que a atividade física aumenta a expressão de BDNF (RADAK et al., 2006; DIETRICH, ANDREWS e HORVATH, 2008; GRIESBACH, HOVDA e GOMEZ-PINILLA, 2009) e modula positivamente o sistema antioxidante, aumentando o conteúdo e/ou atividade das enzimas SOD, CAT e GPx tanto no músculo como no cérebro de ratos (RAMBO et al., 2009; STEINER e PHILBERT, 2011), bem como, melhora a taxa de sobrevivência de neurônios de Purkinje via infra-regulação dos astrócitos reativos (LEE et al., 2014).

O sistema imunológico, também, é altamente influenciado pelo exercício (KRZYWKOWSKI et al., 2001; NEIMAN, 2001). A prática de atividade física influencia no aumento ou na diminuição de chances do organismo em contrair infecções (PEDERSEN e HOFFMEN-GOET, 2000; JONSDOTTIR, 2000; KRZYWKOWSKI, et al., 2001). Estudos indicam, também, que parece haver uma melhor modulação da função imunológica, devido ao incremento do número de células *Natural Killer* (NK) e linfócitos circulantes (JONSDOTTIR, 2000). Nessas condições o sistema imunológico estaria mais qualificado para combater o câncer.

O câncer, assim como seu tratamento, afeta diretamente a qualidade de vida dos pacientes. Pensando nisso, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do

exercício físico nos parâmetros bioquímicos e imunológicos de ratos expostos ao tratamento quimioterápico com Vincristina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria, com peso variando entre 270 e 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). E o número de animais utilizados foi o mínimo possível de modo a fornecer efeitos consistentes de nossos resultados. Para a realização deste estudo os animais foram divididos em dois grupos com relação à prática de natação: Treinados (n=20) e Sedentários (n=20). Após o período de natação de seis semanas, em cada grupo, os ratos foram tratados ou com Vincristina (VCR; n=10) ou com solução salina (0,9% NaCl; n=10), respeitando o intervalo de uma semana entre as doses únicas aplicadas. Sete dias depois da segunda dose de quimioterapia, os animais foram eutanasiados e os tecidos cerebelar e sanguíneo foram coletados para análises bioquímicas.

Protocolo de Natação

O protocolo utilizado, baseou-se nos estudos de Gobatto et al. (2001) e Souza et al. (2009). No período de seis semanas, os ratos selecionados para o grupo dos Treinados 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 exercício 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 melhorar a 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 dois grupos receberam o tratamento com VCR ou salina.

Administração de Quimioterapia

Para a administração de quimioterapia optou-se pela via intraperitoneal, uma vez que a cinética do fármaco é bastante semelhante a via intravenosa, utilizada em humanos (NADULSKA, KLUKOWSKA e DYBA, 2002). O Sulfato de Vincristina foi dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) e administrado em duas doses de 0,5 mg/kg (dosagem calculada por peso corporal do dia), com intervalo de uma semana entre elas, gerando uma dose acumulada de 1,0 mg/kg. Os ratos selecionados para controle receberam a mesma dosagem de NaCl, apenas.

Análises bioquímicas

Os animais foram eutanasiados por decapitação sete dias após a última aplicação do quimioterápico (dia 15). O cerebelo foi exposto por remoção dos ossos parietal e occipital e foi congelado a -80°C para conservação da estrutura e posterior análises bioquímicas.

O potencial geração de ROS pelos tratamentos foi monitorada através o uso de uma sonda fluorescente, a 2,7'- diclorofluoresceína (DCF). Este ensaio foi baseado no seguinte pressuposto químico: o diacetato de diclorofluoresceína

(DCFH-DA) é capaz de se difundir através de membranas celulares. Dentro das células esta molécula é deacetilada pela ação das enzimas esterases intracelulares. Esta reação forma, por sua vez, um produto não-fluorescente, a dihidroclorofluoresceína (DCFH). A DCFH na presença de ROS é oxidada (preferencialmente peróxidos, hidroperóxidos e $\text{NO}\bullet$) passando para uma forma altamente fluorescente a diclorofluoresceína (DCF). Assim, quanto maior a fluorescência detectada pela maior absorbância avaliada pelo fluorímetro, maior a ocorrência de compostos oxidantes. Os resultados do DCFH foram expressos em porcentagem do controle (%).

A atividade da enzima Catalase (CAT) foi analisada espectrofotometricamente pelo método de Aebi (1984), que envolve o monitoramento do desaparecimento de H_2O_2 na presença da enzima no comprimento de onda de 240 nm. Após o tratamento das células cerebelares, uma alíquota destas foi adicionada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e a reação enzimática foi iniciada pela adição de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em Units/ mg de proteína.

Para verificar a atividade da Superóxido Dismutase (SOD), uma parte do cerebelo foi homogenizada adequadamente num volume de 40 (w/v) com Tris-HCl 10mM (pH 7.4), e o ensaio foi realizado conforme o método descrito por Misra e Fridovich (1972). A SOD foi expressa por Units/mg de proteína.

Para o estudo hematológico o sangue foi coletado da veia hepática no momento do sacrifício, 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 do treinamento de natação no sistema imunológico. Foram considerados os valores de plaquetas, leucócitos totais, 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.

Essa técnica pode ser utilizada para a quantificação do DNA liberado no meio devido a apoptose 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). Primeiramente pipetamos 80 μL de TE 1X, adicionamos 10 μL da amostra e 10 μL do reagente *Picogreen* diluído. Homogeneizamos em 8 pelo menos 10 vezes. As amostras são incubadas a temperatura ambiente por no mínimo 5 minutos e no máximo 30 minutos. A técnica foi realizada em triplicata contendo uma triplicata com um dsDNA conhecido. A leitura em fluorímetro deu-se nos seguintes comprimentos de onda: 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (%).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se o teste de ANOVA de duas vias, utilizando o programa de produção de gráficos e estatístico GraphPad Prism 6.0. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles onde $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

A amostra incluiu um total de 40 ratos, sendo 10 de cada grupo experimental.

