

Atividade motora em camundongos *Swiss* submetidos a treino físico (natação) combinado ou não com Clonazepam

Motor activity in *Swiss* mice subjected to the physical activity (swimming pool) combined or not with Clonazepam

Rafael Ramón Rodríguez Treto^{1,4}. Renildo de Moura Cunha^{2,4}. Wagner de Jesus Pinto^{3,4}. Mardelson Nery de Souza⁵. Luis Aaron Silverio Gutierrez⁵.

1 Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia pela Universidade Federal do Acre (UFAC). 2 Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba. 3 Doutorado em Biologia Funcional e Molecular pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 4 Professor pela Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, Acre, Brasil. 5 Acadêmicos do Curso de Medicina, Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, Acre, Brasil.

RESUMO

A plasticidade neuronal é expressão da capacidade adaptativa do sistema nervoso às mudanças ambientais, traduzindo-se fisiologicamente em alterações na excitabilidade e metabolismo neuronais em função da distribuição de cargas em ambos os lados das membranas celulares bem como da liberação de neurotransmissores nas fendas sinápticas. Portanto, mudanças nesses parâmetros do sistema motor podem alterar a atividade motora somática. **Objetivo:** determinar a ação de diferentes doses de Clonazepam combinado com exercício físico (natação) sobre a atividade motora em camundongos *Swiss*. **Material e Métodos:** camundongos *Swiss* (18 animais) foram submetidos a tratamento com Clonazepam e exercício físico. Determinou-se a atividade motora através do teste de “Campo aberto”. **Resultados e Discussão:** o Clonazepam (0,033mg/Kg) combinado com o exercício físico (natação) provocou aumento expressivo da atividade motora dos camundongos, contrariando de alguma forma o fenômeno de habituação ao ambiente, provavelmente devido a mecanismos relacionados à plasticidade neuronal, tais como depressão em longo termo (LTD) e potenciação em longo termo (LTP), desencadeados provavelmente pelo influxo de cloreto, estimulado pela ação do Clonazepam. **Conclusões:** O Clonazepam (0.033mg/Kg) combinado com atividade física aumentou a atividade motora, provavelmente através de mecanismos de plasticidade neuronal.

Palavras-chave: Atividade motora. Plasticidade neuronal. Clonazepam.

ABSTRACT

The neural plasticity reflect the adaptation power of the nervous system, changes of neural excitability and metabolic function are physiological expressions of neural plasticity associated to the ionic distribution and neurotransmitters secretion, thus, changes in the somatic motor system's excitability (hypoactivity or hyperactivity) will be dependent of this parameters. **Objective:** To determine the action of different doses of clonazepam associated to the physical activity on the motor behavior. **Material and Methods:** The *Swiss* mice (18 animals) were treated with Clonazepam and physical activity (in the swimming pool). The motor activity was determined by the “Open Field” test. **Results and Discussion:** The increase in motor activities, associated with Clonazepam (0.033mg/Kg) and physical activities (swimming) may be explained by the neural plasticity mechanisms: long-term depressions (LTD) and long-term potentiation (LTP), associated with the chloride influx stimulated by clonazepam. This result is opposite to the normal habituation of animals. **Conclusions:** Clonazepam(0.033mg/Kg) associated with the physical activity strengthens the motor activity, probably through neural plasticity mechanisms.

Keywords: Motor activity. Neuronal plasticity. Clonazepam.

Autor correspondente: Wagner de Jesus Pinto, Univeridade Federal do Acre, Campus Universitário, BR 364, km 4, Distrito Industrial, Rio Branco, Acre, Brasil. CEP: 69920-900. Telefone: +55 68 3901-2648. E-mail: wagner.wjp@gmail.com

Conflito de interesses: Não há qualquer conflito de interesses por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 18 Set 2016; Revisado em: 01 Abr 2017; Aceito em: 01 Abr 2017.

