

NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR VINCRISTINA EM RATOS VELHOS: AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA, DEGENERAÇÃO E EXCITABILIDADE NEURONAL.

KETLYN P. DA MOTTA¹; CAROLINA C. MARTINS²; VANESSA E. M. ROCHA³; MAURO P. SOARES⁴; CRISTIANE LUCHESE⁵; ETHEL A. WILHELM⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – mottaketlyn@yahoo.com.br;

²Universidade Federal de Pelotas - carol_cristovao@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – vnsmacedo@gmail.com;

⁴Universidade Federal de Pelotas – gmpsoares@gmail.com;

⁵Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br;

⁶Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A vincristina (VCR) é um fármaco quimioterápico de efeito antitumoral incontestável, utilizado para o tratamento de neoplasias incidentes em idosos (FITZMAURICE et al., 2017). Dentre os cânceres tratados pela VCR que acometem severamente idosos estão, linfomas (Hodgkin e não-Hodgkin) e câncer de mama (FITZMAURICE et al., 2017). Apesar da eficácia antitumoral, a VCR apresenta como efeito adverso o desenvolvimento de neuropatia periférica (NPIV) (LI et al., 2020).

Paralelamente, a senescência desencadeia o declínio de algumas funções biológicas básicas como a perda de plasticidade neuronal, metabolismo desacelerado e o aumento da prevalência da dor (DAGNINO; CAMPOS, 2022). Notavelmente, a prevalência da dor aumenta mais do que o dobro após os 60 anos de idade, sendo que 25% a 50% dos idosos sofrem com dor (FITZMAURICE et al., 2017).

Logo, a pré-disposição à dor enfrentada pelos idosos somada à neuropatia periférica que acomete idosos com câncer expostos à VCR é um paradigma clínico preocupante. Sabe-se que a VCR pode favorecer processos inflamatórios, levando a alterações sinápticas com consequente degeneração walleriana e apoptose neuronal (LI et al., 2020; STAROBOVA; VETTER, 2017). Entretanto, não é bem elucidado os processos neurotóxicos que a VCR pode causar em idosos.

Apesar disso, sabe-se que a VCR pode promover excitabilidade neuronal devido principalmente a alterações na homeostase de cálcio; seguido pela degeneração nas células nervosas (STAROBOVA; VETTER, 2017). O processo inflamatório ainda pode favorecer a migração de células inflamatórias como macrófagos estabelecendo neuroinflamação (MONTAGUE et al., 2018). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a NPIV em ratos idosos e jovens; buscando elucidar o papel da senescência no desenvolvimento da nocicepção, neurodegeneração e excitabilidade neuronal por meio da atividade da enzima Ca^{2+} - ATPase.

2. METODOLOGIA

2.1. Protocolo Experimental

Ratos jovens (2 meses) e velhos (16 meses) da linhagem Wistar foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (CEE 4506-2017) e mantidos em condições padrão. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: (I) Controle Jovem; (II) Jovem + VCR; (III) Velho Controle; e (IV) Velho + VCR (7 animais por grupo). Nos dias 1, 3 e 5 do protocolo experimental, os animais dos grupos II e IV receberam a indução com VCR (0,1 mg.kg⁻¹, via

intraperitoneal), enquanto os grupos I e III receberam o veículo (solução salina 0,9%, 10 ml.kg⁻¹, intraperitoneal). O protocolo experimental durou 17 dias, e no último dia os animais foram submetidos à eutanásia. As estruturas cerebrais foram dissecadas para análise da enzima Ca²⁺ - ATPase e a medula espinhal foi retirada para análise histológica.

2.2. Avaliação das respostas nociceptivas

A resposta mecânica foi avaliada nos dias 6, 11 e 17 do protocolo experimental usando um transdutor de força portátil (estesiômetro). O método de avaliação nociceptiva foi realizado conforme descrito por Alamri et al. (2018).

2.3. Análise histológica

A coluna vertebral dos ratos jovens e velhos foi coletada e fixada em solução de formol tamponado (10%) por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram seccionadas e processadas e embebidas em parafina, cortadas em seções de 3-4 µm e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para realização de análise em microscópio óptico.

2.4. Atividade enzimática da Ca²⁺ - ATPase

As amostras de córtex e medula foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e posteriormente centrifugadas a 900 × g por 10 minutos para obtenção do sobrenadante (S1). A atividade da Ca²⁺-ATPase foi conduzida seguindo a metodologia descrita por Rohn (1993) e adaptada conforme Trevisan et al. (2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A VCR causou nocicepção mecânica em ratos jovens e velhos em todos os dias avaliados após a indução com VCR (Figura A). No dia 6 do protocolo experimental, ratos jovens e velhos apresentaram diminuição do limiar de retirada da pata em 30% e 17%, respectivamente. No dia 11, observamos a permanência da sensibilidade mecânica em ratos jovens e velhos (43% e 20%, respectivamente). No dia 17, foi verificada sensibilidade mecânica em ratos jovens (31%) e velhos (34%). É importante destacar que ratos velhos apresentaram maior sensibilidade mecânica mesmo antes da indução quando comparado aos animais jovens. Logo, o limiar de sensibilidade mecânica de ratos velhos foi mais baixo do que ratos jovens.