O teste da DCFH mostrou que o Grupo Sedentário/VCR apresentou um aumento significativo nos níveis de ROS no cerebelo quando comparados ao Grupo Sedentário/NaCl (controle) ($F(1, 20)=4.82$; $p \leq 0,05$). Já o Grupo Treinado/VCR reduziu significativamente a produção de ROS neutralizando o dano provocado pela VCR ($F(1, 20)=13.05$; $p \leq 0,05$. Figura 1). Esse resultado mostra que o exercício modula o metabolismo oxidativo.

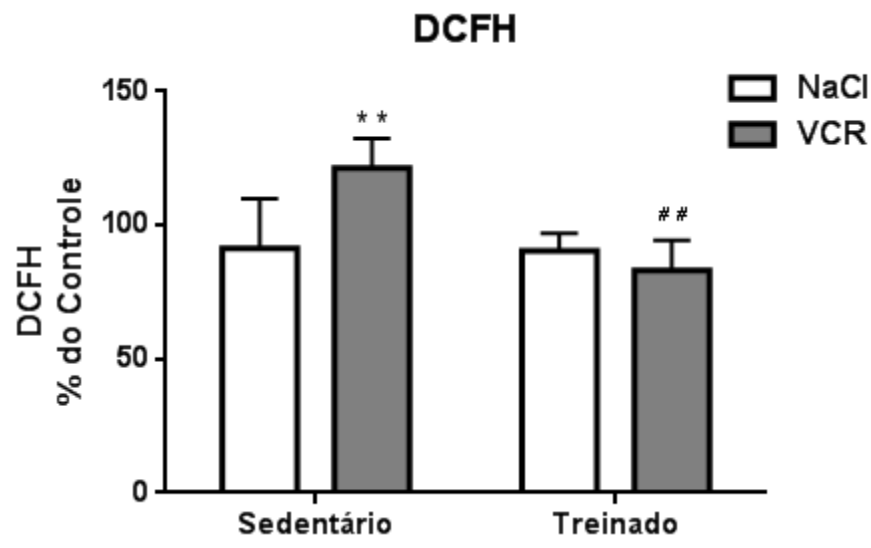
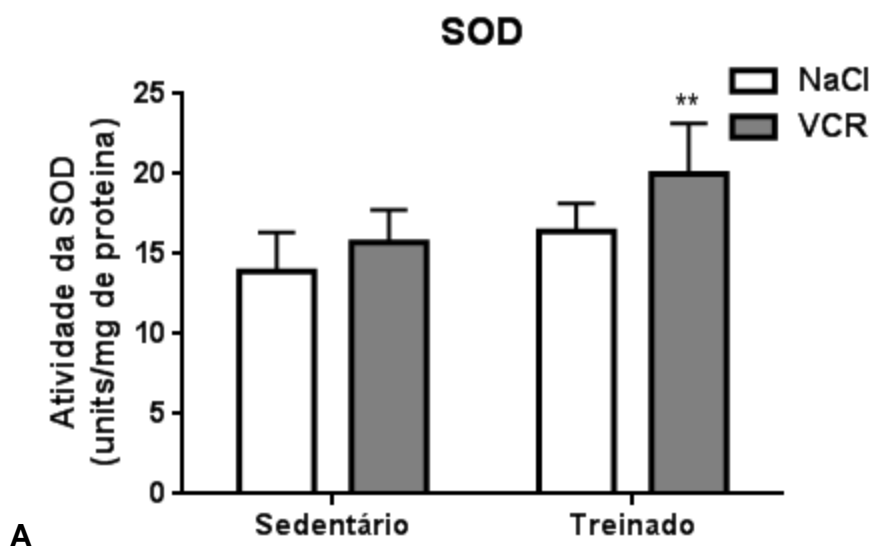


Figura 1: Análise do estresse oxidativo pelo aumento do grupo peroxilas no DCFH. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (Sedentário/ NaCl); ## $p < 0,01$ em relação ao Sedentário/ VCR.

As enzimas SOD ($F(1, 16) = 9,82$; $p \leq 0,05$. Figura 3A) e CAT ($F(1, 20) = 16,13$; $p \leq 0,05$. Figura 2) tiveram um aumento significativo da sua atividade nos Grupos Treinados, o que indica maior proteção aos danos oxidativos de cerebelo pela prática de exercício físico quando comparado aos Grupos Sedentários.