INTRODUÇÃO

A excitabilidade neuronal e muscular tem relação direta com a correta distribuição de íons em ambas as faces da membrana celular.¹ A função motora somática pode ser mensurada através da relação matemática: dopamina/serotonina ou noradrenalina/serotonina.^{2,3} Qualquer interferência nessa distribuição iônica ou nas concentrações de neurotransmissores torna possível modular ou adaptar o nível de trabalho do sistema motor somático. A plasticidade neuronal através de seus vários mecanismos fisiológicos reflete a essência funcional do sistema nervoso e o poder adaptativo do mesmo, modificando constantemente a excitabilidade e metabolismo neuronal bem como o nível de neurotransmissores buscando adaptação.⁴ Entre os mecanismos de plasticidade neuronal encontramos a depressão em longo termo (LTD) e potenciação em longo termo (LTP), fenômenos estes que respondem a estimulações elétricas com baixas e altas frequências respectivamente nos centros nervosos.⁵ As sinapses glutamatérgicas e os receptores AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e NMDA (N-metil-D-aspartato)⁶ têm particular importância nessa cadeia de eventos. Os receptores AMP e NMDA são em essência canais iônicos, sendo o íon magnésio parte da estrutura do receptor NMDA bem como modulador de diferentes funções devido à oposição e possível bloqueio eletrostático do magnésio sobre íons com carga positiva.⁷

O Clonazepam, é um medicamento da família das benzodiazepinas, capaz de desencadear ações sedativas, ansiolíticas e anticonvulsivantes, dentre outras.⁸ Parece interagir com os receptores gabaérgicos tipo A, juntamente com o neurotransmissor inibidor ácido gama amino butírico (GABA) no sentido de aumentar a permeabilidade da membrana neuronal ao íon cloreto.⁸ Esta interação medicamento-receptor potencializa a ação do neurotransmissor e aumenta o influxo de cloreto (Cl⁻) gerando hiperpolarização⁸ nos neurônios e consequentemente alterando a excitabilidade da membrana neuronal. Desse modo, o Clonazepam potencializa as ações gabaérgicas.⁹

Portanto, a excitabilidade neural associada à liberação de neurotransmissores constituem dois componentes extremamente relevantes na função motora somática voluntária e involuntária.¹⁰ Esses parâmetros podem determinar a hipo ou hiperativação do sistema motor somático. Uma das formas de estudar a atividade motora e, portanto, o nível de excitabilidade do sistema motor em mamíferos (camundongos), é através do teste de “Campo aberto” que pode ser espontâneo e/ou induzido.¹¹ Essas provas também determinam o nível de ansiedade dos animais de experimentação dado que a atividade motora nos mamíferos depende dentre outros fatores do desejo ou necessidade de conhecer o “novo” ambiente e o medo de encarar uma “nova” situação ou nova realidade externa, o temor gera ansiedade e redução da atividade motora, muitas vezes até a imobilidade. Sendo assim, neste trabalho propõe-se um estudo da possível ação do Clonazepam e do exercício físico (natação), sobre a atividade motora em camundongos.

OBJETIVO GERAL

Estudar através de um modelo de atividade motora, a ação do Clonazepam combinado com o exercício físico sobre a excitabilidade do sistema motor em camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar a ação de diferentes doses de Clonazepam combinado com exercício físico (natação) sobre a atividade motora em camundongos *Swiss*;

b) Determinar a ação do exercício físico (natação) sobre a atividade motora em camundongos *Swiss*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Utilizou-se 18 camundongos machos *Swiss*, adultos jovens, entre 8 e 9 semanas de idade e massa corporal entre 30 e 45 gramas, fornecidos pelo Biotério do laboratório de Fisiologia farmacologia da Universidade Federal do Acre (UFAC). Os animais foram mantidos em regime de claro/escuro de 12/12 horas, com água e comida *ad libitum* bem como temperatura ambiental constante (25°C). Os grupos experimentais compostos por 6 animais cada, foram selecionados de maneira aleatória partindo do pré-requisito da homogeneidade da população e estratificação por massa corporal. Todos os animais foram manipulados segundo as normas do CONSEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) atendendo às normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAAC. Processo nº23107.014618/2014-78.