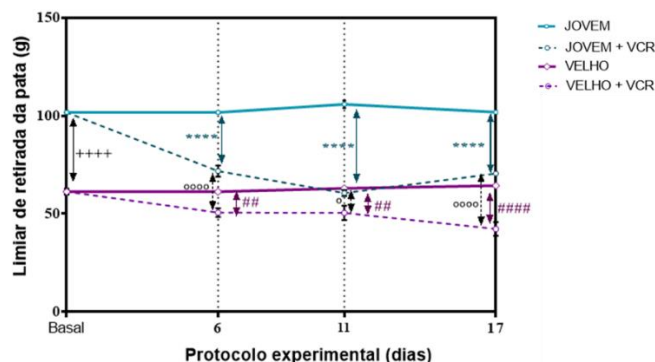


Figura A. Efeitos da exposição à VCR na avaliação do limiar de retirada da pata frente ao estímulo mecânico em ratos jovens e velhos. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 7 animais por grupo. (++++) P < 0,0001 denota níveis de significância quando comparado o grupo controle jovem ao controle velho; (****) P < 0,0001 denota níveis de significância na comparação do grupo VCR jovem com o grupo jovem controle; (##) P < 0,01 e (####) P < 0,0001 denotam níveis de significância quando comparado o grupo ratos velhos com VCR ao grupo controle velho; (°) P < 0,05 e (°°°°) P < 0,0001 denotam níveis de significância quando comparado o grupo velho com VCR ao grupo jovem com VCR. Foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey.

A análise histológica (Figura B) demonstrou que a VCR causou vacuolização focalmente extensa bilateral e simétrica do espaço periaxonal com esferoides axonais ocasionais na medula espinal de ratos jovens (Figura B2 e B4) e velhos (Figura B6 e B8). Em ratos idosos expostos a VCR, foram observados danos às bainhas de mielina pelo desenvolvimento de fragmentos com vacúolos de diferentes tamanhos, os quais desenvolveram paralelamente câmaras de digestão contendo macrófagos, principalmente nos funículos ventral e lateral (Figura B8). Estes indícios indicam por meio do dano histológico que a VCR foi capaz de causar degeneração neuronal e walleriana em ratos velhos demonstrando o comprometimento das células da medula espinal.

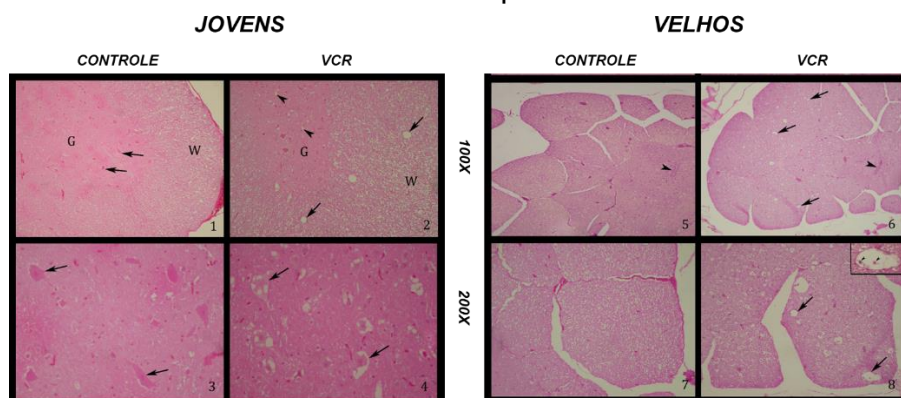


Figura B. Efeitos da exposição a VCR na análise histológica da medula espinal de ratos jovens e velhos. Os números 1 e 3 correspondem ao perfil histológico (PH) da medula espinal lombar de ratos jovens controle; 2 e 4 correspondem ao PH de ratos jovens com VCR; 5 e 7 correspondem ao PH de ratos velhos controle; e 6 e 8 correspondem ao PH de ratos velhos com VCR. A seta denota vacúolos na substância branca dos animais submetidos a VCR comparados aos grupos controle com a seta indicando a ausência de vacúolo. No canto direito da lâmina 8 denota-se macrófagos dentro de um vacúolo.