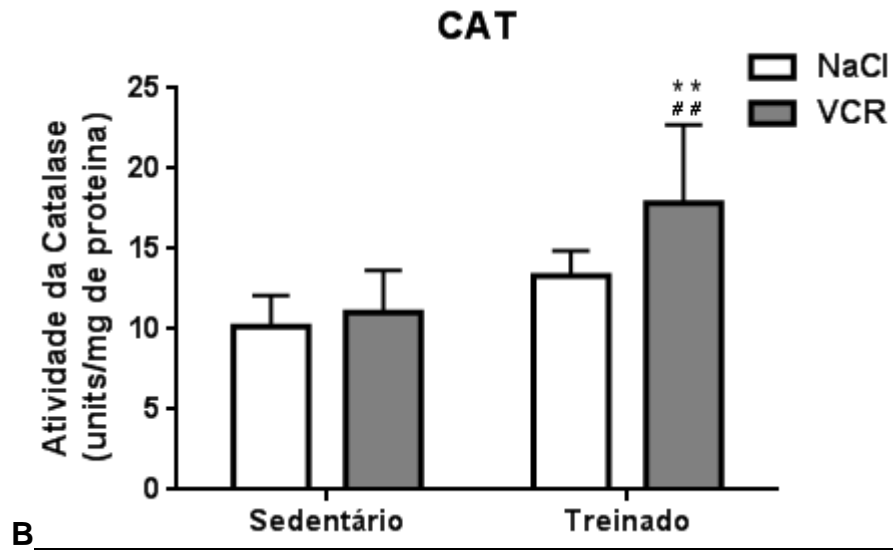


Figura 2: Análise das enzimas antioxidantes. **A** Atividade da SOD, demonstrada em units/mg de proteína. **B** Atividade da enzima Catalase (CAT), demonstrada em units/mg de proteína. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (Sedentário/ NaCl); ## $p < 0,01$ em relação ao Sedentário/ VCR.

Nas análises bioquímicas, pode-se observar que o Grupo Sedentário/VCR apresentou significativa leucocitose, indicando reação do organismo a um processo inflamatório instalado ($F(1, 20)=30,05$; $p \leq 0,05$). Tendo como valores de referência 7.300 – 12.660 μ L para leucócitos totais. Os animais do Grupo Treinado/VCR tiveram esse resultado neutralizado pelo exercício físico, visto que os leucócitos totais aumentaram pouco em relação dos valores de referência e não tiveram diferença significativa do Grupo Sedentário/NaCl (controle), apenas do Grupo Sedentário/VCR ($F(1, 20)=5,60$; $p \leq 0,05$. Figura 3).

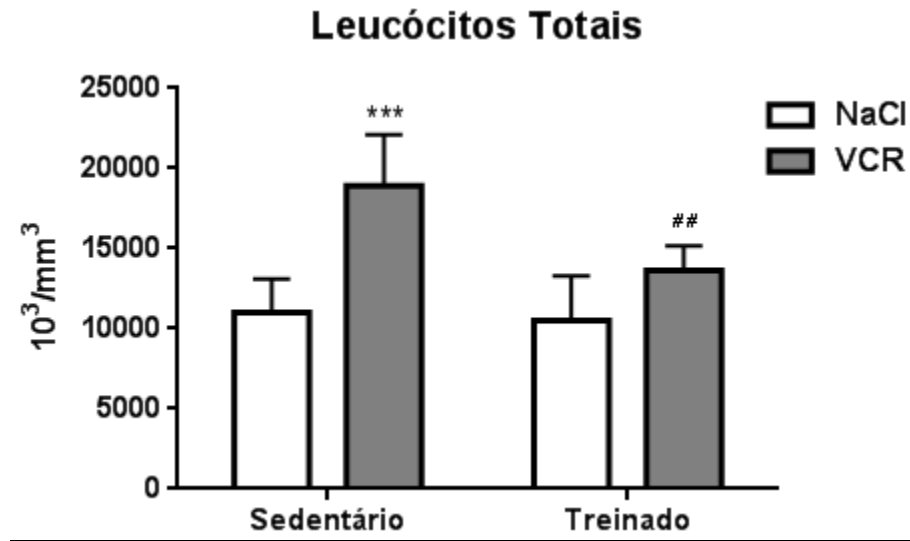


Figura 3: Análise de hemograma. Leucócitos totais - valores expressos em $10^3/\text{mm}^3$. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (Sedentário/ NaCl); ## $p < 0,01$ em relação ao Sedentário/ VCR.

Além disso, considerando os valores de referência para plaquetas de 840.000 a 1.240.000/ μL , pode-se observar importante plaquetopenia (diminuição no número de plaquetas) nos ratos do Grupo Sedentário/VCR, sugerindo que este medicamento tenha efeitos tóxicos ao sistema imunológico ($F(1,17)=16,14$; $p \leq 0,05$). O exercício físico foi capaz de neutralizar este dano pois o Grupo Treinado/VCR não apresentou diferença significativa do grupo controle, apenas do Grupo Sedentário/VCR ($F(1,17)=7,72$; $p \leq 0,05$. Figura 4).

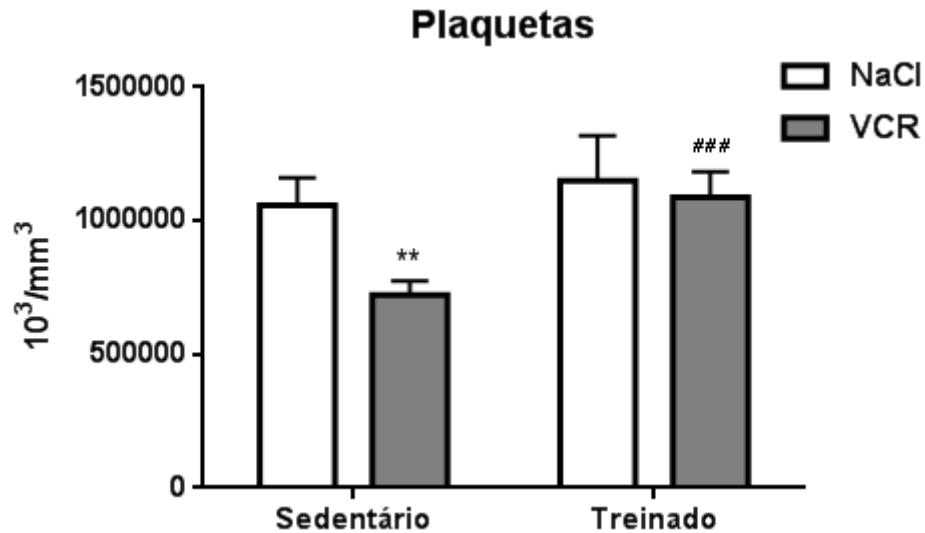


Figura 4: Análise de hemograma. Plaquetas - valores expressos em $10^3/\text{mm}^3$. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (Sedentário/ NaCl); ### $p < 0,001$ em relação ao Sedentário/ VCR.