Preparação e administração do Clonazepam

A partir das doses utilizadas no ser humano e referidas nas bulas do medicamento construiu-se uma curva dose-resposta para adequar a dose a camundongos. Dissolveu-se 0,125mg de Clonazepam (Clozam/Laboratório Cristália/Brasil) em água destilada até o volume de 10 ml (aproximadamente 0.0125mg/mililitro). Foram administradas doses orais dessa solução de acordo com a Tabela 1. Aos animais pertencentes ao grupo controle foi administrada água destilada. O Clonazepam e a água destilada foram administrados por via oral. O Clonazepam foi administrado antes de iniciar o treino diário (atividade física durante os 5 dias). O treino na piscina realizou-se uma vez por dia durante 5 dias, da seguinte forma: um minuto nadando e um minuto de repouso, até atingir o minuto 5 do dia (total 5 minutos nadando e 5 minutos em repouso), este foi o primeiro bloco. Este esquema se repetiu 5 vezes no dia (25 minutos nadando e 25 minutos em repouso) e entre um bloco e outro realizou-se intervalos de 5 minutos de repouso. Este esquema repetiu-se durante 5 dias. As provas de “campo aberto” realizaram-se no sexto dia após iniciado o experimento (às 144 e 145 horas respectivamente).

Tabela 1. Esquema de tratamento: efeitos do Clonazepam e a natação sobre a atividade motora em camundongos.

GRUPO	TRATAMENTO	TREINO NA PISCINA	ATIVIDADE MOTORA		N
I	Clonazepam (0,033 mg/kg)	5 tempos de 5 min. cada	CA	CA	6
II	Clonazepam (0,066 mg/kg)	5 tempos de 5 min. cada	CA	CA	6
IIIc+ (controle)	Água destilada (0,30 ml)	5 tempos de 5 min. cada	CA	CA	6
<i>Tempo (min/horas)</i>		<i>0</i>	<i>60min</i>	<i>144h</i>	<i>145h</i>

Camundongos c+: controle positivo; mg/kg: miligramas/kg de peso corporal; min: minutos; CA: campo aberto; n: número de animais/grupo.

Determinação da atividade motora

A atividade motora foi determinada mediante o teste de “Campo aberto” que consiste em quantificar o deslocamento do animal em uma “caixa de conduta” construída em madeira com dimensões de 73x73cm² de área, 40 cm de altura e piso quadriculado (25 quadrados).¹² Por meio de observação visual e utilizando-se um cronômetro digital realizou-se a contagem do número de quadrados percorridos pelo animal de experimentação durante cinco minutos. O tempo de prova foi considerado a partir do momento em que o animal de experimentação foi colocado no centro do piso quadriculado da caixa de conduta.¹³

Estatística

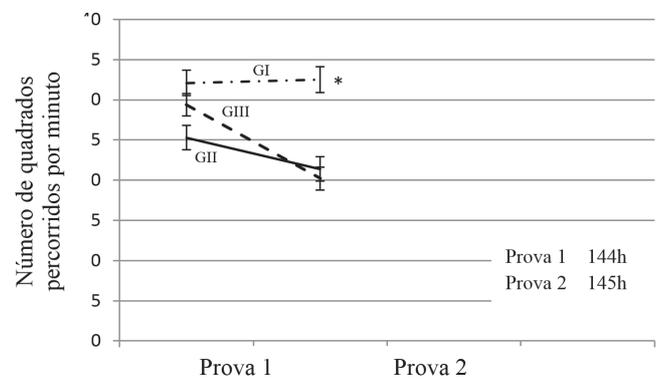
Foram realizados os testes de Mann Whitney (teste não paramétrico) e o teste *t* de Student (teste paramétrico) para amostras consideradas muito pequenas (n<8) e independentes com p<0,05.^{12,14} Para comprovar a distribuição normal dos valores obtidos utilizou-se a prova de *Shapiro-Wilk* com uma confiança de 95%. Os resultados foram expressos como “média aritmética grupal” e o “erro padrão da média”. Para considerar diferenças entre grupos, ambas as provas devem indicar diferenças estatísticas significativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade muscular esquelética é considerada a melhor situação geradora de uma resposta de alarme no organismo, já que, promove alterações funcionais em todos os sistemas orgânicos simultaneamente, aumentando o nível e eficiência da atividade funcional de todos eles em um tempo relativamente curto. Esta situação é extremamente importante na “plasticidade neural”.¹⁴ De fato, verifica-se aumento no número e complexidade das sinapses neurais e processos sofrem estimulação como, por exemplo, a potenciação (LTP) e depressão (LTD) em longo prazo.¹⁵ De acordo com a Figura 1, o Grupo I, que recebeu Clonazepam (0,033mg/Kg de peso) e que foi submetido a exercício físico (natação) durante 5 dias consecutivos, mostrou a mesma atividade motora (campo aberto) em ambos os tempos de prova demonstrando assim, que longe de uma queda na atividade motora na segunda prova, exibe discreta tendência ao aumento. Essa resposta reflete a estabilidade motora ao longo do experimento, fato que se corresponde com a velocidade

