

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

KETLYN P. DA MOTTA<sup>1</sup>; CAROLINA C. MARTINS<sup>2</sup>; VANESSA E. M. ROCHA<sup>3</sup>; MAURO P. SOARES<sup>4</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>5</sup>; ETHEL A. WILHELM<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – mottaketlyn@yahoo.com.br;

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - carol\_cristovao@hotmail.com;

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – vnsmacedo@gmail.com;

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – gmsoares@gmail.com;

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – cristiane\_luchese@yahoo.com.br;

<sup>5</sup>Universidade 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 (CEEA 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<sup>-1</sup>, via

intraperitoneal), enquanto os grupos I e III receberam o veículo (solução salina 0,9%, 10 ml.kg<sup>-1</sup>, 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 Ca<sup>2+</sup> - 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

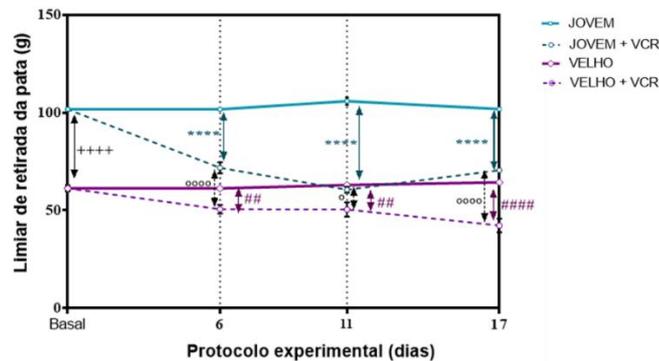
A coluna vertebral dos ratos jovens e velhos foi coletada e fixada em solução de formol tamponado (10%) por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram seccionadas e processadas e embebidas em parafina, cortadas em seções de 3-4 µm e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para realização de análise em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

### 2.4. Atividade enzimática da Ca<sup>2+</sup> - ATPase

As amostras de córtex e medula foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e posteriormente centrifugadas a 900 x g por 10 minutos para obtenção do sobrenadante (S1). A atividade da Ca<sup>2+</sup>-ATPase foi conduzida seguindo a metodologia descrita por Rohn (1993) e adaptada conforme Trevisan et al. (2009).

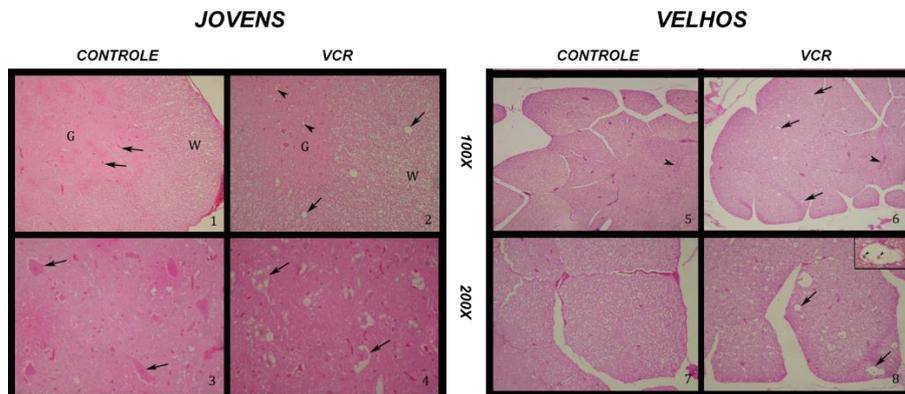
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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.



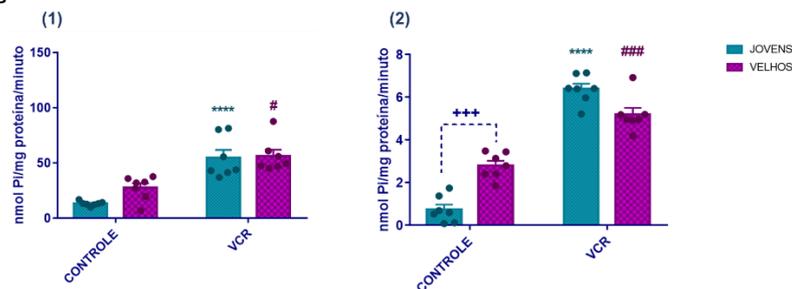
**Figura A.** Efeitos da exposição à VCR na avaliação do limiar de retirada da pata frente ao estímulo mecânico em ratos jovens e velhos. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 7 animais por grupo. (++++) P < 0,0001 denota níveis de significância quando comparado o grupo controle 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 espinhal 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 espinhal.



**Figura B.** Efeitos da exposição a VCR na análise histológica da medula espinhal de ratos jovens e velhos. Os números 1 e 3 correspondem ao perfil histológico (PH) da medula espinhal 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 espinhal (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 espinhal (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 espinhal (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 espinhal, 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  $\text{Ca}^{2+}$  - 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  $\text{Ca}^{2+}$ - 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>.