Observou-se também, que os níveis de eritrócitos (representados pela % de hematócrito, no hemograma) foram reduzidos no Grupo Sedentário/VCR ($F(1,17)=40,31$; $p \leq 0,05$), quando comparados com o Grupo Sedentário/NaCl. Este é um valor de referência para o controle da anemia provocada pela quimioterapia, devendo estar entre 41,1 e 51,1%. O exercício físico foi capaz de proteger contra esse dano quando comparamos o Grupo Sedentário/VCR com o Grupo Treinado/VCR ($F(1,17)=36,44$; $p \leq 0,05$. Figura 5).

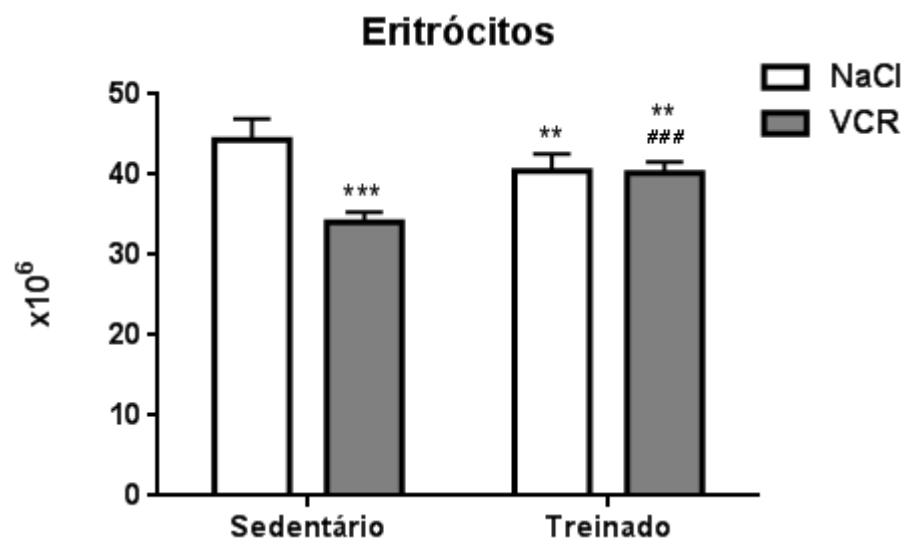


Figura 5: Análise de hemograma. Eritrócitos - valores expressos em $\times 10^6$. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (Sedentário/ NaCl); * * * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (Sedentário/ NaCl); ### $p < 0,001$ em relação ao Sedentário/ VCR.

Foi observado, também, maior dano de DNA nos ratos do Grupo Sedentário/VCR em comparação com o Grupo Sedentário/NaCl (controle) ($F(1, 16)=28,84$; $p\leq 0,05$), demonstrando o potencial genotóxico deste quimioterápico. Além disso, observamos efeito protetor significativo do exercício físico, que neutralizou o resultado do Grupo Treinado/VCR, quando comparado ao Grupo Sedentário/VCR ($F(1, 16)=4,703$; $p\leq 0,05$. Figura 6).

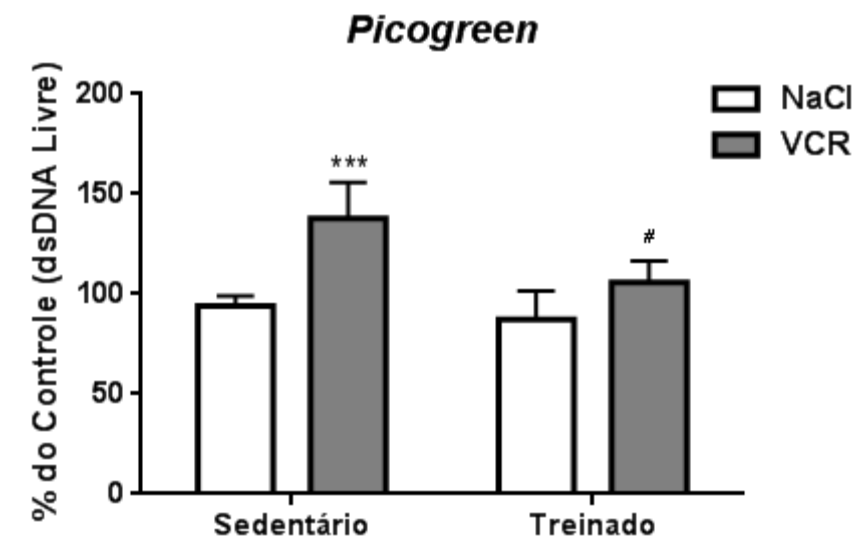


Figura 6: Análise de fragmentação de DNA pelo método *Picogreen*, expressos em porcentagem do controle. * * * $p < 0,001$ em relação ao controle (Sedentário/ NaCl); # $p < 0,05$ em relação ao Sedentário/ VCR.