de decrescimento da atividade motora (mensurada através da tangente do ângulo da curva que indica a redução da atividade motora, entre provas). O Grupo III (controle positivo) mostrou queda mais expressiva na atividade motora na segunda prova quando comparado com o Grupo I, portanto, a velocidade de decrescimento foi maior estatisticamente se comparado com o Grupo I, fato este, que pode ser explicado principalmente através do fenômeno de habituação. Já o Grupo II que recebeu Clonazepam 0,066mg/Kg de peso, mostrou velocidade de decrescimento maior estatisticamente significativa em relação ao Grupo I e se comportou estatisticamente igual em relação à velocidade de decrescimento, quando comparado com o Grupo IIIc+, evidenciando a habituação biológica junto à “possível” ação de uma dose maior de Clonazepam.

Figura 1. Perfil da atividade motora (campo aberto) dos Grupos I, II e III.



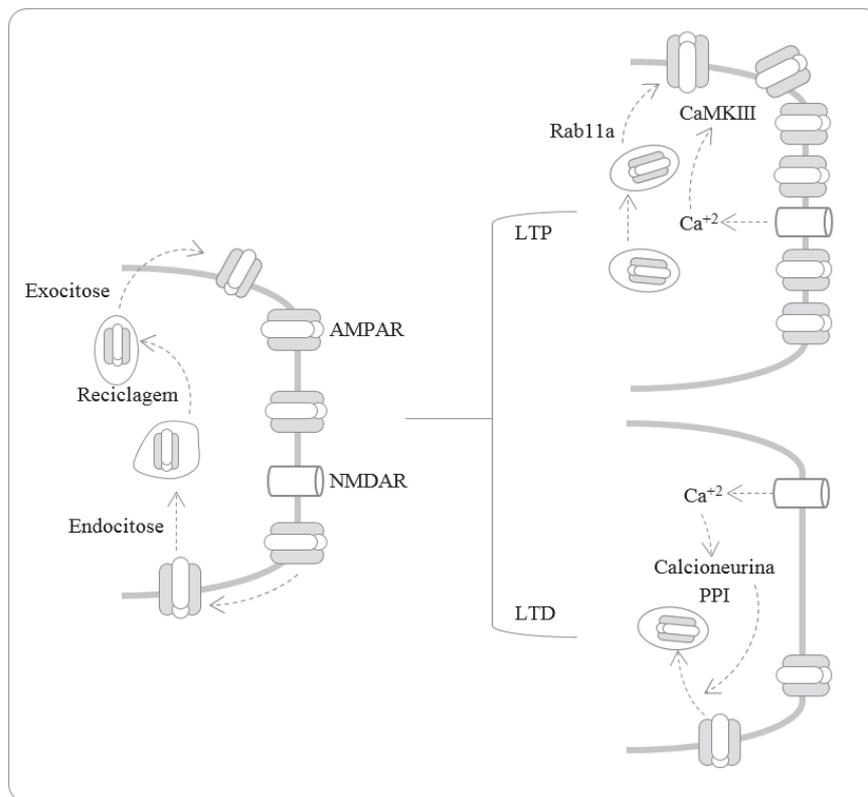
Nota: grupos I e II tratados com Clonazepam e submetidos a atividade física (natação). Grupo III tratado com água destilada e submetidos a atividade física (controle). Estão representados a média e o erro padrão da média dos quadrados percorridos/minuto. (*): Diferença estatisticamente significativa.