Alterações na excitabilidade neuronal foram avaliadas por meio do aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase no córtex cerebral (Figura C1) e medula espinal (Figura C2) de ratos jovens e velhos. A exposição de ratos jovens a VCR causou aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase no córtex cerebral (175%) e medula espinal (3000%). Na medula de ratos velhos controle observamos o aumento *per se* da atividade da Ca^{2+} -ATPase. Ainda, em ratos velhos a VCR ocasionou o aumento da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase no córtex cerebral (141%) e medula espinal (166%). O aumento da atividade enzimática indica o aumento da translocação de Ca^{2+} e, com isso, o aumento da excitabilidade sináptica. Com este achado inédito em ratos velhos, é possível verificar que o aumento de Ca^{2+} , especialmente na medula espinal, pode ser um ponto chave para o desenvolvimento de degeneração walleriana e neuronal, bem como a hipernocicepção.

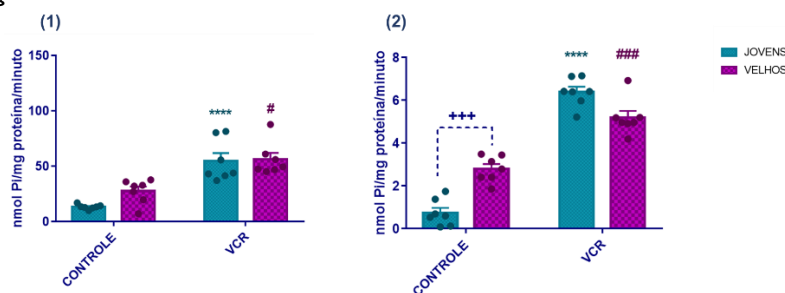


Figura C. Efeitos da exposição a VCR na atividade da enzima Ca^{2+} - ATPase no córtex cerebral (1) e medula espinhal (2) de ratos jovens e velhos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 7 animais por grupo. (+++) $P < 0,001$ denota níveis de significância ao comparar o grupo controle jovem com o grupo controle velho; (****) $P < 0,0001$ denotam níveis de significância quando comparado o grupo jovem com VCR com o grupo jovem controle; (#) $P < 0,05$ e (###) $P < 0,001$ denotam níveis de significância quando comparado ratos velhos com VCR ao grupo de ratos velhos controle. Foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey.

4. CONCLUSÕES

Perante os resultados apresentados, verificamos que ratos jovens e velhos desenvolveram NPIV; sendo que ratos velhos apresentaram maior hiperalgesia mecânica. Observamos ainda que a VCR causou degeneração walleriana e neuronal na medula espinhal de ratos velhos. Inferimos por fim que a degeneração observada pode estar relacionada com o aumento da atividade da Ca^{2+} - ATPase podendo esta evidência indicar o aumento da excitabilidade neuronal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAMRI, Faisal F.; SHOYAIB, Abdullah Al; BIGGERS, Abbie; JAYARAMAN, Srinidhi; GUINDON, Josée; KARAMYAN, Vardan T. Applicability of the grip strength and automated von Frey tactile sensitivity tests in the mouse photothrombotic model of stroke. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 336, n. August 2017, p. 250–255, 2018. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.09.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.09.008>.
- DAGNINO, Ana P. A.; CAMPOS, Maria M. Chronic Pain in the Elderly: Mechanisms and Perspectives. **Frontiers in Human Neuroscience**, [S. l.], v. 16, p. 1–11, 2022. DOI: 10.3389/fnhum.2022.736688.
- FITZMAURICE, Christina et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden . **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 524–548, 2017. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.5688.
- LI, Gui zhou; HU, Ya hui; LI, De yi; ZHANG, Yong; GUO, Hong li; LI, Yun man; CHEN, Feng; XU, Jing. Vincristine-induced peripheral neuropathy: A mini-review. **NeuroToxicology**, [S. l.], v. 81, p. 161–171, 2020. DOI: 10.1016/j.neuro.2020.10.004.
- MONTAGUE, Karli; SIMEOLI, Raffaele; VALENTE, Joao; MALCANGIO, Marzia. A novel interaction between CX 3 CR 1 and CCR 2 signalling in monocytes constitutes an underlying mechanism for persistent vincristine-induced pain. **Journal of Neuroinflammation**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–15, 2018. DOI: 10.1186/s12974-018-1116-6.
- ROHN, Troy T.; HINDS, Thomas R.; VINCENZI, Frank F. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 525–534, 1993. DOI: 10.1016/0006-2952(93)90530-a.
- STAROBOVA, Hana; VETTER, Irina. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. May, p. 1–21, 2017. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00174.
- TREVISAN, Gabriela et al. Antinociceptive Effects of 14-Membered Cyclopeptide Alkaloids. **Journal of natural products**, [S. l.], v. 72, p. 608–612, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/np800377y>.