DISCUSSÃO

Neste trabalho a opção por analisar o sangue e a estrutura cerebelar no sétimo dia após a última dosagem foi baseada no pressuposto de que a imunossupressão e o estresse oxidativo são maiores após o sétimo dia da aplicação da VCR (PEREZ et al., 2005; BARZEGAR-FALLAH et al., 2014). Uma vez que a dose quimioterápica eficaz e tempo de tratamento de VCR ainda não estão bem estabelecidos, havendo assim, uma grande variação; e há poucas pesquisas relacionadas à toxicidade da Vincristina ao cerebelo. A dosagem acumulada utilizada de 1,0 mg/kg foi suficiente para causar estresse oxidativo no cerebelo, uma

vez que os ratos sedentários tratados com VCR tiveram um aumento na produção de radicais peroxil. O que se pode observar foi que o treinamento de natação reduziu os níveis de DCFH no grupo tratado por VCR. Neste caso o exercício físico se mostrou com um potencial efeito protetor cerebelar, uma vez que é sabido que o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) pode causar uma maior permeabilidade da barreira hemato-encefálica e, assim, inibir a respiração mitocondrial, aumentar a oxidação protéica e a produção de histamina pelos mastócitos (DELLA ROVERE et al., 1995), o que prejudicaria a interação sináptica.

Neste estudo podemos sugerir também que o exercício físico ajudou a modular positivamente o sistema enzimático antioxidante. As enzimas SOD e CAT tiveram sua atividade aumentada nos grupos treinados e tratados com VCR quando comparados com grupos sedentários e tratados. Nossos achados vão ao encontro do estudo realizado por Souza et al. (2009), no qual observaram que o treinamento físico aumentou a atividade SOD *per se*, bem como protegeu do aumento da formação de TBARS, carbonilação de proteínas, oxidação DCFH-DA e TNP induzidas pelas convulsões com PTZ (pentiltetrazol).

Estes resultados concordam ainda com algumas evidências que sugerem que as respostas adaptativas ao exercício moderado envolvem um aumento das defesas antioxidantes e uma redução de produção basal de oxidantes (RADAK et al., 2006; PACKER, CADENAS e DAVIES, 2008). Em um estudo de Navarro et al. (2004) demonstrou ainda que o exercício físico moderado diminuiu o dano oxidativo, aumentou a expectativa de vida e melhorou o desempenho comportamental associado ao envelhecimento em ratos.

No hemograma observou-se aumento significativo nos níveis de leucócitos totais nos ratos tratados com VCR indicando uma reação do organismo ao processo infeccioso provocado pelo quimioterápico. Bem como, 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 importante plaquetopenia (diminuição no número de plaquetas) nos ratos tratados com VCR. Quanto aos níveis de eritrócitos, valor de referência para controle da anemia durante a quimioterapia, observou-se diminuição significativa dos valores nos ratos tratados com VCR. Entendemos com isso, que o uso deste quimioterápico altera a função protetora do sistema imunológico, deixando os animais mais suscetíveis a infecções.

O exercício físico prévio neutralizou todos os danos como observados no hemograma, tornando o sistema imunológico dos animais mais fortes para o tratamento com quimioterapia.

Estudos atuais têm demonstrado também preocupação com a genotoxicidade dos quimioterápicos e com isso desenvolvido métodos que possam atuar na diminuição deste dano. Os alcalóides de vinca como a Vincristina induzem citotoxicidade pela interação com a tubulina. Os efeitos bioquímicos e biológicos sobre microtúbulos incluem competição pelo transporte intracelular de aminoácidos, inibição da purina, da síntese de proteínas de RNA e DNA e ruptura lipídica da membrana celular. (CHABNER e LONGO, 2005). No nosso estudo, verificamos que os animais tratados com Vincristina apresentaram dano significativo de DNA. O exercício físico atuou também como genoprotetor, neutralizando os efeitos deletérios naqueles ratos que realizaram treinamento de natação previamente.

Danos oxidativos cerebelares e sanguíneos importantes provocados pela VCR foram amenizados significativamente pelo exercício físico prévio, sugerindo importante proteção oxidativa-inflamatória. Nos estudos realizados por Valenti (2008) e Stephenson (2009) com pacientes sobreviventes de câncer, foi observado que os que se exercitaram antes do diagnóstico ou se exercitam e se mantêm em uma dieta adequada, conseguem ter uma qualidade de vida melhor do que os pacientes que não se exercitam e alimentam de forma adequada.

Os resultados deste estudo mostram que o exercício físico pode ter um efeito positivo como modulador do sistema antioxidante e imunológico, podendo ser considerado protetor destes sistemas. Esses dados são inovadores por se tratar do exercício físico como tratamento coadjuvante a quimioterapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=11006622013&pIdAnexo=1923358. Acesso dia 10 de março de 2015.

BARZEGAR-FALLAH, A. et al. The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 41, p. 1-8, Mar 2014.

CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**. 4ª edição. Walters Kluwer, 2005.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G., JR. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, Jan 2005.

DELLA ROVERE, F. et al. Hemoglobin oxidative stress in cancer. **Anticancer Res**, v. 15, n. 5B, p. 2089-2095, Sep-Oct 1995.

DIETRICH, M. O.; ANDREWS, Z. B.; HORVATH, T. L. Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. **J Neurosci**, v. 28, n. 42, p. 10766-10771, Oct 15 2008.

FUKUMASU, H. Sobre os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro. **Tese** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP; 2008.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 130, n. 1, p. 21-27, Aug 2001.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Res**, v. 1288, p. 105-115, Sep 8 2009.

HÁ, T. T. N. et al. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PLoS One**, 2011.

HIRONO, M. et al. Cerebellar globular cells receive monoaminergic excitation and monosynaptic inhibition from Purkinje cells. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29663, 2012.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2a ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Pro - Onco, 1999.

INCA, **Instituto Nacional do Câncer**. *Estimativa 2014*. 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acessado dia 30 de novembro de 2014.