No Grupo IIIc+ o exercício físico parece não ter modificado a queda da atividade motora dos animais, indicando que os mecanismos fisiológicos envolvidos em dita atividade motora natural (habituação) parecem não interferir com as respostas fisiológicas desencadeadas pelo exercício físico de modo que, provavelmente, o comportamento desse grupo responde à conduta biológica do animal em relação à habituação ao ambiente.¹² Os resultados do Grupo I mostram que a conduta dos animais se afasta da conduta biológica,

exibindo maior atividade motora.¹⁰ A maior atividade motora pode estar relacionada com o aumento na síntese e liberação de neurotransmissores tais como dopamina, noradrenalina, acetilcolina, nas fendas sinápticas, associada à maior frequência de potenciais de ação deflagrados, refletindo em maior resposta muscular. Essa cadeia de eventos poderia estar relacionada também a processos funcionais de plasticidade neuronal,^{14,15} denominados depressão em longo prazo ou LTD (*Long term depression*) e potenciação em longo prazo ou LTP (*Long term potentiation*),¹⁴ processos típicos que ocorrem quando se estimula eletricamente com baixa e elevada frequência um centro nervoso (Figura 2). O LTD é considerado um mecanismo de plasticidade neuronal, caracterizando-se por queda parcial na atividade do centro nervoso. Subsequente

a esse fenômeno, tem-se comprovado o surgimento de uma resposta compensatória, o LTP, também considerado como um mecanismo de plasticidade neuronal, caracterizando-se por atividade neuronal bem maior e compensadora da LTD. A participação dos receptores AMPA e NMDA nestes mecanismos é fundamental. O exercício físico provoca aumento do número e complexidade das sinapses neuro-neuronais, bem como dos processos funcionais associados a estas sinapses como parte dos mecanismos adaptativos do sistema nervoso.¹⁴ Por outro lado, o Clonazepam por meio dos receptores gabaérgicos tem ação oposta, já que potencializa o influxo de Cl⁻ ao interior dos neurônios, conduzindo a célula à hiperpolarização e, portanto, depressão da atividade elétrica neuronal.

Figura 2. Potenciação em longo prazo (LTP) e Depressão em longo prazo (LTD).



Nota: na LTP os receptores AMPA migram em direção da fenda sináptica, tornando a sinapse mais eficiente. Na LTD os receptores AMPA migram se afastando da fenda sináptica reduzindo a resposta celular, o receptor AMPA é de fato um canal de sódio.

Dessa forma, a depressão (LTD), seguida de potenciação (LTP) nos centros nervosos poderia ter sido influenciada e reproduzida de alguma forma por meio da utilização de Clonazepam (0,033mg/Kg de peso) e a possível hiperpolarização ocasionada por ele, de tal forma que no Grupo I permanece constante a atividade motora entre provas (144-145 horas), sendo estatisticamente diferente se comparado com o Grupo III (controle positivo). Nesse caso, o Clonazepam não contribuiu com a redução da atividade motora provavelmente por ter potencializado de alguma forma o processo de LTP. A plasticidade neuronal explica a capacidade adaptativa do sistema nervoso central, e provavelmente o treino diário

(natação) pode ter facilitado a formação de novas sinapses que finalmente aperfeiçoaram a capacidade adaptativa do sistema motor. Esses mecanismos devem ter ocorrido tanto no Grupo I quanto no Grupo III. A diferença de respostas fisiológicas entre esses dois grupos poderia, portanto, ser atribuída à depressão inicial, talvez gerada pelo influxo de Cl⁻ no Grupo I seguida da potenciação funcional nas estruturas do sistema motor (LTP). Resultados similares a estes foram obtidos utilizando este esquema de tratamento nas atividades de aprendizado e memória (dados não publicados). O Grupo II que recebeu 0,066mg/kg de peso corporal de Clonazepam, também submetido ao treino durante cinco dias (natação), mostrou

resultados na atividade motora intermediários entre o Grupo I e o Grupo IIIc+, de modo que, provavelmente, o exercício físico tenha induzido aumento da eficiência do sistema motor neste grupo (plasticidade neuronal) expressando essa resposta através da tendência maior à atividade motora com base na despolarização e ativação neuronal. Por outro lado, a maior dose de Clonazepam, parece ter sido decisiva para a tendência à hiperpolarização do próprio sistema motor e provavelmente é por essa razão que o Grupo II se afasta do Grupo I e se aproxima mais ao Grupo III, com relação, claro, à atividade motora aferida mediante a prova de campo aberto.