JONSDOTTIR, I. H. Exercise immunology: neuroendocrine regulation of NK-cells. **Int J Sports Med**, v. 21 Suppl 1, p. S20-23, May 2000.

KRZYWKOWSKI, K. et al. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 4, p. C1259-1265, Oct 2001.

LEE, J. M. et al. Treadmill exercise improves motor coordination through ameliorating Purkinje cell loss in amyloid beta23-35-induced Alzheimer's disease rats. **J Exerc Rehabil**, v. 10, n. 5, p. 258-264, Oct 2014.

MARTINS, D.B. et al. Peroxidação lipídica em ratos tratados com sulfato de Vincristina e decanoato de nandrolona. **Arq Bras Med Vet Zootec**, ;63,1. 2011

MISRA, H. P; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **J Biol Chem** 242:6960-6962, 1972.

NADULSKA, A.; KLUKOWSKA, L.; DYBA, S. Changes of resistance parameters of femoral bone in adult female rats after application of zoladex and vincristin. **Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med**, v. 57, n. 2, p. 426-430, 2002.

NAVARRO, F. et al. Mecanismos potenciais pelos quais a prática de exercícios físicos pode prevenir ou tratar o câncer de mama. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano II, no 4, Dec 2004.

NIEMAN, D. C. Exercise immunology: nutritional countermeasures. **Can J Appl Physiol**, v. 26 Suppl, p. S45-55, 2001.

PACKER, L.; CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Free radicals and exercise: an introduction. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 123-125, Jan 15 2008.

PEDERSEN, B.K; HOFFMAN-GOET, L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiological Reviews**, 80(3):1055-81, 2000.

PELS, H. et al. Primary central nervous system lymphoma: results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 24, p. 4489-4495, Dec 15 2003.

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

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Int**, v. 49, n. 4, p. 387-392, Sep 2006.

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Int**, v. 49, n. 4, p. 387-392, Sep 2006.

RAMBO, L. M. et al. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 55, n. 5, p. 333-340, Sep 2009.

SOUZA, M.A, *et al.* Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, 50(4):811-823, 2009.

STEINER, S. R.; PHILBERT, M. A. Proteomic identification of carbonylated proteins in 1,3-dinitrobenzene neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 362-373, Aug 2011.

STEPHENSON, L. et al. Physical activity and diet behaviour in colorectal cancer patients receiving chemotherapy: associations with quality of life. **BMC Gastroenterology** 2009.

TER-MINASSIAN, A. [Cerebral metabolism and brain injury]. **Ann Fr Anesth Reanim**, v. 25, n. 7, p. 714-721, Jul 2006.

VALENTI, M. et al. Physical exercise and quality of life in breast cancer survivors. **International Journal of Medical Sciences**, 2008.

WICK, A. et al. Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, 91, 1067–1074, 2004.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

A Vincristina, no modelo de dose/aplicação utilizado, aumentou o estresse oxidativo cerebelar (DCFH-DA), reduziu significativamente os valores de Plaquetas e Eritrócitos no hemograma, bem como indicou processo inflamatório com aumento dos Leucócitos totais. Além disso, foi capaz de alterar o equilíbrio (*Rotarod*) dos ratos tratados, e de produzir alteração sensitiva/motora periférica, avaliada pelo teste da Placa Quente;

O exercício físico promoveu aumento da resistência ao estresse oxidativo do cerebelo por meio da melhora do sistema antioxidante (SOD e CAT) e diminuição do estresse oxidativo cerebelar (DCFH). Ele também neutralizou os danos comportamentais neste modelo de tratamento com Vincristina e aumentou a força muscular dos ratos, no *Grip-Test*, de forma independente.

Pode-se considerar que a prática de exercício físico, de maneira profilática, pode ter um impacto positivo no tratamento com o quimioterápico Vincristina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AFIFI, A. K.; BERGMAN, R. A. **Neuroanatomia Funcional**: texto e atlas. 2. ed. São Paulo: Roca. p. 354, 2008.

AGUIAR JR., A. S.; PINHO, R. A. Effects of physical exercise over the redox brain state. **Rev Bras Med Esporte** [online]. v. 13, n. 5, pp. 355-360. 2007.

AHLES, T. A.; SAYKIN, A. J. Breast cancer chemotherapy-related cognitive dysfunction. **Clin Breast Cancer**, v. 3 Suppl 3, p. S84-90, dec. 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. 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). Acesso em abril de 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=11006622013&pIdAnexo=1923358. Acesso dia 10 de março de 2015.

ARIDA, R. M. et al. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, v. 37, n. 1, p. 45-52, Oct 1999.

ARIDA, R. M. et al. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neurosci Lett**. 2004;364:135-8.

BARCO, A. N.; ENGEBY, T. W.; RIBAL, J. B. Cerebelo y procesos cognitivos. **Anales de Psicologia**. v. 20, p. 205-221, dec. 2001.

BARZEGAR-FALLAH, A. et al. The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 41, p. 1-8, Mar. 2014.

BENEDETTI, M. G. et al. Treadmill exercise in early multiple sclerosis: a case series study. **Eur J Phys Rehabil Med**, v. 45, n. 1, p. 53-59, Mar. 2009.

BIANCHINI, F.; KAAKS, R.; VAINIO, H. Weight control and physical activity in cancer prevention. **Obesity Reviews**. 3:5-8, 2002.

BOOTH, F. W.; CHAKRAVARTHY, M. V.; SPANGENBURG, E. E. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 2, p. 399-411, Sep 1 2002.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim.Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRAUGHLER, J. M. et al. Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. **J Biol Chem**, v. 262, n. 22, p. 10438-10440, Aug 5 1987.

BRAVIN, M. et al. Control of spine formation by electrical activity in the adult rat cerebellum. **Proc Natl Acad Sci. U S A**, v. 96, n. 4, p. 1704-1709, Feb. 16 1999.

BRAY F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **Lancet Oncol**. 2012 Aug;13(8):790-801.

BURNHAM, T. R.; WILCOX, A. Effects of exercise on physiological and psychological variables in cancer survivors. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 12, p. 1863-1867, dec. 2002.

CASTELL, L. M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? **Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 371-375, May 2002.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**. 4. ed. Walters Kluwer, 2005.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR., T. G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, Jan 2005.

COPPOC, G. L. Chemotherapy of neoplastic diseases. In J. E. Riviere & M. G. Papich (Ed.), **Veterinary Pharmacology and therapeutics**. (9th ed.). 2009.

CORREA, D. D.; AHLES, T. A. Neurocognitive changes in cancer survivors. **Cancer J**, v. 14, n. 6, p. 396-400, nov./dec. 2008.

DELLA ROVERE, F. et al. Hemoglobin oxidative stress in cancer. **Anticancer Res**, v. 15, n. 5B, p. 2089-2095, sep./oct. 1995.

DIETRICH, M. O.; ANDREWS, Z. B.; HORVATH, T. L. Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. **J Neurosci**, v. 28, n. 42, p. 10766-10771, oct. 15 2008.

DRINGEN, R. Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 16, p. 4903, aug. 2000.

FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1344, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FUKUMASU, H. **Sobre os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, Paullinia cupana Mart var.sorbilis, em modelos experimentais in vivo e in vitro**. Tese São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP; 2008.

GANANÇA, M. M. et al. **Estratégias Terapêuticas em Otoneurologia**. v. 4. São Paulo: Atheneu, 2000.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 130, n. 1, p. 21-27, aug. 2001.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Res**, v. 1288, p. 105-115, sep. 8 2009.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem**, v. 41, n. 12 Pt 2, p. 1819-1828, dec. 1995.

HÁ, T. T. N. et al. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PLoS One**, 2011.

HENNEMAM, E. **O cerebelo**. In: MOUNTCASTLE, V. B. Fisiologia médica. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

HENNIPMAN, B. et al. Intrathecal vincristine: 3 fatal cases and a review of the literature. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 31, n. 11, p. 816-819, nov. 2009.

HEO, Y. M. et al. Treadmill exercise ameliorates short-term memory disturbance in scopolamine-induced amnesia rats. **Int Neurobiol J**, v. 18, n. 1, p. 16-22, mar. 2014.

HERDMAN, S. J. **Reabilitação Vestibular**. 2. ed. Barueri: Manole, p. 3-24. 2002.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 58-65, jan. 2008.

HIRONO, M. et al. Cerebellar globular cells receive monoaminergic excitation and monosynaptic inhibition from Purkinje cells. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29663, 2012.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Pro - Onco, 1999.

INCA, **Instituto Nacional do Câncer**. Estimativa 2014. 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acessado dia 30 de novembro de 2014.

JAIN, S. K.; MCVIE, R.; SMITH, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. **Diabetes Care**, v. 23, n. 9, p. 1389-1394, sep. 2000.

JONSDOTTIR, I. H. Exercise immunology: neuroendocrine regulation of NK-cells. **Int J Sports Med**, v. 21 Suppl 1, p. S20-23, May 2000.

JOVANOVIC, Z.; JOVANOVIC, S. [Resistance of nerve cells to oxidative injury]. **Med Pregl**, v. 64, n. 7-8, p. 386-391, jul./aug. 2011.

KIM, H. et al. 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**, v. 504, n. 1, p. 35-39, oct. 17 2011.

KLUMPP, S.; LIPOWSKY, R. Active diffusion of motor particles. **Phys Rev Lett**, v. 95, n. 26, p. 268102, dec. 31 2005.

KOHL, Z. et al. Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Brain Res**, v. 1155, p. 24-33, jun. 25 2007.

KRARUP-HANSEN, A. et al. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. **Brain**, v. 130, n. Pt 4, p. 1076-1088, Apr 2007.

KRZYWKOWSKI, K. et al. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 4, p. C1259-1265, oct. 2001.

LAURIN, D. et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol**, v. 58, n. 3, p. 498-504, mar. 2001.

LEE, J. M. et al. Treadmill exercise improves motor coordination through ameliorating Purkinje cell loss in amyloid beta23-35-induced Alzheimer's disease rats. **J Exerc Rehabil**, v. 10, n. 5, p. 258-264, oct. 2014.

LEEDS, P. et al. Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons. **Neurochem Int**, v. 46, n. 1, p. 61-72, jan. 2005.

LEINER, H. C.; LEINER, A. L.; DOW, R. S. Does the cerebellum contribute to mental skills? **Behav Neurosci**, v. 100, n. 4, p. 443-454, aug. 1986.

MALAVÈS, R. A. **Efecto Del ejercicio físico agotador sobre elestrés oxidativo asociado al envejecimiento**. Tese (Doutorado). Facultat de Ciències de L'Activitat Física I L'Esport. Universitat de València. Espanha, 2003.

MARTINS, D. B. et al. Peroxidação lipídica em ratos tratados com sulfato de Vincristina e decanoato de nandrolona. **Arq Bras Med Vet Zotec**, 63,1. 2011

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain Res.** 2000;886:47-53.

MCDONNELL, M. N. et al. Physical activity frequency and risk of incident stroke in a national US study of blacks and whites. **Stroke**, v. 44, n. 9, p. 2519-2524, sep. 2013.

MCLEAN, J. A. et al. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 141, n. 3, p. 366-372, jul. 2005.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the antioxidation of hemoglobin. **J Biol Chem.** 242:6960-6962, 1972.