REFERÊNCIAS

1. Silva AS, Souza IL, Silva BA. Canais iônicos na epilepsia. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2014;47(4):370-6.
2. Barbosa FT, Barbosa LT, Cunha RM, Gonçalves GP, Souza DA. Uso do sulfato de Mg+2 por via intravenosa e nebulização para tratamento de asma aguda na emergência. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2007;19(3):369-73.
3. Nielsen FH, Lukaski HC. Update on the relationship between magnesium and exercise. *Magnes Res*. 2006;19(3):180-9.
4. Shaffer J. Neuroplasticity and clinical practice: building brain power for health. *Front Psychol*. 2016;7(1118):1-12.
5. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6):1-15.
6. Gunderson V, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. Neuroglial Transmission. *Physiol Rev*. 2015;95(3):695-726.
7. DeRossi R, Pompermeyer CT, Silva-Neto AB, Barros AL, Jardim PH, Frazilio FO. Sulfato de Mg+2 prolonga a analgesia epidural lombosacral induzida pela quetamina em carneiros. *Acta Cir Bras*. 2012;27(2):137-43.
8. Cui Y, Xu H, Chen FM, Liu JL, Jiang L, Zhou Y, et al. Efficacy evaluation of clonazepam for symptom remission in burning mouth syndrome: a meta-analysis. *Oral Dis*. 2016;22(6):503-11.
9. Sankar R. GABA(A) receptor physiology and its relationship to the mechanism of action of the 1,5-benzodiazepine clobazam. *CNS Drugs*. 2012;26(3):229-44.
10. Straka H, Simmers J, Chagnaud BP. A new perspective on predictive motor signaling. *Curr Biol*. 2018;28(5):R232-R43.
11. Buznego Rodriguez MT, Peña AC, Sarria EG, Cuéllar AC, Pérez-Saad H. Efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. *Rev Cubana Plant Med*. 2005;10(2):1-10.
12. Fernandez Urquiza F, Rodríguez Treto R, Torres Fuentes M, Oliva Igarza ME, Pérez Farinas C, Bacallao González M. Características químico-farmacéuticas y propiedades farmacológicas de extractos de *Musa Sp ABB* (plátano burro). *Rev Cubana Plant Med*. 1997;2(2):40-4.
13. Bento JA, Tormena RA, Araujo SR, Silva AL. Comportamento motor, sob estímulo farmacológico, de segmentos duodenais pré e pós-papilar de ratos albinos. *Acta Cir. Bras*. 1998;13(2).
14. Lecrux C, Hamel E. Neuronal networks and mediators of cortical neurovascular coupling responses in normal and altered brain states. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016;5(371):1705-10.
15. Oliva AD, Dias GP, Reis RA. Plasticidade sináptica: natureza e cultura moldando o self. *Psicol Reflex Crít*. 2009;22(1):128-35.

CONCLUSÕES

Tendo em conta as doses administradas aos animais experimentais e o modelo animal utilizado para realizar as determinações, pode-se concluir que: o Clonazepam (0,033 mg/kg de peso) combinado com atividade física (natação) potencializou a atividade do sistema motor provavelmente através dos mecanismos de plasticidade neuronal. Parece que a atividade física (natação) não interfere com os mecanismos fisiológicos envolvidos no fenômeno de habituação ao ambiente.

Como citar:

Treto RR, Cunha RM, Pinto WJ, Souza MN, Gutierrez LA. Atividade motora em camundongos *Swiss* submetidos a treino físico (natação) combinado ou não com Clonazepam. *Rev Med UFC*. 2018 abr-jun;58(2):9-13.