MONZILLO, L. et al. Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. **Obes Res.** 2003;11:1048-54.

NADULSKA, A.; KLUKOWSKA, L.; DYBA, S. Changes of resistance parameters of femoral bone in adult female rats after application of zoladex and vincristin. **Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med**, v. 57, n. 2, p. 426-430, 2002.

NAVARRO, F. et al. Mecanismos potenciais pelos quais a prática de exercícios físicos pode prevenir ou tratar o câncer de mama. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano II, no 4, dec. 2004.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1084p, 1998.

NIEMAN, D. C. Exercise immunology: nutritional countermeasures. **Can J Appl Physiol**, v. 26 Suppl, p. S45-55, 2001.

PACKER, L.; CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Free radicals and exercise: an introduction. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 123-125, jan. 15 2008.

PAGNANO, K. B. et al. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **Sao Paulo Med J**, v. 118, n. 6, p. 173-178, nov. 9 2000.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOET, L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiological Reviews**, 80(3):1055-81, 2000.

PELS, H. et al. Primary central nervous system lymphoma: results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 24, p. 4489-4495, dec. 15 2003.

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

POPPER, V. M. **A reabilitação vestibular na vertigem**. Monografia (Especialização em Fonoaudiologia e Audiologia Clínica). CEFAC. Itajaí, 2001

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Int**, v. 49, n. 4, p. 387-392, Sep 2006.

RAMBO, L. M. et al. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 55, n. 5, p. 333-340, sep. 2009.

ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J. Aspectos atuais sobre glutamina e exercício. **NutriçãoemPauta**. 58:34-40. 2003.

RZESKI, W. et al. Anticancer agents are potent neurotoxins in vitro and in vivo. **Ann Neurol**. 56(3): 351-360, 2004.

SCANDALIS, T. A. et al. Resistance training and gait function in patients with Parkinson's disease. **Am J Phys Med Rehabil**. 2001;80:38-43.

SEIGERS, R.; FARDELL, J. E. Neurobiological basis of chemotherapy-induced cognitive impairment: a review of rodent research. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 3, p. 729-741, jan. 2011.

SHABANI, M. et al. Maternal exposure to the CB1 cannabinoid agonist WIN 55212-2 produces robust changes in motor function and intrinsic electrophysiological properties of cerebellar Purkinje neurons in rat offspring. **Neuroscience**, v. 172, p. 139-152, jan. 13 2011.

SHABANI, M. et al. Profound destructive effects of adolescent exposure to vincristine accompanied with some sex differences in motor and memory performance. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 90, n. 4, p. 379-386, apr. 2012.

SOUZA, M. A. et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, 50(4):811-823, 2009.

STEINER, S. R.; PHILBERT, M. A. Proteomic identification of carbonylated proteins in 1,3-dinitrobenzene neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 362-373, aug. 2011.

STEPHENSON, L. et al. Physical activity and diet behaviour in colorectal cancer patients receiving chemotherapy: associations with quality of life. **BMC Gastroenterology**. 2009.

SUNG, Y. H. et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. **Life Sci**, v. 91, n. 25-26, p. 1309-1316, dec. 17 2012.

TER-MINASSIAN, A. [Cerebral metabolism and brain injury]. **Ann Fr Anesth Reanim**, v. 25, n. 7, p. 714-721, jul. 2006.

TILLERSON, J. L. et al. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003.

TITA, B. et al. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. **Farmacol**, v. 56, n. 5-7, p. 341-343, may./jul. 2001.

VALENTI, M. et al. Physical exercise and quality of life in breast cancer survivors. **International Journal of Medical Sciences**, 2008.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci. U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, nov. 9 1999.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidante e marcadores de danos oxidativos em sangue humano: principais

métodos analíticos para sua determinação. **Quim.Nova.** v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEDDER, H. et al. Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. **J Neurochem**, v. 72, n. 6, p. 2531-2538, Jun 1999.
VERSTAPPEN, C. C. et al. Dose-related vincristine-induced peripheral neuropathy with unexpected off-therapy worsening. **Neurology**, v. 64, n. 6, p. 1076-1077, mar. 22 2005.

VITURI, C. L. et al. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 8, p. 889-895, aug. 2000.

VOOGD, J. The human cerebellum. **J Chem Neuroanat**, v. 26, n. 4, p. 243-252, dec. 2003.

VOSS, P.; SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. **Free Radic Res**, v. 40, n. 12, p. 1339-1349, dec. 2006.

ZOPPI, C. C. et al. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, v. 17, n. 2, p. 119-30, dec. 2003.

WARBURTON, D. E. R.; NICOL, C. W.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: the evidence. **CMAJ**. 6:801-9. 2006.

WICK, A. et al. Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, 91, 1067-1074, 2004.

WIJK, N. V.; RIJNTJES, E.; HEIJNING, B. V. Perinatal and chronic hypothyroidism impair behavioural development in male and female rats. **Exp. Physiol.** 93(11): 1199–1209, 2008.

WOLF, S. A. et al. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP) – 23 model of Alzheimer's disease. **Biol Psychiatry**. 2006.

WOOLFE G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **J Pharmacol Exp Ther.** 80(3): 300 - 307, 1944.

ANEXO

**ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais -
UFSM**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Efeito neuroprotetor em células cerebelares e imunoprotetor do exercício físico em ratos expostos à vincristina."

Número do Parecer: 090/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira

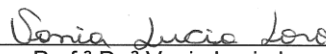
Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 01/10/2014.

Santa Maria, 01 de outubro de 2014.



Prof.ª Dr.ª Vania Lucia Loro

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM