

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**SISTEMA COLINÉRGICO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
DE RATOS TRATADOS COM SULFATO DE
VINCRISTINA E DECANOATO DE NANDROLONA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Danieli Brolo Martins

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**SISTEMA COLINÉRGICO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE
RATOS TRATADOS COM SULFATO DE VINCRISTINA E
DECANOATO DE NANDROLONA**

por

Danieli Brolo Martins

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2008

Martins, Danieli Brolo, 1981-

M386s

Sistema colinérgico e peroxidação lipídica de ratos tratados com sulfato de vincristina e decanoato de nandrolona / por Danieli Brolo Martins ; orientador Sonia Terezinha dos Anjos Lopes. – Santa Maria, 2008.
86 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2008.

1. Medicina veterinária 2. Esteróide anabólico androgênico 3. Quimioterápico 4. Acetilcolinesterase 5. Peroxidação lipídica 6. Ratos I. Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos, orient. II. Título

CDU: 619

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

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

**SISTEMA COLINÉRGICO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE RATOS
TRATADOS COM SULFATO DE VINCRISTINA
E DECANOATO DE NANDROLONA**

elaborada por
Danieli Brolo Martins

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dra.
(Presidente/ Orientadora)

Maria Rosa C. Schetinger, Dra. (UFSM)

Lissandra Dal Lago, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2008.

DEDICATÓRIA

À querida Vó Flor,
pela sua incessante
vontade de viver.
Gostaria muito que
meu trabalho a ajudasse
de alguma forma...

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus.

À minha família.

Aos queridos vô Lídio e vó Flor, dois seres essenciais para minha formação pessoal. Amo vocês!

Ao Demetrius, uma pessoa ausente e ao mesmo tempo tão presente... Obrigada pelo apoio constante. Você me faz querer ir além.

À minha amiga e orientadora, Profa. Sonia, por acreditar em mim. Sou grata pela oportunidade, pelas conversas, pelos conselhos, pelos elogios, pelos puxões de orelha... A senhora sabe que tem cadeira cativa em meu coração!

À equipe do LACVET, seus funcionários, pós-graduandos, bolsistas, estagiários e residente pela imensa colaboração nesta caminhada. Deixo de citar nomes, por medo de esquecer alguém! Mas quem ajudou, sabe, meu MUITO OBRIGADA!

À equipe do LACE pela amizade e companheirismo. Em especial, ao prof. Mazzanti por possibilitar o uso do Bloco 6 para os experimentos, a Débora, por abraçarmos um desafio juntas (e ter dado certo!), ao Fabiano, Graziela, Guilherme, Thiago, Priscilla, Francieli, Laetícia, Bia... e tantos outros...

Ao pessoal da Bioquímica Toxicológica, mais ainda à amiga Cinthia, Profa. Maria Rosa e Profa. Vera. Sempre lembrarei daqueles nossos inúmeros dias no lab, com muitas caixas, reagentes e... ratos!

Ao pessoal da Hemato-Oncologia (HUSM), por possibilitarem meu estágio e parte de meus experimentos, em especial à Liliane, Valússia e Alice.

À amiga Nice por suas palavras, mais do que sábias, capazes de iluminar a mente e apaziguar o coração. Ao colega Roberto pelo grande apoio (além do ótimo livro de quimio!). E também à amiga Ângela pela valiosa ajuda!

À Bichón mais linda do mundo, Eva, por fazer bagunça na casa e me trazer incansáveis vezes a bolinha enquanto eu estava no PC, fazendo-me lembrar de que eu não estava sozinha naqueles momentos de cursinho, faculdade e mestrado!

Aos funcionários e amigos do Hospital Veterinário Universitário.

À CAPES pela bolsa. À UFSM e ao PPGMV pela tão sonhada oportunidade!

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.
Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente,
erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo.
Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência.
Tudo passa e tudo se renova na terra,
mas o que vem do céu permanecerá.
De todos os infelizes os mais desditosos são os
que perderam a confiança em Deus e em si mesmo,
porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo.
Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve.
Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite.
Hoje, é possível que a tempestade te amarfane o coração
e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição
ou ameaçando-te com a morte.
Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.

Chico Xavier

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SISTEMA COLINÉRGICO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE RATOS TRATADOS COM SULFATO DE VINCRISTINA E DECANOATO DE NANDROLONA

AUTORA: DANIELI BROLO MARTINS

ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2008.

O sulfato de vincristina é um agente anti-tumoral bastante usado na oncologia clínica de pequenos animais, porém seus efeitos colaterais incluem citotoxicidade medular e neuronal. O decanoato de nandrolona, um esteróide anabólico androgênico (EAA), tem sido usado em associação a este medicamento para amenizar alguns de seus efeitos, como a mielossupressão moderada. Esta dissertação apresenta dados referentes ao uso isolado ou associado do sulfato de vincristina e do decanoato de nandrolona, seus efeitos no sistema colinérgico e no perfil oxidativo de ratos Wistar. Primeiramente, verificou-se quatro diferentes doses do EAA, por três semanas, e sua ação sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em quatro partes do tecido cerebral (cerebelo, estriado, hipocampo e córtex cerebral). O segundo experimento apresenta grupos tratados durante duas semanas com sulfato de vincristina e/ou decanoato de nandrolona e as ações destes no cérebro (mesmas partes pesquisadas anteriormente) e no sangue, através da mensuração da atividade enzimática da AChE cerebral e eritrocitária (RBC-AChE) e peroxidação lipídica cerebral e sérica. As duas doses mais altas utilizadas no primeiro trabalho aumentam a atividade da enzima, sugerindo que haja interferência no sistema colinérgico, no estriado e no cerebelo. Os resultados obtidos, no estudo posterior, demonstram que o uso isolado deste EAA e suas associações com o sulfato de vincristina alteram a ação da AChE cerebral e RBC-AChE, tanto de forma estimulatória quanto inibitória. A peroxidação lipídica, cerebral e sangüínea, aumenta devido ao uso isolado da vincristina e do decanoato de nandrolona, e na associação do quimioterápico com a dose mais alta usada do éster. A dose terapêutica do decanoato de nandrolona e a vincristina utilizadas são capazes de neutralizar a produção de radicais livres tanto no cérebro quanto no soro sangüíneo. A atividade da RBC-AChE e o valor do perfil oxidativo do soro apresentados nesta pesquisa são similares àqueles exibidos pelo tecido cerebral. Diante destes dados, pode-se concluir que o decanoato de nandrolona é capaz de influenciar a atividade da AChE, afetando o sistema colinérgico, o que poderia ocasionar em uma ação alterada do seu neurotransmissor, além de uma baixa ou alta estimulação dos receptores pós-sinápticos. Entretanto, o uso da dose terapêutica estudada deste EAA associada à vincristina mostra-se benéfico, pois poderia proteger o organismo de processos prejudiciais relacionados a produção de radicais livres.

Palavras-chave: esteróide anabólico androgênico; quimioterápico; acetilcolinesterase; peroxidação lipídica; ratos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF CHOLINERGIC SYSTEM AND LIPID PEROXIDATION OF RATS TREATED WITH VINCRIStINE SULPHATE AND NANDROLONE DECANOATE

AUTHOR: DANIELI BROLO MARTINS
ADVISOR: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Date and place of defence: Santa Maria, February, 22nd, 2008.

Vincristine sulphate is antitumor agent widely used in small animal clinical oncology; therefore it can cause a number of adverse effects including marrow and neuronal cytotoxicity. Nandrolone decanoate, an anabolic-androgenic steroid (AAS), has been used in association with vincristine in order to ease effects such as moderate myelosuppression. The present dissertation presents data related to the isolated or associated employment of vincristine sulphate and nandrolone decanoate, as well as their effects on the cholinergic system and oxidative profile of Wistar rats. The animals were submitted to four different doses of AAS for three weeks and its action on acetylcholinesterase (AChE) activity in four different structures of brain tissue (cerebellum, hippocampus, striatum and cerebral cortex) was studied. The second experiment shows the effects of vincristine and/or nandrolone decanoate in the brain (same parts studied previously) and blood through measurement of brain and red blood cell AChE (RBC-AChE) enzyme activity as well as brain and blood serum lipid peroxidation of rats treated for two weeks. Results show that the two highest doses used in the first experiment increased enzyme activity, suggesting interference in the cholinergical system of the striatum and cerebellum. The results obtained in the latter experiment demonstrate that the isolated use of this AAS and its association with vincristine sulphate altered brain and RBC-AChE action, both in a stimulatory and inhibitory fashion. Lipid peroxidation, in the brain and blood, increased due to the isolated use of both vincristine and nandrolone decanoate, as well as to their associated use at the highest dose of ester used. Furthermore, the data show that the association between the therapeutic dose of nandrolone decanoate and vincristine is capable of neutralizing the free radical production induced by their isolated use in brain and blood serum. Serum RBC-AChE activity and the oxidative profile presented in this study are similar to those exhibited for brain tissue. Based on these data, it can be concluded that nandrolone decanoate is capable of interfering in AChE activity, affecting the cholinergic system, which could cause an alteration of its neurotransmitter, as well as a low or high stimulation of post-synaptic receptors. Therefore, the use of the therapeutic dose of AAS studied here in association with vincristine has been shown to be beneficial, as it could protect the organism from damaging processes caused by the production of free radicals.

Key words: anabolic androgenic steroid; chemotherapeutic; acetylcholinesterase; lipid peroxidation, rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Decanoato de Nandrolona.....	14
2.2 Sulfato de Vincristina.....	16
2.3 Sistema Colinérgico.....	18
2.4 Peroxidação Lipídica.....	24
3 MANUSCRITOS.....	27
3.1 Decanoato de nandrolona na atividade da acetilcolinesterase de ratos Wistar	28
3.1.1 Resumo.....	28
3.1.2 Introdução.....	29
3.1.3 Materiais e Métodos.....	32
3.1.4 Resultados e Discussão.....	32
3.1.5 Conclusão.....	35
3.1.6 Abstract.....	35
3.1.7 Agradecimentos.....	36
3.1.8 Comitê de Ética.....	36
3.1.9 Referências Bibliográficas.....	37
3.2 Evaluation of cholinergic system and lipid peroxidation of rats treated with vincristine sulphate and nandrolone decanoate.....	46

3.2.1 Abstract.....	47
3.2.2 Introduction.....	48
3.2.3 Material and Methods.....	50
3.2.4 Results and Discussion.....	52
3.2.5 Conclusion.....	56
3.2.6 Acknowledgements.....	57
3.2.7 Sources and Manufacturers.....	57
3.2.8 References.....	57
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
5 CONCLUSÕES.....	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Dentre os medicamentos estimulantes da medula óssea, mais utilizados na Medicina Veterinária, pode-se citar o Decanoato de Nandrolona (DN), cuja eficácia para animais domésticos é pouco estudada (PEREZ et al., 2005). É um esteróide anabólico androgênico (EAA), proveniente da testosterona, e possui vasta utilização médica (BASARIA, 2001). Seu uso é citado em tratamentos de pacientes humanos e animais, como nos casos de anemias, queimaduras, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LUKAS, 1993), quimioterapias (PEREZ et al., 2005), algumas doenças crônicas como a doença pulmonar obstrutiva (SCHOLS, 2003) e, na estimulação de células-tronco pluripotentes (BHASIN et al., 2003). É uma opção terapêutica alternativa, especialmente para pacientes com escassos recursos econômicos (CUSUMANO et al., 1996). Porém, quando utilizadas indiscriminadamente, os EAA apresentam inúmeros efeitos colaterais de curto, médio e longo prazo (VIEIRA, 2003).

A vincristina é um quimioterápico que integra o grupo dos alcalóides vegetais. Os alcalóides da Vinca também são chamados de inibidores de mitose. Esses fármacos atuam impedindo a formação dos microtúbulos, estruturas responsáveis pela polarização dos cromossomos, evento indispensável no processo de divisão celular (RODASKI & NARDI, 2006). Seu uso é bastante comum na clínica médica de pequenos animais, principalmente no tumor venéreo transmissível canino (TVTC) (ROGERS et al., 1998; NAK et al., 2005). Os efeitos colaterais causados pela vincristina em cães incluem citotoxicidade não seletiva que resulta em mielossupressão moderada (tanto de eritrócitos quanto leucócitos), anorexia, distúrbios intestinais, alopecia (NAK et al., 2005), necrose (extravasamento tecidual) (VILLALOBOS, 2006), e neurotoxicidade (HAMILTON et al., 1991; CUDDON, 2002). Pela possibilidade desta substância causar depressão medular, o que limita o tratamento anti-neoplásico, estudos têm sido propostos para o uso de estimulantes de medula óssea, como o DN (PEREZ et al., 2005; LUCIDI & TAKAHIRA, 2007).

A duração do efeito de vários medicamentos é dependente de sua quebra por enzimas hidrolíticas endógenas, tais como a acetilcolinesterase (AChE - E.C. 3.1.1.7). Esta enzima participa da inativação de diversos xenobióticos, tais como

ésteres e alcalóides de plantas (McGEHEE et al, 2000). A AChE é a principal enzima da transmissão colinérgica e tem um papel vital no sistema nervoso central (SNC) e junções neuromusculares por hidrolisar o transmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas (MASSOULIÉ et al., 1999). Por outro lado, a mensuração da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária (RBC –AChE) pode funcionar como um bom marcador periférico para estudar desordens neurotóxicas, pois permite sua mensuração através de métodos mais acessíveis verificar o comportamento desta enzima no SNC (BERNHARDI et al., 2005).

A peroxidação lipídica ocorre nas células e tecidos devido a uma produção aumentada de radicais livres e/ou uma falha nos sistemas antioxidantes (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Também é considerada um evento fisiopatológico importante na toxicidade por fármacos, como os anti-neoplásicos e EAA (BRAUGHLER et al., 1987). Este processo é resultado do ataque de radicais livres aos fosfolipídios da membrana celular, o que pode afetar neurônios e células da glia (OLBY, 1999).

O acesso a uma melhor qualidade de vida, permite que os pequenos animais vivam mais tempo junto a seus proprietários. Porém, soma-se a isso, o aparecimento de doenças mais comuns na fase geriátrica, como o câncer. Assim, há a necessidade de constantes estudos sobre os medicamentos quimioterápicos, como o sulfato de vincristina, e seus efeitos, bons ou ruins, ao organismo. Da mesma forma, é interessante o estudo da interação de fármacos que possam ser usados concomitantemente a este tipo de tratamento, como no caso do decanoato de nandrolona. Assim, este trabalho pretende avaliar diferentes doses do DN (subdose, dose terapêutica, e supra-doses) no sistema colinérgico, bem como, a ação do uso isolado e combinado do DN e da vincristina no sistema colinérgico e no perfil oxidativo. Poucas foram as pesquisas sobre o uso isolado ou combinado do DN e da vincristina e sua ação nos diferentes sistemas e/ou órgãos. Nenhuma publicação foi encontrada, até o presente momento, relacionando o efeito de tais substâncias ao sistema colinérgico e peroxidação lipídica cerebral e sangüínea, ou seja, há falta de informações nesta área tanto na Medicina Veterinária quanto na Humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Decanoato de Nandrolona

Os esteróides anabólico-androgênicos (EAA) são um grupo de compostos naturais e sintéticos formados pela testosterona e seus derivados (LISE et al., 1999; CUNHA et al., 2006). De acordo com CLARK & HENDERSON (2003) há três classes principais de EAA, conforme a estrutura anatômica. A primeira é chamada de ésteres da testosterona, a segunda de derivados da 19-nor-testosterona, no qual está incluído o decanoato de nandrolona (DN), e a terceira classe conhecida como derivados do 17 α -alquila.

A testosterona é sintetizada desde 1935. Seu uso tornou-se mais intenso durante a 2^a Guerra Mundial, quando os soldados alemães a utilizavam para ficarem mais agressivos. Seu uso terapêutico até esta época restringia-se ao tratamento de pacientes queimados, deprimidos ou em recuperação de grandes cirurgias (GHASPERY, 1995). Em 1939, sugeriu-se que a administração dos EAA poderiam melhorar o desempenho dos atletas. A popularidade destes medicamentos, com a finalidade não-terapêutica, surgiu a partir da década de 1960 (GHASPERY, 1995; LISE et al., 1999). Porém, recentemente as ciências da saúde vêm redescobrando o DN e suas aplicações médicas (BASARIA et al., 2001).

O DN é formado pela união da nandrolona com o ácido decanóico. Esta conformação o faz aceitável para uso parenteral. Após a aplicação, o fármaco é hidrolisado por uma esterase em nandrolona novamente (Figura 2.1.1). Sua administração intramuscular permite uma liberação gradual à corrente sangüínea. Sua disponibilidade no músculo é de aproximadamente seis dias, e no sangue sua meia-vida é bem mais curta. Contudo, seus efeitos permanecem no organismo por três semanas (MINTO et al., 1997; FAAS, 2002 *apud* LINDQVIST, 2004).

As substâncias ativas originárias da testosterona atravessam a membrana celular e ligam-se com alta especificidade e baixa afinidade a receptores citoplasmáticos para esteróides. O complexo, droga-receptor, é translocado para o núcleo e liga-se à cromatina, induzindo a transcrição do RNA e a produção de proteínas específicas, ocasionando, então, seus efeitos (WILSON, 1996).

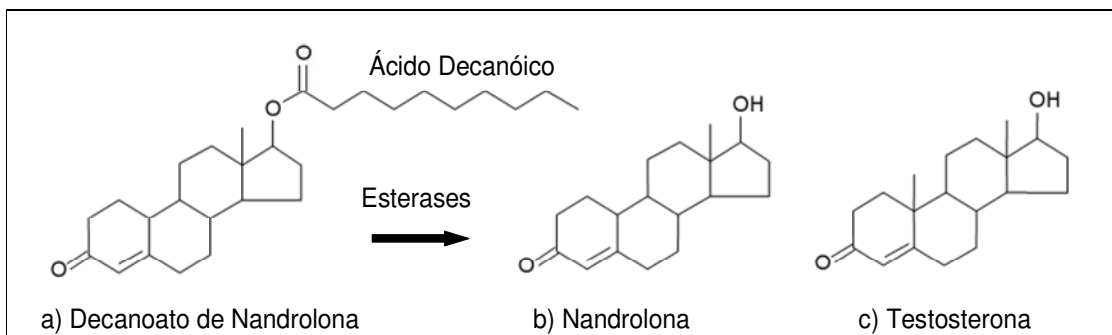


Figura 2.1.1 - Estruturas químicas esteroidais. a) decanoato de nandrolona (DN), b) as esterases fazem a hidrólise o DN a androlona somente (há a perda do ácido decanóico), e c) comparação com a fórmula estrutural da testosterona. (Adaptado de LINDQVIST, 2004).

O DN é citado em tratamentos de pacientes humanos e animais, e pode ser utilizado em diversos casos. Auxilia pacientes com insuficiência renal aguda, com conseqüente redução das sessões de diálise (LISE et al., 1999; SHEASHAA et al., 2005), no câncer de mama (como anti-estrógeno) (BASARIA et al., 2001), na osteoporose, por diminuir a dor óssea (VANDERSCHUEREN et al., 2004), e resulta em ganho de peso na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (CUERDA et al. 2005). Outras situações incluem: queimaduras (LINDQVIST, 2004), distúrbios urinários (NELSON & COUTO, 2006), algumas doenças crônicas como a doença pulmonar obstrutiva (SCHOLS, 2003), estimulação de células-tronco pluripotentes (BHASIN et al., 2003) e, interage com o crescimento e a resistência celular, promovendo a regeneração de diversos tipos de tecido (LARSSON et al., 2002).

Nos pacientes acometidos por câncer, o DN é usado para reverter a caquexia presente nesta patologia em fases mais avançadas. Também estimula a medula óssea (MO) a produzir novas células sangüíneas (SAITOH et al., 1999; BAGCHUS et al., 2005), principalmente nos casos em que há supressão medular leve a moderada, como a causada pela vincristina (PEREZ et al., 2005). Sua ação ocorre pelo aumento na produção de eritropoetina e, age de forma direta, nos mais diversos tipos de progenitores hematopoéticos da MO (SAITOH et al., 1999).

Entretanto, doses elevadas dos EAA podem acarretar vários efeitos não-desejáveis tais como alterações hepáticas e do metabolismo lipídico, problemas prostáticos, atrofia testicular, bem como, doença cardiovascular, náusea e cefaléia (CUNHA et al., 2006; MELNIK et al., 2007). No cérebro, os EAA podem prejudicar a

formação de células-tronco neurais (BRÄNNVALL et al., 2005), o sistema neuroendócrino (HUGHES JR et al., 1998) e a densidade dos receptores dopaminérgicos (KINDLUNDH et al., 2001).

2.2 Sulfato de vincristina

O sulfato de vincristina é um quimioterápico, feito a partir das folhas da planta Vinca Rósea (*Catharanthus roseus*) (Figura 2.2.1) (RODASKI & NARDI, 2006). É de uso comum na clínica de pequenos animais (PEREZ et al., 2005). Sua utilização é válida em doenças como o tumor venéreo transmissível canino (TVTC) (ROGERS et al., 1998; NAK et al., 2005), linfomas (PONCÉ et al., 2004), leucemias (RODASKI & DE NARDI, 2006) e nefroblastoma renal (SEAMAN & PATTON, 2003).

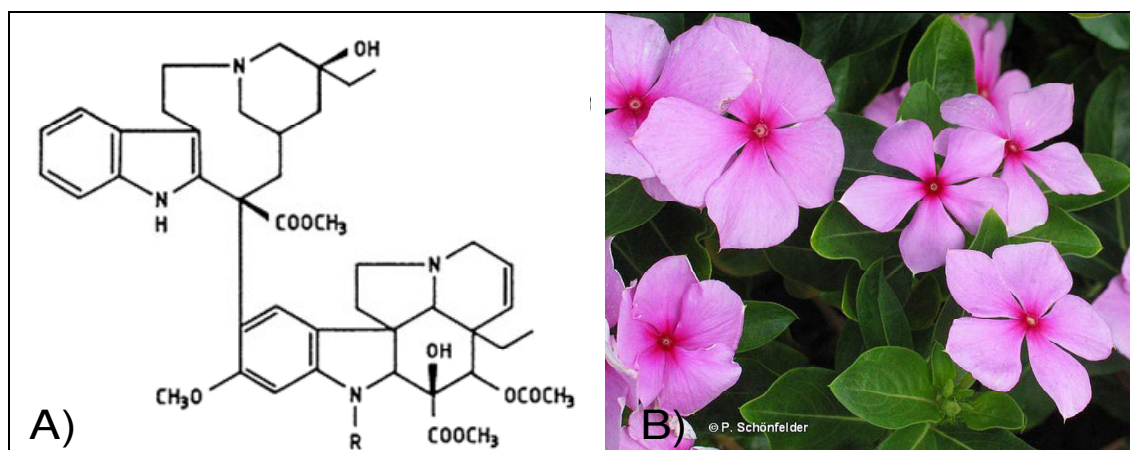


Figura 2.2.1 - Sulfato de Vincristina. A) estrutura química do sulfato de vincristina, e B) planta que dá origem ao medicamento, conhecida como Vinca Rósea (*Catharanthus roseus*).

Em Medicina Humana, a vincristina é mais usada, e mostra-se mais efetiva, na oncologia pediátrica do que em adultos com câncer. Os tumores de crianças parecem ter um maior nível de sensibilidade ao medicamento, fazendo com que a tolerância infantil a altas doses de vincristina seja melhor do que em pessoas de mais idade (GIDDING et al., 1999).

A seleção do protocolo medicamentoso adequado para cada paciente é um ponto crítico para o sucesso do tratamento anti-tumoral (McKNIGHT, 2003). A

vincristina como único agente quimioterápico é capaz de induzir a total remissão do TVTC na maioria dos casos (NARDI et al., 2002; NAK et al., 2005), enquanto que em certos sarcomas seu uso deve ser combinado a outros fármacos para uma resposta mais satisfatória (RODASKI & DE NARDI, 2006; CAVE et al., 2007).

Os integrantes da categoria alcalóides da Vinca são chamados de inibidores de mitose, pois são fármacos de ciclo celular específicos, atuando exclusivamente sobre células as em mitose (fase M) (RODASKI & NARDI, 2006), promovendo ruptura do fuso mitótico (ANDRADE, 2002). Ao impedir a metáfase, a vincristina impede a segregação correta dos cromossomos durante a mitose, levando à morte celular (RODASKI & NARDI, 2006). Após aplicação, esse citostático tem rápida distribuição pelo organismo, em especial, nos tecidos ricos em tubulina (onde promove rompimento de microtúbulos – Figura 2.2.2), leucócitos e plaquetas. No rato, a vincristina e/ou seus metabólitos são excretados rapidamente pelas fezes e em grau mais lento pela urina (CASTLE et al., 1976).

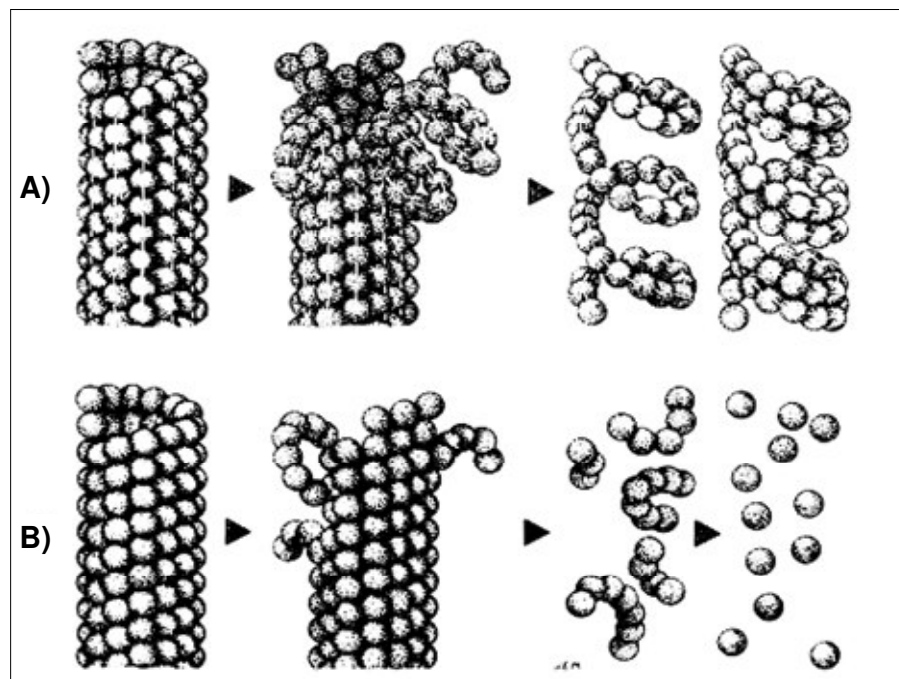


FIGURA 2.2.2 – Modelo proposto de rompimento dos microtúbulos induzido pela vincristina. A) Microtúbulo maior contendo microtúbulos menores associados a proteínas (MMAP), representados pelas linhas brancas curtas verticais entre as subunidades. B) Microtúbulo maior sem MMAP (Adaptado de DONOSO et al., 1979).

Em 1958, NOBLE (*apud* GIDDING et al., 1999) publicou trabalho onde certas frações da Vinca Rósea em ratos resultava em granulocitopenia e supressão medular. A vincristina pode causar diversos efeitos colaterais, entre eles encontram-se: mielossupressão (discreta), parestesia, anorexia e neuropatia periférica (ANDRADE, 2002) e mais raramente central. A toxicidade no sistema nervoso central (SNC) é descrita em pacientes que são tratados com altas doses acidentais do fármaco ou em casos de quebra da barreira hemato-encefálica (WHITTAKER et al., 1973; MAEDA et al., 1987). A potencialidade da mielossupressão é aumentada com o uso concomitante de L-asparaginase (RODASKI & NARDI, 2006) e, o efeito neurotóxico parece aumentar com a associação de itraconazol (BÖHME et al., 1995). No entanto, há raros dados na literatura sobre a interação deste alcalóide aos esteróides, como o DN, nos diferentes sistemas do organismo (PEREZ et al., 2005).

Estudando a influência da vincristina no hipotálamo de coelhos, percebeu-se que os neurônios foram as primeiras células afetadas e de modo bastante severo. Observaram-se nos axônios lesados, degeneração das conexões sinápticas e mudanças secundárias nas bainhas de mielina. Também foi proposto que a indução de apoptose pelo quimioterápico poderia resultar em insulto nervoso, pois vários elementos apoptóticos típicos foram ingeridos pelas células da glia (MUZYLAK & MASLINSKA, 1992). A indução de neurotoxicidade pela vincristina é causada pela interferência com a função microtubular resultando em bloqueio do transporte axonal, acarretando assim, em degeneração (DONOSO et al., 1979; GIDDING et al., 1999). O conhecimento das toxicidades conseqüentes de uma droga anti-tumoral são de fundamental importância, pois auxilia na identificação e no tratamento de suas manifestações. Além disso, há a possibilidade de prevenir sinais indesejáveis, garantindo o bem-estar do animal (NORRIS & WITHROW, 1984; McKNIGHT, 2003).

2.3 Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico tem um papel fundamental em várias funções vitais, como o aprendizado, a memória e a organização cortical do movimento, o que faz deste sistema, atualmente, alvo de inúmeras pesquisas (MESULAM et al., 2002). As diferentes regiões cerebrais envolvidas nas transmissões colinérgicas estão descritas na Figura 2.3.1.

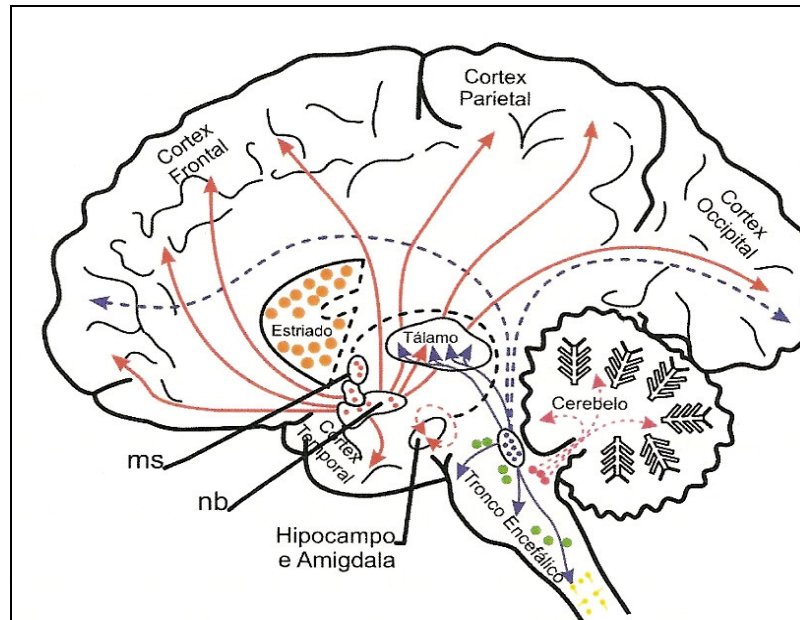


Figura 2.3.1 – Sistema colinérgico (encéfalo humano). As localizações dos principais grupos de corpos celulares e tratos de fibras colinérgicas são mostrados em vermelho. Os núcleos septo medial (ms) e núcleo basal (nb) estão em vermelho. O núcleo pedúnculo pontino apresenta-se em azul e os interneurônios estriatais em laranja (Adaptado de PERRY et al. (1999), modificado por MAZZANTI, 2007).

A acetilcolina (ACh) (Figura 2.3.2) foi o primeiro composto a ser identificado como um neurotransmissor e passou a ser amplamente estudado nas sinapses do SNC e sistema nervoso periférico (SNP) (DESCARRIES et al., 1997). Sua síntese é realizada nos neurônios pré-sinápticos, pela colina-acetiltransferase (ChAT, E.C. 2.3.1.6), e armazenada em vesículas que liberam seu conteúdo por exocitose, após influxo de cálcio no terminal nervoso. Ao ser liberada, a ACh interage com receptores específicos causando despolarização e propagação do potencial de ação na célula pós-sináptica. Sua rápida metabolização ocorre de forma enzimática (ODA, 1999). Os efeitos da ACh são mediados pela ativação de receptores nicotínicos e muscarínicos (DESCARRIES et al., 1997).

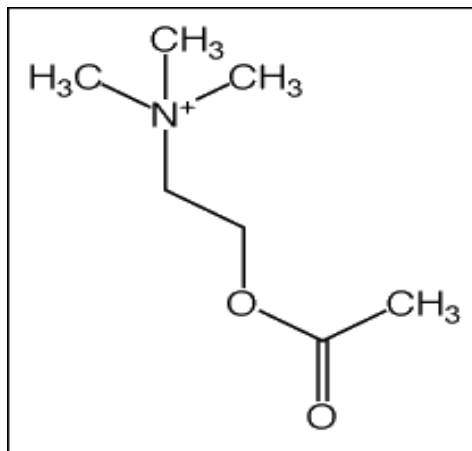


Figura 2.3.2 – Estrutura química da acetilcolina.

A ACh que permanece na fenda sináptica é hidrolisada por uma colinesterase específica em ácido acético e colina. Grande parte da colina resultante é captada pelo terminal do axônio colinérgico por um transportador de colina (CHT) e reutilizada na síntese de nova ACh (Figura 2.3.3) (MESULAM et al., 2002).

As colinesterases são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidade aos substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição nos tecidos. As colinesterases têm uma função relevante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de outros papéis, como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (MASSOULIÉ et al., 1993).

A terminação da transmissão sináptica pela hidrólise do neurotransmissor é uma característica substancial das sinapses colinérgicas. Este mecanismo de terminação único faz da acetilcolinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7), uma serina hidrolase, encarregada de executar a quebra da ACh, uma peça chave da sinalização colinérgica (ZIMMERMAN & SOREQ, 2006). A hidrólise da ACh também pode ser feita por uma enzima menos específica chamada butirilcolinesterase (BuChE, E.C.3.1.1.8) (ou pseudocolinesterase). Entretanto, a AChE parece ter muito mais funções que a BuChE como, por exemplo, mudanças nos níveis e propriedades da AChE estão associadas com respostas a inúmeros estímulos externos (SOREQ & SEIDMAN, 2001). O número de moléculas de ACh pode se apresentar abaixo ou acima dos níveis adequados e, a atividade da AChE parece controlar a interação deste substrato com o seu receptor, seja ele, nicotínico ou

muscarínico, servindo assim, como um índice da função colinérgica (MARCEL et al., 1998).

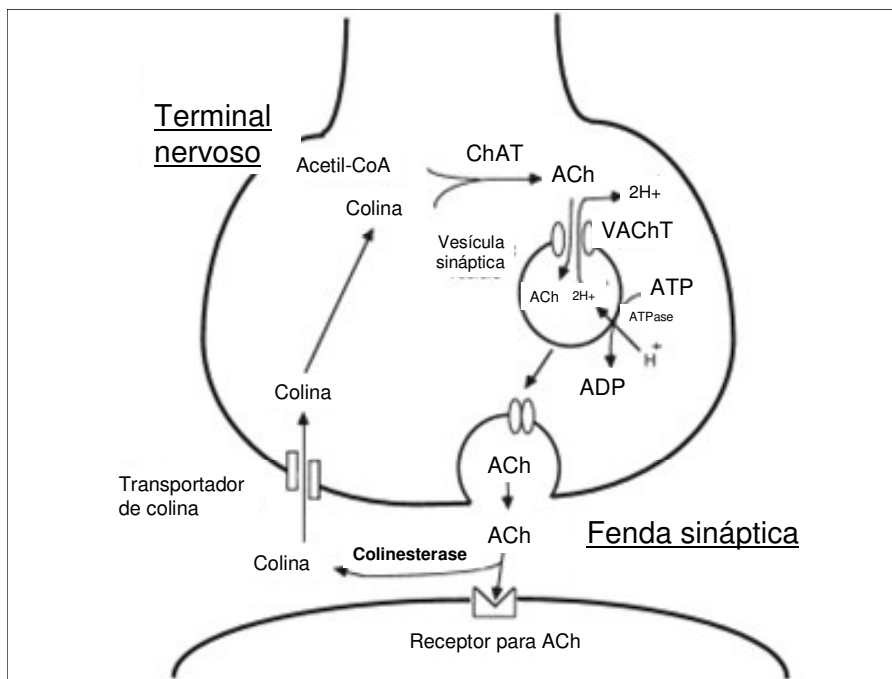


Figura 2.3.3 – Esquema da sinapse colinérgica. A acetilcolina (ACh) que está contida na vesícula sináptica do terminal nervoso é liberada na fenda sináptica por exocitose. Liga-se no neurônio pós-sináptico através de receptores específicos e é hidrolizada por colinesterases específicas, que a degradam em colina e acetil-CoA. O transportador de colina recolhe a colina resultante da reação que está livre na fenda sináptica e a leva novamente para o neurônio pré-sináptico para sua reutilização. Colina acetil-transferase (ChAT); transportador de acetilcolina vesicular (VAcHT); adenosina 5' trifosfato (ATP), adenosina 5' difosfato (ADP) (Adaptado de ODA, 1999).

A AChE é uma glicoproteína globular encontrada nas sinapses colinérgicas, nas junções musculares, e em células sanguíneas como eritócitos, linfócitos e plaquetas (SILVA, 1998; MARCEL et al., 1998). Sua forma estrutural divide-se em globular ou assimétrica. A forma globular é composta por monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) da subunidade catalítica. A unidade G1 está ligada ao citosol, enquanto que G4 à membrana da célula. O tipo G4 é o mais observado no sistema nervoso e muscular (DAS et al., 2001; ALDUNATE et al., 2004; XIE et al., 2007). No sangue, predominam as formas G2 (glóbulos vermelhos) e G4 (plasma)

(SKAU, 1985). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente para a exportação, ou se apresentam associadas à membrana celular externa através de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídio acoplado (TAYLOR & BROWN, 1999).

As formas heteroméricas da AChE estão associadas à lâmina basal externa por proteínas que determinam sua localização sináptica. Os tipos assimétricos consistem de um (A4), dois (A8) e três (A12) tetrâmeros catalíticos ligados ao colágeno Q (ColQ) que é predominante nas junções musculares. O tetrâmero ligado à âncora de membrana rica em prolina (PRIMA) é abundante nas sinapses cerebrais (Figura 2.3.4) (ALDUNATE et al., 2004; ZIMMERMAN & SOREQ, 2006).

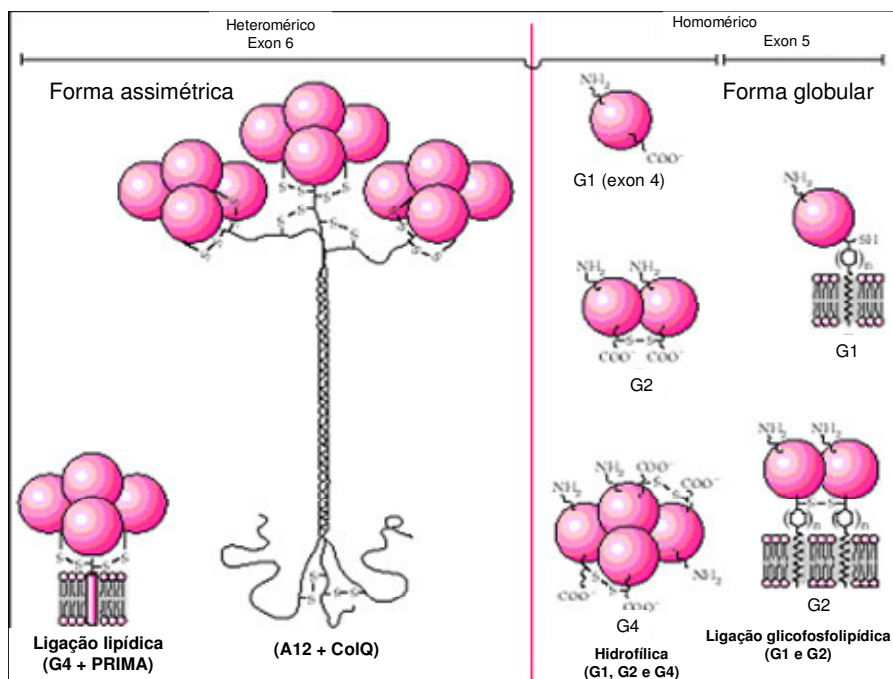


Figura 2.3.4 – Estruturas moleculares da acetilcolinesterase (AChE). Formas globulares e assimétricas (Adaptado de Feldman & Quenzer, 1984).

SUSSMAN et al. (1991) realizaram estudos pioneiros sobre as funções catalíticas da AChE do *Torpedo californica* por cristalografia de raio-x (Figura 2.3.5). Pôde-se perceber a distribuição bipolar das cargas na superfície enzimática, com o pólo aniônico (negativo) envolta da entrada do gorge (similar a uma garganta) e o pólo catiônico (positivo) localizado ao fundo. Um segundo sítio aniônico, o sítio

aniônico periférico (PAS), foi proposto por NUNES-TAVARES et al. (2002), com base na ligação de compostos biquartenários. Acredita-se que este sítio possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima, ou, na inibição por excesso de substrato.

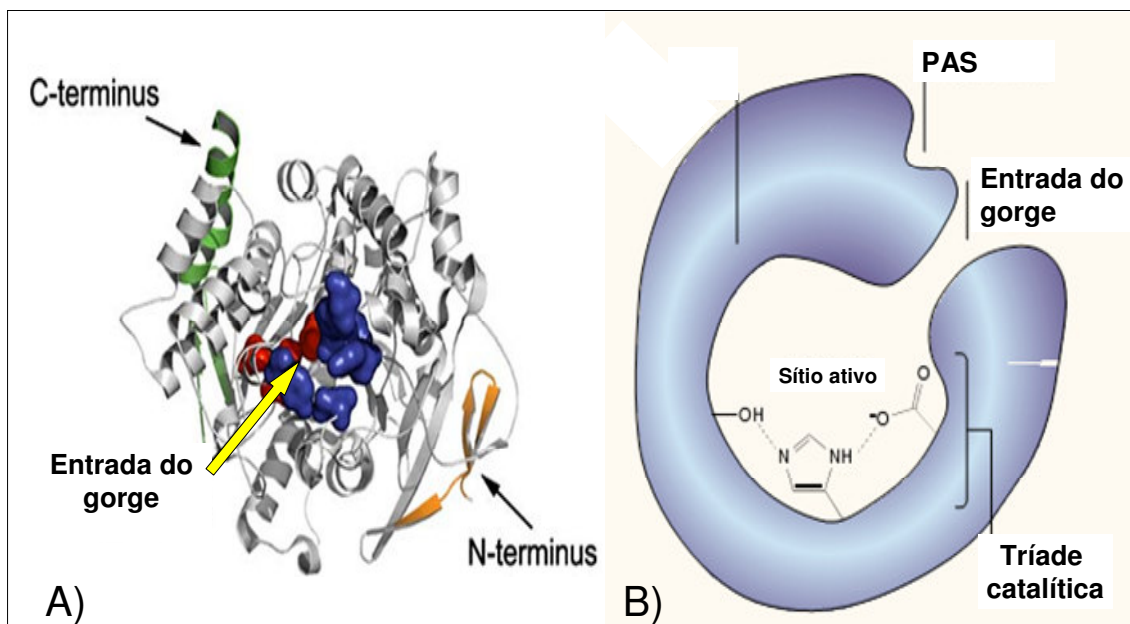


Figura 2.3.5 – Acetilcolinesterase (AChE). A) Estrutura tri-dimensional da AChE. Presença de três resíduos do sítio catalítico (catiônico) (vermelho) e cinco resíduos do sítio aniônico periférico (PAS) (azul). Observar a localização do sítio catalítico ao fundo do gorge e resíduos aniônicos na sua entrada. A região helicoidal mostra C-terminatus (verde) e N-terminatus (laranja). B) Desenho estrutural da AChE. Seu centro ativo é formado por resíduos da chamada tríada catalítica (serina, histidina e glutamato). (Adaptado de: A- ZIMMERMAN & SOREQ, 2006; B- SOREQ & SEIDMAN, 2001).

A taxa de secreção da AChE é modulada pela estimulação neuronal, quantidade do neurotransmissor na sinapse e tratamento com fármacos (DESCARRIES, 1997). Também é interessante ressaltar que a AChE proveniente dos eritrócitos (RBC-AChE) tem demonstrado propriedades funcionais e estruturais similares àquelas da AChE do cérebro (THIERMANN et al., 2005). A RBC-AChE pode demonstrar níveis de atividade alterados mesmo antes das colinesterases cerebrais (MATTSSON et al., 2001).

Além do caráter clássico da AChE na terminação da transmissão sináptica, nos últimos anos têm-se sugerido outras funções ligadas a esta enzima tanto no aspecto catalítico (hidrólise da ACh num contexto trófico) quanto não-catalítico (adesão protéica e celular, participação na hematopoese, regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica e osteogênese) (SOREQ & SEIDMAN, 2001; SILMAN & SUSSMAN, 2005).

2.4 Peroxidação lipídica

Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contém um número ímpar de elétrons em sua órbita externa. Um exemplo, são as espécies reativas ao oxigênio (ROS), representadas pelo radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^{\cdot}) (Figura 2.4.1) (FANG et al., 2002).

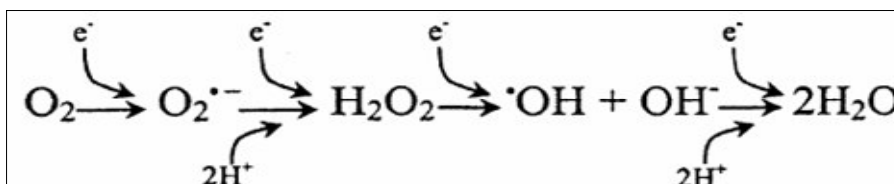


Figura 2.4.1 – Formação as espécies reativas ao oxigênio. (Adaptado de NORDBERG & ARNER, 2001)

O elemento oxigênio pode ser considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, conferindo a ele uma alta reatividade. Todos os tecidos dos organismos aeróbicos podem sofrer dano oxidativo, porém o tecido nervoso é o mais susceptível em comparação aos demais tecidos. Uma das razões, é seu alto consumo de oxigênio, pois é responsável por aproximadamente 20% do consumo basal de O_2 corporal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres atacam os ácidos graxos insaturados das membranas celulares num processo chamado de peroxidação lipídica, resultando em alterações na sua estrutura e permeabilidade. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, e formação de produtos citotóxicos

(como o malondialdeído – MDA/ TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A peroxidação lipídica é considerada um evento fisiopatológico importante na toxicidade por fármacos, como os anti-neoplásicos e EAA, em diversas doenças, e em danos isquêmicos e traumáticos (BRAUGHLER et al., 1987). Assim, o excesso ou acúmulo de ROS no organismo, além de lesar a fração lipídica, pode prejudicar as proteínas e o DNA celular, acelerando processos como o envelhecimento e o câncer (CHEN et al., 2007) (Figura 2.4.2).

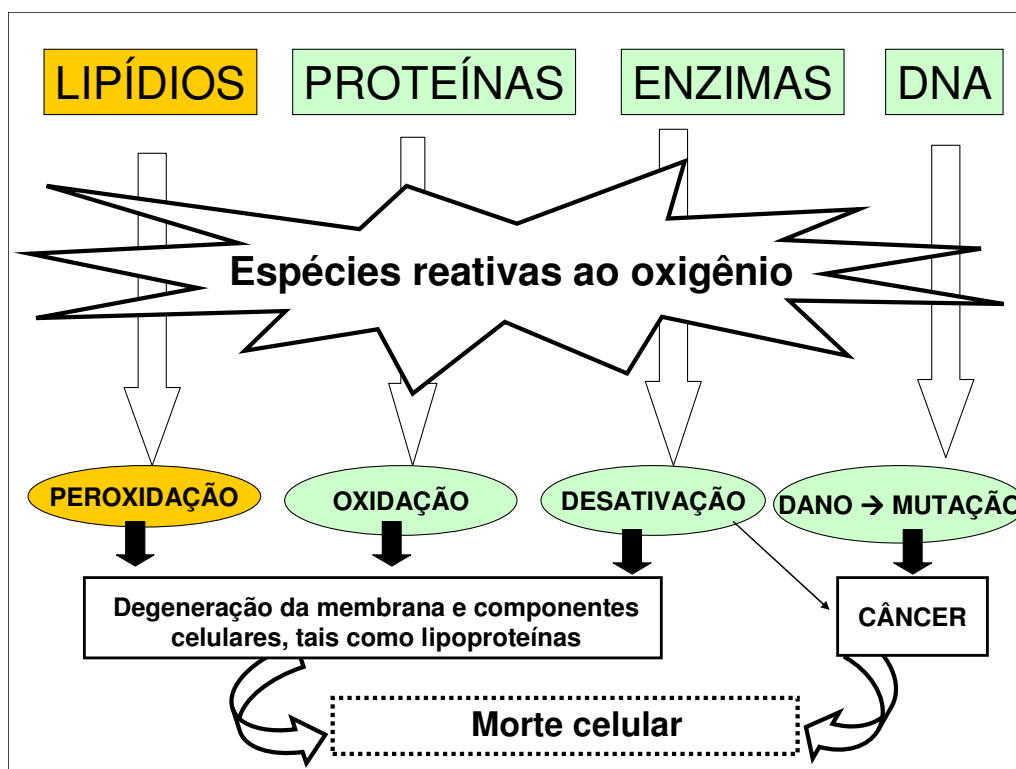


Figura 2.4.2 – Esquema dos eventos relacionados às espécies reativas ao oxigênio, incluindo a peroxidação lipídica e suas conseqüências ao organismo (Adaptado de www.gentaur.com/nieuwe_pagina_8.htm).

O SNC é um tecido que consiste substancialmente de membranas e ácidos graxos, o que aumenta a vulnerabilidade dos constituintes da membrana lipídica aos danos oxidativos e a ação direta dos radicais livres (VEDDER et al., 1999). Este processo ocorre em diferentes condições neurotóxicas e/ou neurodegenerativas, e em grau bem menor nas atividades fisiológicas normais dos circuitos neurais. Os

radicais livres podem modificar a produção e o reaproveitamento de neurotransmissores, a atividade dos canais de íons, e a função de diversos transportadores de substâncias para a célula e mitocôndrias, além dos receptores de superfície (MATTSON, 1998).

A remoção dos radicais livres do organismo ocorre a partir de mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos. O conjunto enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C.1.11.1.6), a glutathione peroxidase (GSH-Px, E.C.1.11.1.9) e a glutathione reductase (GR, E.C.1.6.4.2). Os processos não-enzimáticos incluem a glutathione tripeptide (GSH) e as vitaminas A, C e E (SIES, 1997). A ausência ou falha na defesa antioxidante permite uma ação mais intensa da peroxidação lipídica, podendo acelerar suas reações prejudiciais à célula. Pacientes com certos tipos de tumores podem ter diminuição das enzimas antioxidantes, como aqueles localizados no cérebro (RAO et al., 2000).

3 MANUSCRITOS

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de manuscritos científicos. Cada subtítulo corresponde a um dos manuscritos, com sua formatação de acordo com as orientações das revistas que foi submetido (item 3.1) ou que será encaminhado (item 3.2).

3.1 – Decanoato de nandrolona na atividade da acetilcolinesterase de ratos Wistar

Autores: Danieli Brolo Martins, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Roselia Spanevello, Cinthia Melazzo Mazzanti, Roberta Schmatz, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsh, Débora Cristina Olsson, Juliana Felipetto Cargnelutti, Carolina Kist Traesel.

Submetido à: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.

3.2 - Evaluation of cholinergic system and oxidative profile of rats treated with vincristine sulphate and nandrolone decanoate

Autores: Danieli Brolo Martins, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Cinthia Melazzo Mazzanti, Roselia Spanevello, Roberta Schmatz, Máisa Corrêa, Naiara Stefanello, Candice Schmidt, Juliana Cargnelutti, Maria Rosa Schetinger, Vera Maria Morsch, Angela Medeiros Veiga.

De acordo com as normas de: Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

Decanoato de nandrolona na atividade da acetilcolinesterase de ratos Wistar**Danieli Brolo Martins^{1*} Sonia Terezinha dos Anjos Lopes¹****Roselia Spanevello² Cinthia Melazzo Mazzanti³ Roberta Schmatz⁴****Maria Rosa Chitolina Schetinger⁴ Vera Maria Morsh⁴ Débora Cristina****Olsson¹ Juliana Felipetto Cargnelutti⁵ Carolina Kist Traesel¹****RESUMO**

O decanoato de nandrolona (DN) é um esteróide anabólico androgênico (EAA) popular entre os atletas e indivíduos que desejam aumentar a massa muscular. Recentemente, as ciências da saúde vêm redescobrando suas aplicações médicas, citando-o em tratamentos de pacientes humanos e animais. Evidências clínicas sugerem que o excesso de EAA possa afetar o sistema colinérgico, responsável por diversas funções vitais como aprendizado, memória e organização dos movimentos. Assim, objetivou-se pesquisar seu efeito, em diferentes doses, sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em distintas estruturas cerebrais: cerebelo (CE), hipocampo (HI), estriado (ES) e córtex (CO) de ratos adultos. Para isso, utilizou-se 36 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), divididos em 6 grupos. Esses foram constituídos por: G1-controle, G2-controle diluente, G3-0,42mg kg⁻¹ de DN, G4-1,8 mg kg⁻¹ de DN, G5-4,6 mg kg⁻¹ de DN, e G6-10,0 mg kg⁻¹ de DN. As

¹Departamento de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria. *Autor para correspondência: D. B. Martins, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Hospital Veterinário Universitário (Prédio 97), Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Cep 970105-900, Campus Universitário, Santa Maria, RS. Email: vetdanielimartins@yahoo.com.br.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

³ Departamento de Morfologia e Histologia, Universidade Federal de Santa Maria,

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria,

⁵ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

aplicações foram semanais, durante três semanas consecutivas. Os valores obtidos mostraram um aumento significativo da atividade da AChE referente ao ES e ao CE nos grupos G5 e G6. Nas condições em que esta pesquisa foi realizada, o DN aumenta a atividade da AChE, o que poderia prejudicar o sistema colinérgico.

Unitermos: decanoato de nandrolona, sistema colinérgico, acetilcolinesterase, esteróide anabólico androgênico, cérebro.

INTRODUÇÃO

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) são um grupo de compostos naturais e sintéticos formados a partir da testosterona e seus derivados (Cunha *et al.*, 2006). Clark e Henderson (2003) descreveram três classes principais de EAA, de acordo com a estrutura anatômica. A primeira chamada de ésteres de testosterona, a segunda de derivados da 19-nor-testosterona, no qual está incluído o decanoato de nandrolona (DN), e a terceira classe conhecida como derivados do 17 α -alquila.

O DN é popular entre os atletas e indivíduos que desejam aumentar a massa muscular (Hartgens *et al.*, 2001; Iriart, Andrade, 2002; Lindqvist, 2004). Entretanto, recentemente as ciências da saúde vêm redescobrando suas aplicações médicas (Basaria *et al.*, 2001).

O DN é citado em tratamentos de pacientes humanos e animais, e pode ser utilizado em casos de hemodiálise (Sheashaa *et al.*, 2005), nos distúrbios urinários (Nelson, Couto, 2006), nas quimioterapias (Perez *et al.*, 2005), no câncer de mama (como anti-estrógeno) (Basaria *et al.*, 2001), na osteoporose (Vanderschueren *et al.*, 2004), nas queimaduras (Linqvist, 2004) e em algumas doenças crônicas como a

doença pulmonar obstrutiva (Schols, 2003), na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Cuerda *et al.*, 2005) e, na estimulação de células-tronco pluripotentes (Bhasin *et al.*, 2003). Larsson *et al.* (2002) comentaram que este medicamento estimula o crescimento e a resistência celular, promovendo a regeneração de diversos tipos de tecido.

Nos últimos anos, observa-se um aumento no uso de EAA (Iriart, Andrade, 2002). Seus efeitos colaterais abrangem doença cardiovascular, hepatotoxicidade, acne, cefaléia, náusea (Iriart, Andrade, 2002; Melnik *et al.*, 2007) e alterações reprodutivas como azoospermia e ginecomastia (Drakeley *et al.*, 2004; Cuerda *et al.*, 2005). A formação de células-tronco neurais também é prejudicada, o que indica que estas substâncias possam afetar diversos sistemas cerebrais (Brännvall *et al.*, 2005), inclusive os neurônios colinérgicos que possuem um papel fundamental em diversas funções vitais do organismo (Mesulam *et al.*, 2002).

O sistema colinérgico é um dos mais importantes caminhos modulatórios do sistema nervoso central (SNC) (Descarries *et al.*, 1997; Perry *et al.*, 1999). Os neurônios colinérgicos e suas projeções estão amplamente distribuídos através do SNC e estão relacionados ao aprendizado, a memória, a organização cortical do movimento e ao controle do fluxo sanguíneo cerebral (Mesulam *et al.*, 2002).

A enzima acetilcolinestrerase (AChE - E.C. 3.1.1.7) é conhecida por ser uma das mais eficientes catálises biológicas, já que hidrolisa rapidamente o neurotransmissor acetilcolina (ACh) tanto na sinapse colinérgica quanto na junção neuromuscular, finalizando assim a transmissão do impulso nervoso (Grisaru *et al.*, 1999). A AChE participa da regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, e também foi proposto sua atividade hematopoética pela presença desta enzima em células progenitoras do sangue (Soreq, Seidman, 2001).

Pouco se conhece sobre os efeitos dos EAA no SNC (Brännvall, 2004) e grande parte dos dados que se tem atualmente sobre seus efeitos colaterais são provenientes de relatos de caso (Hall *et al.*, 2005) e seu abuso pode acarretar conseqüências negativas para o funcionamento do SNC (Brännvall *et al.*, 2005). Neste contexto, considerando que o DN é um dos EAA mais utilizados no Brasil e no mundo e que o sistema colinérgico desempenha importantes funções modulatórias no SNC, este estudo foi conduzido para investigar a atividade da AChE no cerebelo (CE), hipocampo (HI), estriado (ES) e córtex (CO) de ratos normais e tratados com DN.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 36 ratos, com idade de três meses, machos, pesando entre 210 a 300 gramas, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O período de adaptação foi de 20 dias com dieta sólida e hídrica *ad libitum*. As condições ambientais foram controladas, temperatura (25°C), ciclo de luminosidade (12 horas claro/ 12 horas escuro) e umidade relativa em torno de 60%.

Os ratos foram separados em seis grupos, de forma aleatória, com seis animais cada. Os grupos foram constituídos por: G1 - controle (solução fisiológica), G2 – controle diluente (somente veículo oleoso de origem vegetal), G3 – 0,42mg kg⁻¹ de DN, G4 – 1,8 mg kg⁻¹ de DN, G5 – 4,6 mg kg⁻¹ de DN, e G6 – 10,0 mg kg⁻¹ de DN. As dosagens foram baseadas em Vieira (2003), que estudou as doses: clínica, intermediária e supra-clínica, do DN em fígados de murinos.

Todos os animais tiveram o membro posterior direito tricotomizado, para a observação de alguma possível reação após a injeção do placebo ou do medicamento. O DN foi diluído em veículo oleoso de origem vegetal adequado à administração intramuscular (IM).

O protocolo experimental teve duração de um mês. As aplicações foram realizadas com uma semana de intervalo, sempre no mesmo horário (vespertino), durante três semanas consecutivas. Na quarta semana, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de imobilização seguida de deslocamento da medula cervical, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A cabeça foi retirada e as estruturas cerebrais foram separadas em CE, CO, ES e HI, e homogeneizadas isoladamente em Médium I e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. A atividade da AChE foi determinada pelo método de Ellman *et al.* (1961), modificado por Rocha *et al.* (1993) e expressa em $\mu\text{moles AcScCh/h/mg}$ de proteína.

Para a estatística dos valores obtidos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan. Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns estudos têm demonstrado a interação dos EAA no SNC (Johansson *et al.*, 2000; Frizon *et al.*, 2005; Papazisis *et al.*, 2007). Na parte cognitiva, trabalhos recentes estão surgindo, investigando a participação dos andrógenos como terapia complementar em alguns distúrbios centrais, como na doença de Alzheimer (KENNY *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2006). No entanto, não foi encontrado na literatura nenhuma

pesquisa que correlacionasse os efeitos do DN, em diferentes doses, com a atividade da AChE cerebral.

Os EAA estão incluídos na lista de substâncias controladas do FDA (*Food and Drug Administration*) devido aos efeitos apresentados por esportistas que utilizavam altas doses desses medicamentos (Hughes JR *et al.*, 1998). Os efeitos dos EAA sobre o SNC constituem-se em um tema bastante relevante para a saúde coletiva e necessitam de melhor compreensão. São necessárias maiores informações sobre as possíveis conseqüências no cérebro do uso excessivo dos EAA, e em especial, do DN.

A dose terapêutica recomendada do DN em humanos é de 0,4 mg kg⁻¹/dia (Tamaki *et al.*, 2003). Já em pequenos animais, como o cão e o gato, é de 1,0 a 1,5 mg kg⁻¹/semana (Nelson, Couto, 2006). As dosagens utilizadas neste trabalho tiveram o objetivo de representar os efeitos possivelmente causados por sub-dose (G3), dose-clínica (G4) e supra-doses (G5 e G6) na atividade da enzima AChE de estruturas cerebrais de ratos Wistar.

Há disponível no mercado aproximadamente 60 tipos de EAA, nas formas oral e injetável (Hughes JR *et al.*, 1998; Clark, Henderson, 2003). Esta pesquisa optou pela utilização de um esteróide injetável, já que este possui uma meia-vida mais longa no organismo, se comparado aos EAA de uso oral, além de ser muito popular entre os usuários (Santos, 2007). O DN tem uma meia-vida no músculo em torno de seis dias, sendo que a duração do seu efeito perdura por três semanas no organismo (Lindqvist, 2004).

Os resultados obtidos nas diferentes estruturas cerebrais estudadas encontram-se na Figura 1. Foi observado neste estudo, um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da AChE no ES e no CE nos grupos G5 e G6 (Fig. 1A e 1B,

respectivamente), enquanto que no HI e CO (Fig. 1C e 1D, respectivamente) não houve alterações na atividade da AChE entre os grupos tratados quando comparado com o grupo controle.

Um importante aspecto é que no ES, uma estrutura rica em vias colinérgicas, houve um aumento na atividade da AChE nos grupos G5 e G6. Por outro lado, no CE, uma estrutura onde as projeções colinérgicas são baixas (Zimmerman, Soreq, 2006), também houve um aumento na atividade desta enzima nas mesmas doses utilizadas. Sabe-se que uma ativação da AChE leva a uma rápida degradação da ACh e uma baixa estimulação dos receptores (Grisaru *et al.*, 1999). Assim, pode-se sugerir que o DN nas doses utilizadas em G5 e G6 pode promover uma disfunção na sinapse, interferindo com a modulação da neurotransmissão colinérgica.

A estimulação da AChE em diferentes estruturas cerebrais, verificada nesta pesquisa, concorda com Brännvall (2004) que sugeriu que os EAA são capazes de estimular receptores em partes distintas do SNC. Além disso, estudos têm demonstrado que a superexpressão prolongada da AChE no SNC de camundongos implica em patologias cognitivas e neuroanatômicas (Kaufer *et al.*, 1998). O que também poderia prejudicar algumas funções clássicas desta enzima como seu papel na transmissão colinérgica, seu potente efeito na adesão celular (Johnson, Moore, 1999), e no crescimento dos neuritos (Day, Greenfield, 2002). Dessa forma, pode-se sugerir que nas duas doses mais altas pesquisadas (G5 e G6) o DN possa interferir em alguns parâmetros cognitivos e comportamentais.

Kaufer *et al.* (1998) relataram que indivíduos que apresentaram sinais clínicos neuropsiquiátricos similares aos provocados pelo uso abusivo de EAA tiveram alterações nos níveis de ACh, o que sugere que a atividade da AChE também está alterada. Em mamíferos, a AChE está significativamente aumentada no CE, HI, ES e

CO de animais expostos a diversos fatores estressantes (Zimmerman, Soreq, 2006), Seus valores também podem estar aumentados em situações de neurotoxicidade e de neurodegeneração (Jameson *et al.*, 2007), o que sugere que o DN quando usado em doses elevadas, como visto em G5 e G6, possa se comportar como um agente neurotóxico.

Os dados encontrados neste trabalho, demonstram que o DN eleva a atividade da AChE. Supõe-se que isto possa interferir no sistema colinérgico e, conseqüentemente, no SNC. O aumento da função acetilcolinesterásica poderia interferir na disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica, além de baixa estimulação dos receptores colinérgicos (GRISARU *et al.*, 1999), o que resultaria em prejuízo na transmissão de informações neuronais. Maiores estudos deverão ser solicitados para esclarecer se os efeitos do DN no sistema colinérgico são reversíveis e, se forem, por quanto tempo a alteração pode perdurar.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que, nas condições em que esta pesquisa foi realizada, o DN interage com o sistema colinérgico, aumentando a atividade da AChE. As duas doses mais altas (supra-doses) induziram um aumento significativo na atividade desta enzima no ES e CE, interferindo, assim, com a neurotransmissão e modulação colinérgica. O aumento da função acetilcolinesterásica poderia influenciar os níveis de acetilcolina, ou mesmo, a intensidade dos impulsos colinérgicos pelos receptores pós-sinápticos.

ABSTRACT

Effect of nandrolone decanoate on acetylcholinesterase activity in Wistar rats

Nandrolone decanoate (ND) is a very popular androgenic anabolic steroid (AAS) among athletes and individuals who desire to increase muscle mass. However, recently, the health sciences have rediscovered it for treatments in humans and animals. Clinical evidence suggests that the over use of AAS may affect brain function, leading to behavioral changes which could affect the cholinergic system, responsible for learning, memory and movement organization. Thus, the purpose of this study is to verify the effect of ND, at different doses, on acetylcholinesterase (AChE) activity in distinct brain areas (cerebellum- CE, hippocampus- HI, striatum- ST and cerebral cortex- CO) of Wistar rats. Thirty-six male rats were separated into six groups: G1 – control, G2 – vehicle control, G3 – 0.42 mg kg⁻¹ of ND, G4 -1.8 mg kg⁻¹, G5 – 4.6 mg kg⁻¹, and G6 – 10.0 mg kg⁻¹. Applications were given weekly, during three consecutive weeks. The values obtained showed a relevant enhance of AChE activity in ST and CE in groups G5 and G6. For HI and CO there were no statistically significant alterations. The final results showed that under these experimental conditions, ND increased AChE activity in ST and CE, which could affect the cholinergic system.

Uniterms: *nandrolone decanoate, cholinergic system, acetylcholinesterase, androgenic anabolic steroid, brain.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa. Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Maria pelo apoio técnico.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este artigo está de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – RS, nº 23081.000780/2007-15.

REFERÊNCIAS

BASARIA, S.; WAHLSTROM, J.T.; DOBS, A.S. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, n.11, p.5108-5117, 2001.

BHASIN, S., TAYLOR, W.E.; SINGH, R.; ARTAZA, J.; SINHA-HIKIM, I.; JASUJA, R.; CHOI, H.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, v.58, p.1103-1110, 2003.

BRÄNNVALL, K. Hormonal regulation of neural stem cell proliferation and fate determination, 2004. 63f. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade de Uppsala, Suécia.

BRÄNNVALL, K.; BOGDANOVIC, N.; KORHONEN, L.; LINDHOLM, D. 19-nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, v.21, n.4, p.871-878, 2005.

CLARK, A.S.; HENDERSON, L.P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 27, n.5, p.413-436, 2003.

CUERDA, C.; ZUGASTI, A.; BRETÓN, I.; CAMBLOR, M.; MIRALLES, P.; GARCÍA, P. Treatment with nandrolone decanoate and megestrol acetate in HIV-infected men. *Nutr. Clin. Pract.*, v.20, n.1, p.93-97, 2005.

CUNHA, T.S.; TANNO, A.P.; MARCONDES, F.K.; PEREZ, S.E.A.; ARAÚJO, H.S.S. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.50, n.3, p.532-540, 2006.

DAY, T.; GREENFIELD, S.A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurons in vitro: molecular mechanisms. *Neurosci.*, v. 111, p.649-656, 2002.

DESCARRIES, L.; GISIGER, V.; STERIADE, M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.*, v.53, p.603-625, 1997.

DRAKELEY, A.; GAZVANI, R.; LEWIS-JONES, I. Duration of azoospermia following anabolic steroids. *Fertil. Steril.*, v.81, n.1, p.226, 2004.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.J.; FEATHER-STONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v.21, n.19, p.88-95, 1961.

FRIZON, F.; MACEDO, S.M.D.; YONAMINE, M. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Fundo - RS. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.26, n.4, p.227-232, 2005.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.*, v.264, p.272-286, 1999.

HALL, R.C.W.; HALL, R.C.; CHAPMAN, M.J. Psychiatric complications of anabolic steroid abuse. *Psychosomatics*, v.46, n.4, 285-290, 2005.

HUGHES JR, T.K.; RADY, P.L.; SMITH, E.M. Potential for the effects of anabolic steroid abuse in the immune and neuroendocrine axis. *J. Neuroimmunol.*, v.83, p.162-167, 1998.

IRIART, J.A.B.; ANDRADE, T.M. Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.18, n.5, 1379-1387, 2002.

JAMESON, R.R.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. *Environ. Health Perspect.*, v. 115, n.1, p. 65-70, 2007.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, v.25, supl.2, p.46-51, 2003.

JOHANSSON, P.; HALLBERG, M.; KINDLUNDH, A.; NYBERG, F. The effect on opioid peptides in the rat brain, after chronic treatment with the anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate. *Brain Res. Bull.*, v.51, n.5, p. 413-8, 2000.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at peripheral anionic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 258, p. 758-762, 1999.

KAUFER, D.; FRIEDMAN, A.; SEIDMAN, S.; SOREQ, H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, v.393, n.28, p.373-377, 1998.

KENNY, A.M.; FABREGAS, G.; SONG, C.; BISKUP, B.; BELLANTONIO, S. Effects of testosterone on behavior, depression, and cognitive function in older men with mild cognitive loss. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, v.59, p.75-78, 2004.

LARSSON, C.E.; FARIAS, M.R.; ANDRADE, S.F.; BRITO, A.F. Terapêutica tópica e sistêmica: pele, ouvido e olho. In: ANDRADE, S.F. Manual de terapêutica veterinária. 2ed. São Paulo: Roca, 2002. Cap.8, p.116-178.

LINDQVIST, A.S. Nandrolone decanoate, behaviour and brain: animal experimental studies, 2004. 79f. Tese (Doutorado em Psicologia). Faculdade de Psicologia, Universidade de Göteborg, Suécia.

LU, P.H.; MASTERMAN, D.A.; MULNARD, R.; COTMAN, C.; MILLER, B.; YAFFE, K.; REBACK, E.; PORTER, V.; SWERDLOFF, R.; CUMMINGS, J.L. Effects of testosterone on cognition and mood in male patients with mild Alzheimer disease and healthy elderly men. *Arch. Neurol.*, v.63, n.2, p.177-185, 2006.

MAZZANTI, C.M.; SCHOSSLER, D.R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVA, A.C.; CORREA, M.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; LUNKES, G.; GONZAGA, W.A.; CECIM, M. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. *Ciênc. Rural*, v.34, n.3, p.803-807, 2004.

MELNIK, B.; JANSEN, T.; GRABBE, S. Abuse of anabolic-androgenic steroids and bodybuilding acne: an underestimated health problem. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, v.5, n.10, p.110, 2007.

MESHORER, E.; BITON, I.E.; BEN-SHAUL, Y.; BEN-ARI, S.; ASSAF, Y.; SOREQ, H.; COHEN, Y. Chronic cholinergic imbalances promote brain diffusion and transport abnormalities. *FASEB J.*, v.19, p.910-922, 2005.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. *Neurosci.*, v. 110, p. 627-639, 2002.

MUIR, J.L.; EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function. *J. Neurosci.*, v.14, n.4, p. 2313-2326, 1994.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios da micção. In:_____Medicina Interna de Pequenos Animais. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 48, p. 625-633.

PAPAZISIS, G.; KOUVELAS, D.; MASTROGIANNI, A.; KARASTERGIOU, A. Anabolic androgenic steroid abuse and mood disorder: a case report. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v.10, n.2, 291-293, 2007.

PERRY, E.; WALKER, M.; GRACE, J.; PERRY, R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.*, v.22, p. 273-280, 1999.

PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Changes in brain testosterone and allopregnanolone biosynthesis elicit aggressive behaviour. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v.102, n.6, p.2135-2140, 2005.

ROCHA, J.B.T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M.E. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, n.53, p.431-437, 1993.

ROSA E SILVA, A.C.J.S.; SILVA DE SÁ, M.F. Efeitos dos esteróides sexuais sobre o humor e a cognição. *Rev. Psiquiatri. Clín.*, v.33, n.2, p.60-67, 2006.

SANTOS, A.M. O mundo anabólico: análise do uso de esteróides anabólicos nos esportes. 2ed. Barueri: Manole, 2007. 1360p.

SCHOLS, A.M.W.J. Nutritional and metabolic modulation in chronic obstructive pulmonary disease management. *Eur. Respir. J.*, v.22, supl. 46, p.81-86, 2003.

SKLAN, E.H.; BERSON, A.; BIRIKH, K.R.; GUTNICK, A.; SAHAR, O.; SHOHAM, S.; SOREQ, H. Acetylcholinesterase modulates stress-induced motor responses through catalytic and noncatalytic properties. *Biol. Psychiatry*, v.60, n.7, p.741-751, 2006.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.2, p.8-17, 2001.

TAMAKI, T.; SHIRASHI, T.; TAKEDA, H.; MATSUMIYA, T.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R. Nandrolone decanoate enhances hypothalamic biogenic amines in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.35, n.1, p.32-38, 2003.

VANDERSCHUEREN, D.; VANDENPUT, L.; BOONEN, S.; LINDBERG, M.K., BOUILLON, R.; OHLSSON, C. Androgens and bone. *Endocr. Rev.*, v.25, n.3, p.389-425, 2004.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Quím. Nova*, v.27, n.4, p.655-660, 2004.

VIEIRA, R.P. Estudo do Decanoato de Nandrolona sobre o fígado de ratos Wistar. 2003. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.*, v.326, p.655-669, 2006.

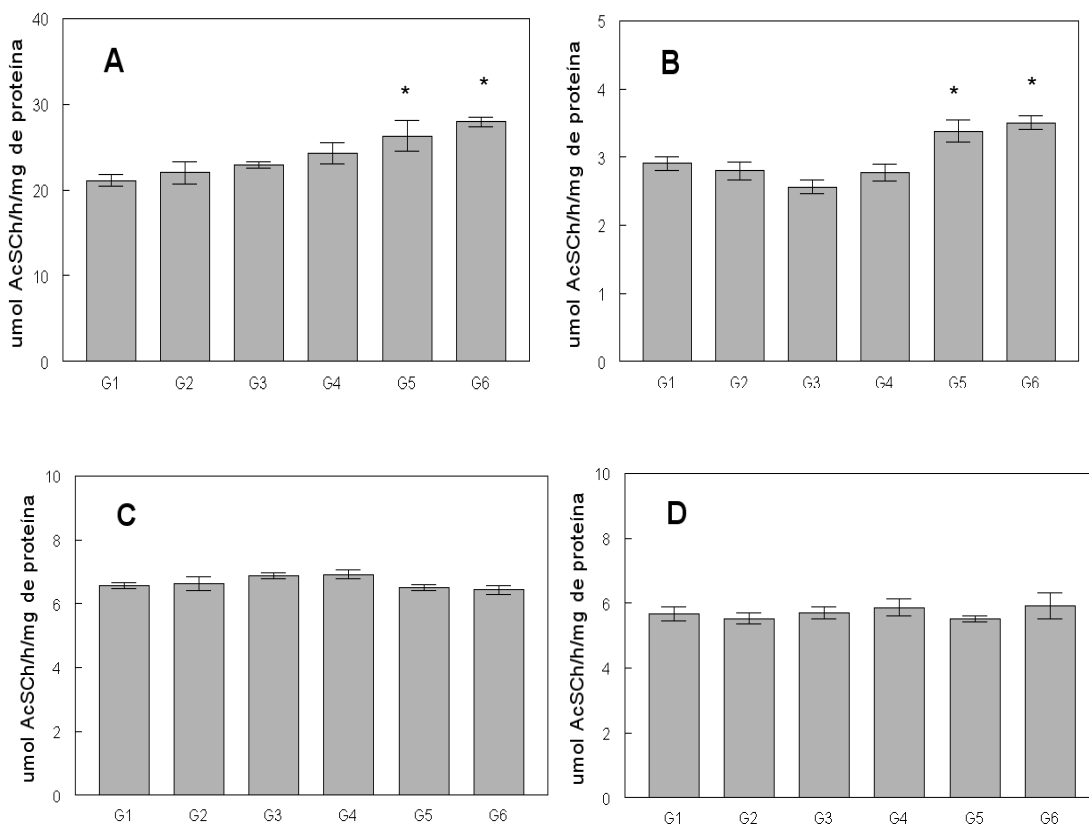


Figura 1 – Efeito do decanoato de nandrolona (DN) na atividade da acetilcolinesterase (AChE) de ratos Wistar submetidos a diferentes doses. G1 - controle (solução fisiológica), G2 – controle diluente (somente veículo oleoso de origem vegetal), G3 – $0,42 \text{ mg kg}^{-1}$ de DN, G4 – $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ de DN, G5 – $4,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de DN, e G6 – $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de DN. A) estriado, B) cerebelo, C) hipocampo e D) córtex. * Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$; teste de Duncan).

Evaluation of cholinergic system and lipid peroxidation of rats treated with vincristine sulphate and nandrolone decanoate

**Danieli Brolo Martins^{1*} Sonia T. dos Anjos Lopes¹ Cinthia Melazzo Mazzanti²
Rosélia Spanevello² Roberta Schmatz³ Máisa Corrêa³ Naiara Stefanello³
Candice Schmidt¹ Juliana Cargnelutti¹ Maria Rosa Schetinger³
Vera Maria Morsch³ Angela P. Medeiros Veiga⁴**

¹ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário, Centro de Ciências Rurais, Federal University of Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Federal University of Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-9000, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴ Departamento de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas Veterinárias, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, 91530-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Number of pages: 22

Number of figures and/or tables: 04

* Corresponding author: Fax: +55-55-3220-8258

E-mail address: vetdanielimartins@yahoo.com.br (D.B. Martins)

ABSTRACT

Vincristine sulphate is an antitumor agent commonly used in small animal clinical oncology, despite the fact that it can cause a number of adverse effects, such as marrow and neuronal cytotoxicity. Nandrolone decanoate has been used during the last several years in association with vincristine to decrease some of its side effects, such as moderate myelosuppression. The present study aimed to detect brain and red blood cell AChE activity (RBC-AChE) and brain (striatum, hippocampus, cerebellum and cortex) and serum lipid peroxidation of healthy rats treated with vincristine sulphate and different doses of nandrolone decanoate. Thirty Wistar rats were divided into 6 groups, each composed of 5 animals. The treatments were applied once a week for two weeks. Sample collection was performed in the third week. During the first week the treatment consisted of: G1 (control) – physiologic solution (PS), G2 – vincristine sulphate (4 mg/m^2), G3 – PS, G4 – PS, G5 – vincristine sulphate (4 mg/m^2) and G6- vincristine sulphate (4 mg/m^2). During the second week, the treatment consisted of: G1 (control) – PS, G2 – PS, G3 – nandrolone decanoate (1.8 mg/kg^{-1}), G4 – nandrolone decanoate (10 mg/kg^{-1}), G5 – nandrolone decanoate (1.8 mg/kg^{-1}) and G6 – nandrolone decanoate (10 mg/kg^{-1}). The results showed that the isolated use of nandrolone decanoate as well as its use in association with vincristine sulphate altered brain AChE and RBC-AChE activity ($p < 0.05$), suggesting their interference in the cholinergic system. Lipid peroxidation increased ($p < 0.05$) not only with the isolated use of vincristine and nandrolone decanoate, but with their associated use at the highest dose of the ester as well. These data show that the association between the therapeutic dose of nandrolone decanoate and vincristine is capable of neutralizing the free radical production induced by their isolated use in brain and blood serum. The RBC-AChE activity and

serum levels of lipid peroxidation shown in this study are similar to the values exhibited in brain tissue. Vincristine sulphate did not affect the cholinergic system but increased free radical production, which over time could serve as a factor in altering AChE activity. Taken together, these results suggest that nandrolone decanoate interferes in cholinergic neurotransmission and modulation, besides increasing free radical production, which may result in harmful effects such as cell death. However, the therapeutic dose associated with vincristine proved to be beneficial, as it was able to protect the organism from damaging processes involved in free radical production.

Key words: anabolic androgenic steroid; brain; chemotherapeutic; cholinergic system; lipid peroxidation; rats.

INTRODUCTION

Chemotherapy is one of the most important tools for the treatment of neoplastic diseases²⁴. It has been used for more than 60 years, as its employment began in World War II. After an extravasation of mustard gas from a bombing, people who had contact with this agent showed marked lymphoid tissue damage³². The first report of chemotherapy used in Veterinary Medicine dates from 1960²². Nowadays, various agents have been used in clinical practice and others are subjects of research^{28,32}. These agents have the purpose of prolonging survival and improving the quality of life in patients with cancer²⁴.

Vincristine sulphate^a is among the most used agents in small animal clinical oncology⁹. Its application is has been reported in illness such as canine transmissible

venereal tumor (CTVT)^{26,33}, lymphomas^{30,32}, leukemia³² and kidney nephroblastoma³⁶.

Selection of the drug treatment must be considered for each patient and is a critical point for the outcome of the antitumor therapy²⁴. Vincristine used alone as a chemotherapeutic agent is able to induce a total remission of CTVT in most cases^{26,32}, while in certain types of sarcoma its use must be combined with other drugs for a satisfactory therapeutic response^{9,32}.

Adverse effects of vincristine include non-selective cytotoxicity that results in moderate myelosuppression (both erythrocytes and leukocytes), anorexia, intestinal disturbances, alopecia²⁶, necrosis (tissue extravasation)⁴¹, peripheral and rarely central toxicity^{11,16,43}. If the professional is familiarized with the agent to be applied, its toxicity can be identified and treated early, improving the animal's wellbeing^{24,28}.

Nandrolone decanoate^b is an anabolic-androgenic steroid (AAS) derived from testosterone and is widely used in medical clinical practice. It is indicated to revert cachexia of patients with cancer and other chronic diseases^{3,25}. It also stimulates bone marrow (BM) to produce new blood cells^{2,35}, mainly in cases where chemotherapy based on vincristine suppresses the bone marrow²⁹. It triggers an increase of erythropoietin production and acts directly on BM hematopoietic progenitors³⁵.

The duration of the effect of a number of drugs depends on their breakdown by endogenous hydrolytic enzymes such as cholinesterases. These enzymes participate in the inactivation of xenobiotics such as plant esters and alkaloids²³. AChE is highly active in biological catalysis and it plays an important role in the central nervous system (CNS) and neuromuscular junctions by rapidly hydrolyzing the transmitter acetylcholine (ACh) in cholinergic synapses²¹. The number of ACh

molecules may be under or over adequate levels and AChE activity seems to control the interaction between this substrate and its receptor, be it nicotinic or muscarinic²⁰. Additionally, AChE blood concentration (RBC – AChE) works as a good peripheral marker in neurotoxic and neurodegenerative disorders by allowing the accessible evaluation of enzymatic activity in the CNS⁶. RBC-AChE shows functional and structural properties similar to those of brain AChE³⁹.

Lipid peroxidation is considered an important physiopathologic event in toxicity from antineoplastic drugs as well as from AAS in a number of diseases and also in ischemic and traumatic damage⁸. The plasma membrane is one of the most reached places by this biochemical reaction, which leads to changes in its structure and permeability. For this reason there is lack of selectivity in the ion exchange, organelle content releasing, and production of cytotoxic substances such as Malondialdehyde – MDA/ TBARS – reactive substances to thiobarbituric acid, which cause cell death¹³. The CNS substantially consists of membranes and fatty acids, which increase the vulnerability of lipid membrane components to oxidative damage and the direct action of free radicals⁴⁰.

As vincristine sulphate is a chemotherapeutic agent widely used in small animal clinical oncology and nandrolone decanoate has been used in association to decrease some of its bone marrow cytotoxicity²⁹, the present study aimed to verify brain and red blood cell AChE activity, and brain and serum lipid peroxidation from healthy rats treated with vincristine sulphate and different doses of nandrolone decanoate.

MATERIALS AND METHODS

Thirty adult male Wistar rats from the Federal University of Santa Maria's (UFMS) Central Bioterium and weighing between 260 and 360 grams were used. The animals were submitted to an adaptation period of 14 days with a solid and liquid diet given *ad libitum*.

The animals were randomly separated into six groups of five animals each. The treatments were applied once weekly during two weeks. Sample collection was carried on during the third week. During the first week the groups received the following treatment: G1 (control) – physiologic solution (PS), G2 – vincristine sulphate (4 mg/m^2), G3 – PS, G4 – PS, G5 – vincristine sulphate (4 mg/m^2), and G6- vincristine sulphate (4 mg/m^2). During the second week the treatment consisted of: G1 (control) – PS, G2 – SF, G3 – nandrolone decanoate (1.8 mg/kg^{-1}), G4 – nandrolone decanoate (10 mg/kg^{-1}), G5 – nandrolone decanoate (1.8 mg/kg^{-1}) and G6 - nandrolone decanoate (10 mg/kg^{-1}).

The dose of vincristine was based on a previous publication²⁹. Nandrolone decanoate was used at the therapeutic dose (1.8 mg/kg^{-1} weekly) currently used for small animals²⁷ and at an overdose (10 mg/kg^{-1}). Vincristine was applied through intraperitoneal (IP) injection. Nandrolone decanoate was diluted in a vegetal-source fat vehicle (olive oil) previously tested and shown to be neutral and, thus, adequate for deep intramuscular injection (IM). The hind limb of all animals was tricotomized in order to observe any possible reaction to the ester. During vincristine manipulation some safety measures were taken such as the use of polycarbonate glasses, a facial mask, long-sleeve cotton lab coat, latex gloves and a plastic lab coat. A laminar flux hood was used to avoid contaminating the animals during the product application and to avoid occupational exposure to the cytotoxic drug.

After the treatment the animals were fasted for a 12-hour period and submitted to euthanasia in a bell glass with ethyl ether. Blood collection was performed through heart puncture. One half of the blood collected was drawn into tubes free of anticoagulants, while the other half was drawn into tubes containing EDTA (ethilene diamine tetraacetic acid). Brain structures were separated into cerebellum, cerebral cortex, striatum and hippocampus, and homogenized separately in Medium I and centrifuged at 1,800 rpm for 10 minutes (for AChE and TBARS). Serum was separated for lipid peroxidation evaluation. Total blood was homogenized in PBS 0.1 M (pH 7.4) containing Triton X – 100 (0.03%) and stocked at -20°C for further enzymatic assays.

Measurement of AChE activity was performed as previously described¹² and modified³¹ in each of the brain structures. RBC-AChE was also determined as previously described¹² and modified⁴⁴. The enzyme of brain origin was expressed in $\mu\text{moles AcSCh/h/mg}$ of protein. Specific activity of RBC-AChE was calculated from the quotient between AChE activity and the total content of hemoglobin and the results were expressed in $\text{mU}/\mu\text{mol Hb}$. TBARS reactions were determined by the method previously described¹⁸ for the different parts of the brain, and values were expressed in nmol MDA/ mg of protein. The same technique¹⁸ was employed for blood serum, except that the results were expressed in nmol MDA/ mL .

One-way ANOVA followed by Duncan's new multiple range test (MRT) was used for statistical analysis ($p < 0.05$). Results were expressed through mean \pm standard error of measurement (SEM).

RESULTS AND DISCUSSION

Vincristine is widely used in association with other drugs in both animal and human subjects. However, some interactions potentialize undesirable effects. One example is the aggravation of neurotoxicity caused by vincristine with the concomitant use of itraconazol in humans^{5,7}. More studies on the interaction between vincristine and other drugs and their effects on body tissues, particularly in the central nervous system, are necessary. The relevance of the present study lies in the lack of information on the effects of the combined or isolated use of vincristine sulphate and nandrolone decanoate on the cholinergic system and lipid peroxidation.

The results obtained in this study are shown in Figures 1, 2, 3 and 4 for brain AChE, AChE-RBC, brain and blood serum TBARS, respectively.

One important finding was a significant inhibition ($p < 0.05$) in AChE activity in striatum, a structure rich in cholinergic pathways, in groups G3, G4, G5 and G6 (Figure 1). The interference of nandrolone decanoate in the functionality of the cholinergic system is suggested in this region¹⁰, since the groups whose inhibition was statistically more intense were G3 and G4 ($p < 0.01$). Groups G5 and G6 (association with vincristine) also showed a significant enzyme inhibition ($p < 0.05$), however, it was mild when compared with the groups where only AAS was applied.

Cerebral cortex and hippocampus showed an increase in enzymatic activity ($p < 0.05$; Figure 1). Interestingly the group with a statistically significant difference in cerebral cortex enzymatic activity was G6, while in hippocampus it was G4. Both the isolated overdose of nandrolone decanoate, in hippocampus, and its overdose in association with vincristine, in cerebral cortex, caused a hyper stimulation AChE. One study¹⁷ stated that the increase of AChE activity may be related to neurotoxicity and neuronal degeneration. This corroborates with the finding that the isolated overdose

of the steroid (G4) in hippocampus caused an increase in AChE activity; however its function returned to basal levels when the same dose was given in association with vincristine (G5). In addition, the association used in cortex (G6) stimulated AChE activity while no change in activity was detected with the isolated use in either G2 or G4.

The cerebellum, a structure with few cholinergic pathways⁴⁵, was the only brain portion analyzed in which no influence of the treatments on AChE activity (Figure 1) was detected. None of the structures studied showed alterations in G2, which could be interpreted as an influence of the employment of only one dose of vincristine, since toxicity is dose-dependent³².

The present study revealed a significant inhibition ($p < 0.05$) in AChE blood (RBC-AChE) activity in groups G4, G5 and G6 (Figure 2). Interestingly, excluding G3, these results were similar to those found in striatum, one of the most important brain structures in the cholinergic system. This demonstrates that RBC-AChE activity may reflect what is occurring in striatum synapses³⁹. Moreover, the results suggest that RBC-AChE works as a good peripheral maker for brain disorders since it allows for an accessible evaluation of AChE activity in the CNS⁶.

A significant increase in TBARS ($p < 0.05$) was also detected in all cerebral structures analyzed (Figure 3). This may be due in part to not only the aerobic metabolism of the CNS, but also to high levels of polyunsaturated fatty acids and low levels of antioxidant defenses⁴². An increase in TBARS was observed in groups G2 and G4 ($p < 0.01$) and G3 ($p < 0.05$) in striatum (Figure 3). These results demonstrate that the separate use of the two drugs increased free radical production at that site. However, their final products were the same as those of the control group when they were used in association (G5). Although vincristine does not show a good

penetration in the CNS³², the dose used in this study was enough to cause lipid peroxidation in striatum. It is well known that the increase of reactive oxygen species (ROS) may lead to a higher blood-brain barrier permeability and thus inhibit mitochondrial respiration and increase protein oxidation^{14,34}, impairing synaptic interactions. The isolated use of nandrolone decanoate also increased lipid peroxidation. The value presented by G4 may be the higher dose or even because of the variable amount of androgenic receptors in different types of non-reproductive tissue cells, such as in the brain¹⁹.

The cerebral cortex and hippocampus showed very similar behaviors, showing an increase ($p < 0.05$) in TBARS levels in groups G3, G4 and G6 (Figure 3). Additionally, the isolated use of both doses of nandrolone decanoate augmented free radical production. The results obtained show that lipid peroxidation was significantly higher in G6 than in the other groups, making the potentialization of nandrolone decanoate action by vincristine evident in those parts of the brain. In another study, no effect of testosterone or its derivative substances on TBARS levels was detected in different CNS cells *in vitro*⁴⁰. Thus, the need for both *in vivo* studies and studies using an association with other drugs are relevant since the type of response may undergo changes in such a case.

In cerebellum, there was only a change in G6 (Figure 3). In addition, none of the drugs used alone caused an increase in ROS. However, the use of vincristine in association with an overdose of AAS stimulated lipid peroxidation. In a similar fashion, the isolated use of certain hormones such as testosterone showed no effect on the oxidative status in rat prostate, although in association with other substances it induced a marked increase in oxidative stress as well as an inhibition of enzymatic antioxidant activity in the same site, which could lead to carcinogenesis³⁸.

Serum TBARS levels were altered in G2 and G3 ($p < 0.05$) and G6 ($p < 0.01$) as compared to the control group (Figure 4). The isolated employment of the drugs in this experiment caused a rise in serum MDA production. This effect was reinforced by the behavior of G6, which was significantly higher than in G2 and G3. Published results⁴ of *in vitro* studies using tumor cell cultures and cytotoxic doses of vincristine found no traces of lipid peroxidation. However, the present experiment demonstrated free radical production in brain tissue (striatum) and in blood serum, demonstrating that the *in vivo* interaction of various components with vincristine is determinant for the results obtained. Lipid peroxidation caused by the chemotherapeutic agent could collaborate in neoplastic cell apoptosis, decreasing its viability. In this sense, further studies are necessary.

Interestingly, the pharmacological combination used in G5 presented similar physiological values to those of G1 not only in serum TBARS but also in all the brain structures studied. Thus, the data show that the association between the therapeutic dose of nandrolone decanoate used and vincristine is capable of neutralizing the free radical production induced by their isolated use both in brain and blood serum. Another paper¹⁵ showed a similar antitumoral effect caused by testosterone in rat brain. Ex-vivo studies have also found this hormone to protect cerebellum cells in cell cultures induced to death through oxidative stress¹.

CONCLUSION

The results obtained in this study show that nandrolone decanoate and vincristine affect the CNS.

The isolated use of nandrolone decanoate and its association with vincristine sulphate change cerebral and blood AChE activity. In addition, AAS interferes in

cholinergic neurotransmission, which could cause an alteration of its neurotransmitter, as well as a low or high stimulation of post-synaptic receptors.

Lipid peroxidation increased as a result of the isolated use of both drugs tested and also as a result of the association between the chemotherapeutic agent and an overdose of AAS. The association between the therapeutic dose of nandrolone decanoate and vincristine was able to neutralize the free radical production induced by their isolated use in brain and blood serum.

Although vincristine is not able to totally penetrate the blood-brain barrier, it is possible to state that the dose used in G2 was sufficient to produce free radicals in the brain. Nevertheless, alone it was not sufficient to alter AChE activity.

The serum RBC-AChE activity and TBARS results presented in this study are similar to those exhibited by brain tissue. It is possible to use both tests in humans and animals. In addition, their sample collection is easy to perform.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SOURCES AND MANUFACTURERS

- a. Vincrisan®, Quiral Química do Brasil, Juiz de Fora, MG, Brazil.
- b. Deca Durabolin®, Organon do Brasil, São Paulo, SP, Brazil.

REFERENCES:

1. Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S: 2001, Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res* 892: 255-262.

2. Bagchus WM, Smeets JMW, Verheul HAM, et al.: 2005, Pharmacokinetic evaluation of three different intramuscular doses of nandrolone decanoate: analysis of serum and urine samples in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2624-2630.
3. Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs, AS: 2001, Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5108-5117.
4. Benchekroun MN, Robert J: 1992, Measurement of doxorubicin-induced lipid peroxidation under the conditions that determine cytotoxicity in cultured tumor cells. *Anal Biochem* 201: 326-330.
5. Bermudez M, Fuster JL, Llinares E, et al.: 2005, Itraconazole-related increased vincristine neurotoxicity: case report and review of literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 27: 389-392.
6. Bernhardt RV, Alarcón R, Mezzano D, et al.: 2005, Blood cells cholinesterase activity in early Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 19: 204-212.
7. Böhme A, Ganser A, Hoelzer D: 1995, Aggravation of vincristine-induced neurotoxicity by itraconazole in the treatment of adult ALL. *Ann Hematol*, 71: 311-312.
8. Braughler JM, Pregenzer JF, Chase RL, et al.: 1987, Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 262: 10438-10440.

9. Cave TA, Norman P, Mellor D: 2007, Cytotoxic drug use in treatment of dogs and cats with cancer by UK veterinary practices (2003 to 2004). *J Small Anim Pract* 48: 371-377.
10. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH: 1991, Acetylcholine. *In: The biochemical basis of neuropharmacology*, Cooper JR, Bloom FE, Roth RH, 6th ed., pp.190-213. Oxford University Press, Oxford.
11. Cuddon PA: 2002, Acquired canine peripheral neuropathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 32: 207-249.
12. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Feather-Stone RM: 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 21: 88-95.
13. Ferreira ALA, Matsubara LS: 1997, Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. [Free radicals: concepts, diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras* 43: 61-68. In Portuguese.
14. Gilman SC, Bonner MJ, Pellmar TC: 1993, Effect of oxidative stress on excitatory amino acid release by cerebral cortical synaptosomes. *Free Radic Biol Med* 15: 671-675.

15. Guzmán DC, Mejía GB, Vásquez IE, et al.: 2005, Effect of testosterone and steroids homologues on indolamines and lipid peroxidation in rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94: 369-373.
16. Hamilton TA, Cook JR, Braund KG, et al.: 1991, Vincristine-induced peripheral neuropathy in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1984: 635-638.
17. Jameson RR, Seidler FJ, Slotkin TA: 2007, Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. *Environ Health Perspect* 115: 65-70.
18. Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK: 1996, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 20: 251-256.
19. Manolagas SC, Kousteni S: 2001, Perspective: nonreproductive sites of action of reproductive hormones. *Endocrinology* 142: 2200-2204.
20. Marcel V, Palacios LG, Pertuy C, et al.: 1998, Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochem J* 329: 329-334.
21. Massoulié J, Anselmet A, Bon S, et al.: 1999, The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem Biol Interact* 119-120:29-42.

22. McClelland RB: 1963, Cyclophosphamide therapy in lymphoma of the dog. *Cornell Vet* 53: 319-322.
23. McGehee DS, Krasowski MD, Fung DL, et al.: 2000, Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurium metabolism. *Anesthesiology* 93: 510-511.
24. McKnight JA: 2003, Principles of Chemotherapy. *Clin Tech Small Anim Pract* 18: 67-72.
25. Morley JE, Thomas DR, Wilson MMG: 2006, Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr* 83: 735-743.
26. Nak D, Nak Y, Cangul IT, Tuna B: 2005, A clinical-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J Vet Med* 52: 366-370.
27. Nelson RW, Couto CG: 2006. Distúrbios da micção. In: *Medicina Interna de Pequenos Animais [Small Animal Internal Medicine]*, Nelson RW, Couto CG, 3rd ed, pp. 625-633. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. In Portuguese.
28. Norris AM, Withrow SJ: 1984, A review of cancer chemotherapy for pet animals. *Can Vet J* 25: 153-157.
29. Perez RR, Silva MAML, Varzim FLSB, et al: 2005, A ação do decanoato de nandrolona (Deca Durabolin) sobre parâmetros hematológicos e proteína total

plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin) [Nandrolone decanoate (Deca Durabolin) effect on hematologic parameters and total plasma protein of rats (*Rattus rattus*) with depressed bone marrow induced by vincristine (Oncovin)]. Cienc Rural 35: 589-595. Abstract in English.

30. Poncé F, Magnol JP, Ledieu D, et al.: 2004, Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. J Small Anim Pract 167: 158-166.

31. Rocha JBT, Emanuelli T, Pereira ME: 1993, Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. Acta Neurobiol Exp 53: 431-437.

32. Rodaski S, Nardi AB: 2006, Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos [Chemotherapy anticancer for dogs and cats], 2nd ed., 308p, Bio Editora, Curitiba, PR, Brazil. In Portuguese.

33. Rogers KS, Walker MA, Dillon HB: 1998, Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. J Am Anim Hosp Assoc 34: 463-470.

34. Rovere DF, Granta A, Broccio M, et al.: 1995, Hemoglobin oxidative stress in cancer. Anticancer Res 15: 2089-2095.

35. Saitoh T, Morimoto K, Kumagai T, et al.: 1999, Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senescence accelerated rats. *Mech Ageing Dev* 109: 125-139.
36. Seaman RL, Patton CS: 2003, Treatment of Renal Nephroblastoma in a Adult Dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 39: 76-79.
37. Soreq H, Seidman S: 2001, Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2: 8-17.
38. Tam NN, Ghatak S, Ho SM: 2003, Sex hormone-induced alterations in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in the prostate of Noble rats. *Prostate* 55: 1-8.
39. Thiermann H, Szinicz L, Eyer P, et al.: 2005, Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem Biol Interact* 157-158: 345-347.
40. Vedder H, Anthes N, Stumm G, et al.: 1999, Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *J Neurochem* 72: 2531-2538.
41. Villalobos A: 2006, Dealing with chemotherapy extravasations: a new technique. *J Am Anim Hosp Assoc* 42: 321-325.

42. Wajner M, Latini A, Wyse ATS, Dutra-Filho CS: 2004, The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27: 427-448.
43. Whittaker JA, Parry DH, Bunch C, Weatherall DJ: 1973, Coma associated with vincristine therapy. *Br Med J* 4: 335-337.
44. Worek F, Mast U, Kinderlen D, et al.: 1999, Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 288: 73-90.
45. Zimmerman G, Soreq H: 2006, Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res* 326: 655-669.

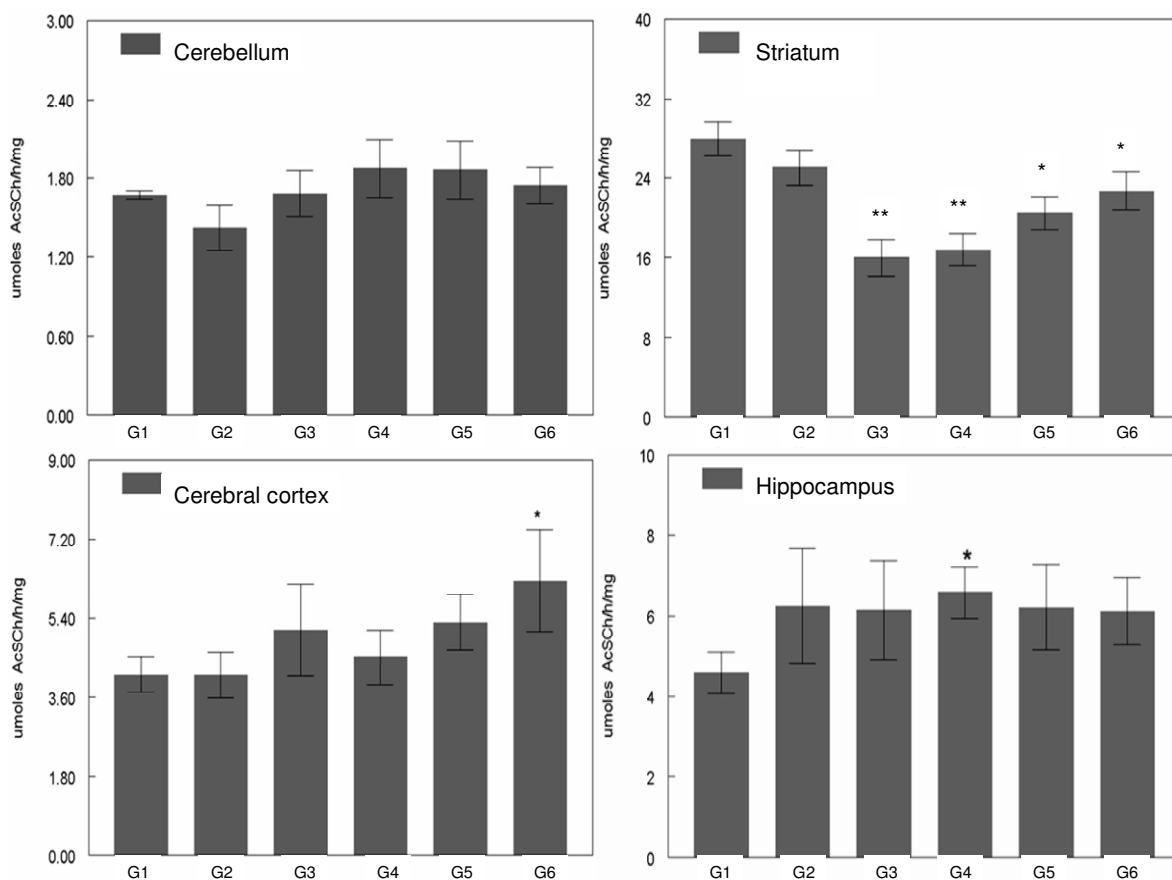


FIGURE 1 – Acetylcholinesterase activity in cerebellum, striatum, cerebral cortex and hippocampus of rats submitted to different treatments: G1 (control), G2 (vincristine – 4 mg m²), G3 (nandrolone decanoate - 1.8 mg kg⁻¹), G4 (nandrolone decanoate - 10 mg kg⁻¹), G5 (vincristine – 4 mg m² + nandrolone decanoate - 1.8 mg kg⁻¹) and G6 (vincristine - 4 mg m² + nandrolone decanoate - 10 mg kg⁻¹). Bars represent mean ± SEM. (*) indicates a significant difference at p < 0.05, (**) indicates a significant difference at p < 0.01; (n=5).

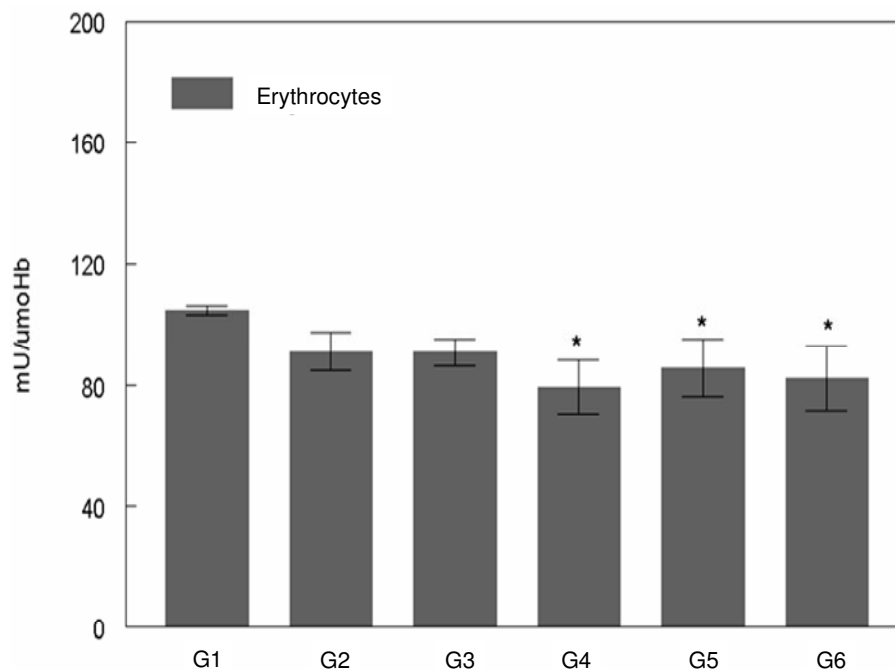


FIGURE 02 – Erythrocyte acetylcholinesterase activity (RBC-AChE) of rats submitted to different treatments: G1 (control), G2 (vincristine – 4 mg m²), G3 (nandrolone decanoate - 1.8 mg kg⁻¹), G4 (nandrolone decanoate -10 mg kg⁻¹), G5 (vincristine – 4 mg m² + nandrolone decanoate - 1.8 mg kg⁻¹) and G6 (vincristine – 4 mg m² + nandrolone decanoate - 10 mg kg⁻¹). Bars represent mean ± SEM. (*) indicates a significant difference at p < 0.05; (n=5).

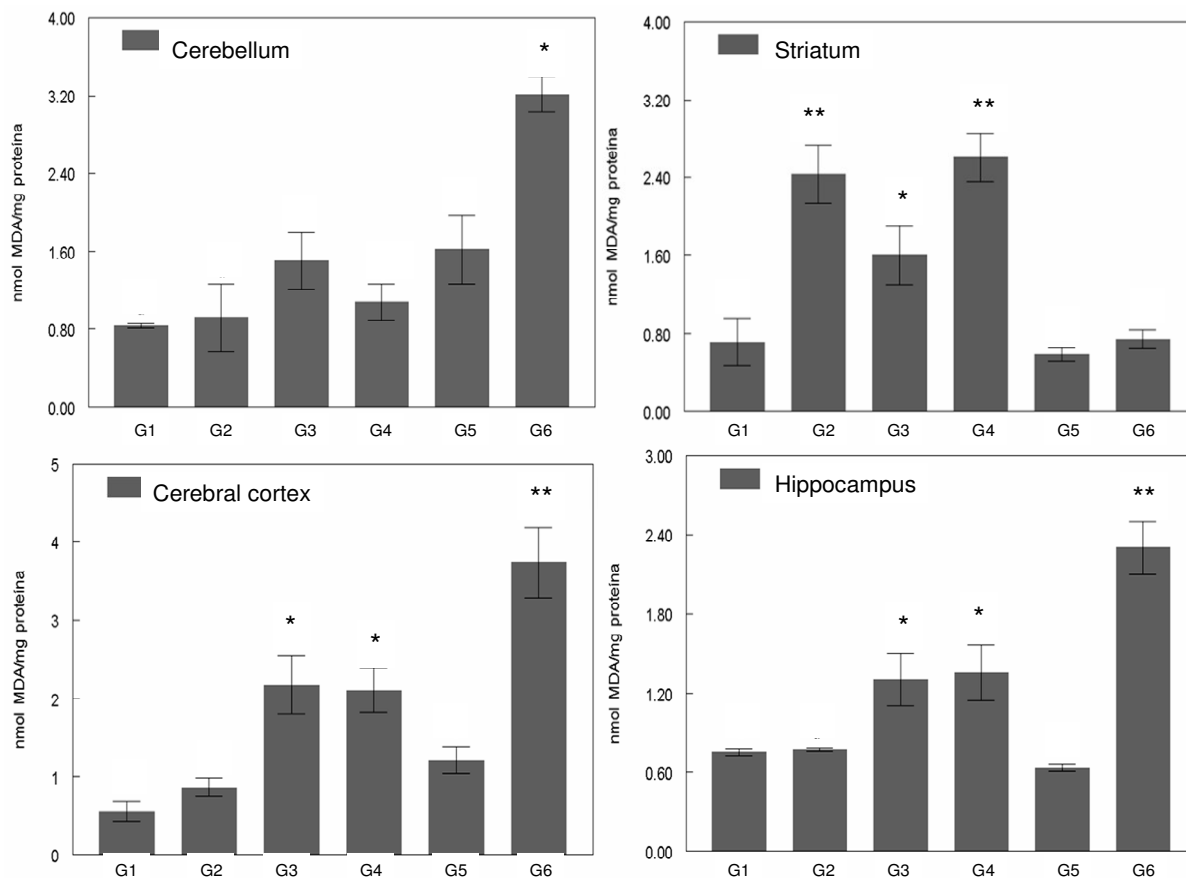


FIGURE 03 – Mean values of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) for the evaluation of brain tissue (cerebellum, striatum, cerebral cortex and hippocampus) of rats submitted to different treatments: G1 (control), G2 (vincristine – 4 mg m²), G3 (nandrolone decanoate - 1.8 mg kg⁻¹), G4 (nandrolone decanoate - 10 mg kg⁻¹), G5 (vincristine – 4 mg m² + nandrolone decanoate - 1.8 mg kg⁻¹) and G6 (vincristine - 4mg m² + and nandrolone decanoate - 10 mg kg⁻¹). Bars represent mean ± SEM. (*) indicates a significant difference at p < 0.05, (**) indicates a significant difference at p < 0.01; (n=5).

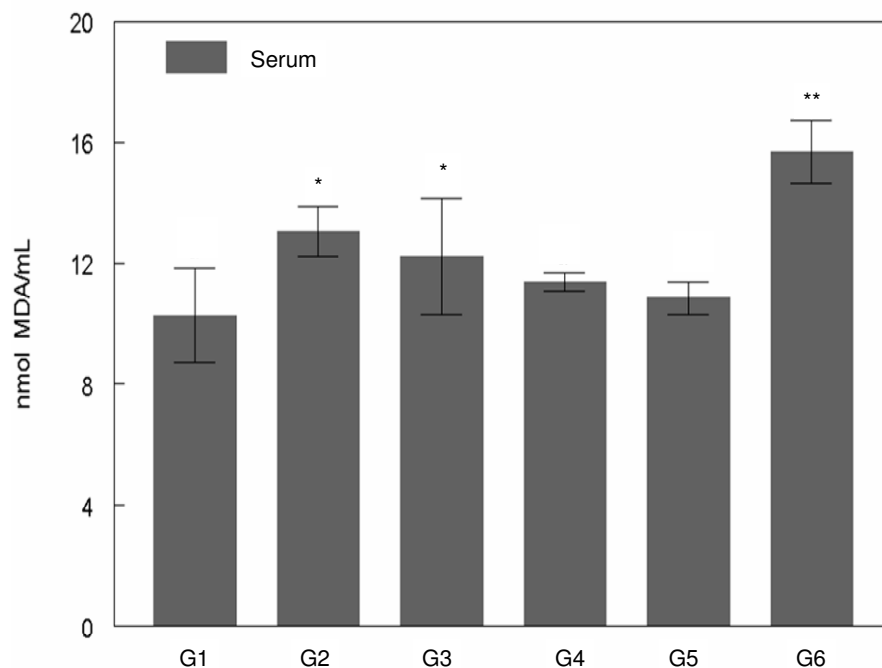


FIGURE 04 – Mean values of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) for the evaluation of blood serum of rats submitted to different treatments: G1 (control), G2 (vincristine – 4 mg m²), G3 (nandrolone decanoate -1.8 mg kg⁻¹), G4 (nandrolone decanoate - 10 mg kg⁻¹), G5 (vincristine – 4 mg m² + nandrolone decanoate - 1.8 mg kg⁻¹) and G6 (vincristine – 4 mg m² + nandrolone decanoate - 10 mg kg⁻¹). Bars represent mean ± SEM. (*) indicates a significant difference at p < 0.05, (**) indicates a significant difference at p < 0.01; (n=5).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, com a melhora na qualidade de vida, e conseqüente longevidade dos animais de estimação, aumentou o número de doenças neoplásicas. Por isso, é relevante o conhecimento das possíveis ações que os fármacos utilizados na Oncologia Animal possam exercer nos diferentes órgãos do paciente. Neste contexto, pode-se citar o sulfato de vincristina, um quimioterápico popular em Medicina Veterinária, em especial para o tratamento do tumor venéreo transmissível canino, e o decanoato de nandrolona (DN), um esteróide anabólico androgênico que tem sido utilizado recentemente com o propósito de reverter a anemia causada pelo agente anti-tumoral. Os efeitos de ambas as substâncias sobre o cérebro ainda são pouco estudados, principalmente, quando usados concomitantemente. Assim, este trabalho se propôs ao estudo destes dois medicamentos, usados isoladamente ou em conjunto, sobre o sistema colinérgico e a peroxidação lipídica de ratos Wistar, com o intuito de se obter melhor compreensão dos seus efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC).

Esta dissertação verificou que apesar da barreira-hematoencefálica ser um selecionador natural, ambos os medicamentos estudados afetam o SNC. Apesar de o DN ser o responsável pela alteração da maioria dos parâmetros pesquisados, os resultados obtidos com o sulfato de vincristina também chamam a atenção.

Os dois manuscritos permitem uma melhor compreensão do papel do DN no sistema colinérgico. As diferentes doses utilizadas, além, dos tempos de aplicação distintos auxiliam em uma investigação mais fidedigna sobre a interação deste éster em partes distintas do cérebro. O primeiro manuscrito, demonstra que este esteróide anabólico androgênico é capaz de aumentar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) quando utilizado isoladamente, em sobredoses e por três semanas. Já o segundo trabalho, mostra uma ação inibitória do DN na atividade da enzima estudada, na forma combinada à vincristina (dose terapêutica e sobredose) e ainda, valores significativamente mais baixos quando usado isoladamente (dose terapêutica e sobredose). Estes dados foram obtidos no estriado, uma estrutura cerebral onde a AChE foi hiperestimulada no primeiro manuscrito. Ainda no primeiro experimento, também se verificou que a AChE não sofreu modificação na sua atividade no hipocampo e no córtex cerebral. Todavia, no segundo manuscrito, a

sobredose do esteróide, sozinho ou combinado, estimulou a atividade acetilcolinesterásica nestas duas partes cerebrais. Nota-se, deste modo, que o DN e suas associações com a vincristina interagem com o sistema colinérgico, já que há alteração na atividade da AChE. Contudo, esta alteração enzimática poderia interferir também na disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica, ou mesmo, na estimulação anormal dos receptores colinérgicos.

A aplicação única de vincristina, na dose utilizada, não afeta o sistema colinérgico. A associação do anti-neoplásico com a sobredose do DN também aumentou a atividade da enzima, demonstrando uma ação potencializadora pela interação medicamentosa, já que quando utilizados isoladamente estes fármacos não influenciaram o comportamento da AChE.

Com os dados obtidos no trabalho no segundo manuscrito, percebeu-se que a RBC-AChE é capaz de refletir o estado da sinapse em uma das estruturas mais representativas do sistema colinérgico, o estriado. Desta forma, pode-se dizer que esse é um bom método de verificação da atividade acetilcolinesterásica, além de ter uma colheita extremamente acessível tanto aos animais quanto aos humanos.

Ainda no segundo manuscrito, o uso singular ou combinado dos fármacos aplicados foi capaz de induzir a produção de radicais livres. Das quatro partes cerebrais estudadas, a dose terapêutica, sobredose e associação da sobredose do DN foram capazes de aumentar a peroxidação lipídica em três destas estruturas, enquanto que o sulfato de vincristina em uma.

Surpreendentemente, a associação da dose terapêutica do éster com a dose usada do anti-neoplásico evitou a ação dos radicais livres no tecido cerebral. Esta combinação torna-se benéfica ao impedir a formação dos produtos resultantes da peroxidação dos lipídeos que podem ocasionar desde degeneração de membranas e componentes celulares, até mesmo a morte celular.

A mensuração do perfil oxidativo pelo soro sanguíneo também apresentou colheita prática e acessível. Com exceção da sobredose do DN, os grupos que diferiram estatisticamente na produção das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram similares aqueles do tecido cerebral.

O fato de a vincristina ter produzido peroxidação lipídica, tanto no estriado quanto no soro sanguíneo, poderia resultar em morte de células saudáveis. Porém, esta reação, de certa forma, também poderia contribuir para a indução de apoptose da célula tumoral, reduzindo sua viabilidade.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo trouxe esclarecimentos sobre a ação do sulfato de vincristina e do decanoato de nandrolona (DN) no sistema colinérgico e no perfil oxidativo de ratos, tais como:

Manuscrito 1: as sobredoses utilizadas são capazes de estimular a atividade da acetilcolinesterase (AChE) a nível de estriado e cerebelo, interferindo, assim, com a neurotransmissão e modulação colinérgica;

Manuscrito 2: ambos os medicamentos pesquisados, sulfato de vincristina e DN, afetam o Sistema Nervoso Central;

- o uso único de vincristina não altera a atividade da AChE cerebral. Porém, o DN sozinho e/ou combinado ao quimioterápico altera o comportamento da AChE, inibindo-a (como no estriado), ou estimulando-a (como no hipocampo e córtex cerebral). Assim, o DN e suas associações com a vincristina interagem com o sistema colinérgico, pois existe alteração na atividade da AChE. A mudança na atividade acetilcolinesterásica pode interferir também na disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica, ou em uma resposta mais alta ou mais baixa por parte dos receptores colinérgicos;

- a AChE eritrocitária (RBC-AChE) apresenta atividade inibitória na sobredose do éster, além de suas associações com a vincristina. Estes resultados comprovam que a RBC-AChE é capaz de refletir o estado da sinapse, pois apresentou resultados similares a uma das estruturas mais ricas em vias colinérgicas, o estriado, o que a torna acessível para uso em animais e humanos.

- a peroxidação lipídica do cérebro aumenta com o uso isolado de vincristina (estriado) e do DN (estriado, hipocampo e córtex cerebral) e na associação da sobredose do éster (cerebelo, hipocampo e córtex cerebral) com o agente anti-tumoral. Entretanto, associação da dose terapêutica do DN com a vincristina não apresenta níveis significativos de radicais livres em nenhuma das estruturas estudadas. Logo, sugere-se que esta combinação seja benéfica, pois ao impedir a presença da peroxidação lipídica, evita os possíveis efeitos desta reação no

organismo, tais como degeneração de membranas e componentes celulares, até mesmo a morte celular;

- a dosagem utilizada de vincristina já é suficiente para a produção de radicais livres no tecido cerebral, o que pode acarretar em morte de células saudáveis. Entretanto, sugere-se que a presença da peroxidação lipídica também auxilie o medicamento na indução de apoptose da célula tumoral, já que esta reação diminui a viabilidade celular;

Correlação do Manuscrito 1 com o Manuscrito 2: a atividade da AChE cerebral é dependente da dose-tempo em que o DN é administrado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLBOM, E.; PRINS, G.S.; CECCATELLI, S. Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. **Brain Research**, v.892, n.2, p.255-262, 2001.

ALDUNATE, R. et al. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**, v.47, p.96-104, 2004.

ANDRADE, S.F. Terapêutica antineoplásica. In:_____. **Manual de terapêutica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, Cap.9, 2002. p.179-198.

BAGCHUS, W.M. Pharmacokinetic evaluation of three different intramuscular doses of nandrolone decanoate: analysis of serum and urine samples in healthy men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, n.5, p.2624-2630, 2005.

BASARIA, S.; WAHLSTROM, J.T.; DOBS, A.S. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n.11, p.5108-5117, 2001.

BHASIN, S. et al. The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.58, p.1103-1110, 2003.

BENCHEKROUN, M.N.; ROBERT, J. Measurement of doxorubicin-induced lipid peroxidation under the conditions that determine cytotoxicity in cultured tumor cells. **Analytical Biochemistry**, v.201, n.2, p.326-330, 1992.

BERMUDEZ, M. et al. Itraconazole-related increased vincristine neurotoxicity: case report and review of literature. **Journal of Pediatric Hematology and Oncology**, v.27, p.389-392, 2005.

BERNHARDI, R.V. et al. Blood cells cholinesterase activity in early Alzheimer's disease and vascular dementia. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.19, p.204-212, 2005.

BÖHME, A.; GANSER, A.; HOELZER, D. Aggravation of vincristine-induced neurotoxicity by itraconazole in the treatment of adult ALL. **Annals of Hematology**, v.71, n.6, 1995.

BRÄNNVALL, K. et al. 19-nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v.21, n.4, p.871-878, 2005.

BRÄNNVALL, K. **Hormonal regulation of neural stem cell proliferation and fate determination**, 2004. 63 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de Uppsala, Suécia.

BRAUGHLER, J.M. et al. Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.22, p.10438-10440, 1987.

CASTLE, M.C.; MARGILETH, D.A.; OLIVERIO, V.T. Distribution and excretion of [³H] vincristine in the rat and the dog. **Cancer Research**, v.36, p.3684-3689, 1976.

CAVE, T.A.; NORMAN, P.; MELLOR, D. Cytotoxic drug use in treatment of dogs and cats with cancer by UK veterinary practices (2003 to 2004). **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p.371-377, 2007.

CHEN, J.H.; HALES, C.N.; OZANNE, S.E. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? **Nucleic Acids Research**, v.35, n.22, p.7417-7428, 2007.

CLARK, A.S.; HENDERSON, L.P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 27, n.5, p.413-436, 2003.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Acetylcholine. In:_____ **The biochemical basis of neuropharmacology**. 6th ed. Oxford: Oxford University Press, p.190-213, 1991.

CUDDON, P.A. Acquired canine peripheral neuropathies. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.32, p.207-249, 2002.

CUERDA, C. et al. Treatment with nandrolone decanoate and megestrol acetate in HIV-infected men. **Nutrition in Clinical Practice**, v.20, n.1, p.93-97, 2005.

CUNHA, T.S. et al. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.50, n.3, p.532-540, 2006.

CUSUMANO, A.M. et al. Tratamiento de la anemia en pacientes en hemodiálisis crónica con dosis bajas de eritropoyetina recombinante asociada o no a andrógenos. **Revista de Nefrología, Diálisis y Transplante**, n.41, p.7-12, 1996.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v.68, p.1545-1555, 2001.

DAY, T.; GREENFIELD, S.A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurons in vitro: molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 111, p.649-656, 2002.

DESCARRIES, L.; GISIGER, V.; STERIADE, M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Progress in Neurobiology**, v.53, p.603-325, 1997.

DONOSO, J.A.; HASKINS, K.M.; HIMES, R.H. Effect of microtubule-associated proteins on the interaction of vincristine with microtubules and tubulin. **Cancer Research**, v.39, p.1604-1610, 1979.

DRAKELEY, A.; GAZVANI, R.; LEWIS-JONES, I. Duration of azoospermia following anabolic steroids. **Fertility and Sterility**, v.81, n.1, p.226, 2004.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.21, n.19, p.88-95, 1961.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, n.10, p.872-879, 2002.

FRIZON, F.; MACEDO, S.M.D.; YONAMINE, M. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Fundo - RS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.26, n.4, p.227-232, 2005.

FELDMAN, R.S.; QUENZER, L.F. **Fundamentals of neuropsychopharmacology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1984. 528 p.

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.

GHAPHERY, N.A. Performance-enhancing drugs. **Orthopedic Clinics of North America**, v.26, p.433-442, 1995.

GIDDING, C.E.M. et al. Vincristine revisited. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v.29, p.267-287, 1999.

GILMAN, S.C.; BONNER, M.J.; PELLMAR, T.C. Effect of oxidative stress on excitatory amino acid release by cerebral cortical synaptosomes. **Free Radical in Biology and Medicine**, v.15, n.6, p.671-675, 1993.

GRISARU, D. et al. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**, v.264, p.272-286, 1999.

GUZMÁN, D.C. et al. Effect of testosterone and steroids homologues on indolamines and lipid peroxidation in rat brain. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.94, p.369-373, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. New York: Oxford University, 1999. 936 p.

HALL, R.C.W.; HALL, R.C.; CHAPMAN, M.J. Psychiatric complications of anabolic steroid abuse. **Psychosomatics**, v.46, n.4, 285-290, 2005.

HAMILTON, T.A. et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.198, n.4, p.635-638.

HUGHES JR, T.K.; RADY, P.L.; SMITH, E.M. Potential for the effects of anabolic steroid abuse in the immune and neuroendocrine axis. **Journal of Neuroimmunology**, v.83, p.162-167, 1998.

IRIART, J.A.B.; ANDRADE, T.M. Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.5, 1379-1387, 2002.

JAMESON, R.R.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n.1, p. 65-70, 2007.

JENTZSCH, A.M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical in Biology and Medicine**, v.20, n.2, p.251-256, 1996.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, supl.2, p.46-51, 2003.

JOHANSSON, P. et al. The effect on opioid peptides in the rat brain, after chronic treatment with the anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate. **Brain Research Bulletin**, v.51, n.5, p. 413-8, 2000.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at peripheral anionic site. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 258, p. 758-762, 1999.

KAUFER, D. et al. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. **Nature**, v.393, n.28, p.373-377, 1998.

KENNY, A.M. et al. Effects of testosterone on behavior, depression, and cognitive function in older men with mild cognitive loss. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.59, p.75-78, 2004.

KINDLUNDH, A.M.S. et al. The anabolic-androgenic steroid nandrolone decanoate affects the density of dopamine receptors in the male rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v.13, n.2, p.291-296, 2001.

LARSSON, C.E. et al. Terapêutica tópica e sistêmica: pele, ouvido e olho. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002. Cap.8, p.116-178.

LINDQVIST, A.S. **Nandrolone decanoate, behaviour and brain: animal experimental studies**, 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Psicologia) - Faculdade de Psicologia, Universidade de Göteborg, Suécia.

LISE, M.L.Z. et al. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.45, n.4, p.364-370, 1999.

LU, P.H. et al. Effects of testosterone on cognition and mood in male patients with mild Alzheimer disease and healthy elderly men. **Archives of Neurology**, v.63, n.2, p.177-185, 2006.

LUCIDI, C.A.; TAKAHIRA, R.K. Uso do estimulante de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.915, 920, 2007.

LUKAS, S.E. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. **Trends on Pharmacology Science**, v.14, n.2, p.61-68, 1993.

MAEDA, K. et al. A massive dose of vincristine. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v.17, p.247-253, 1987.

MANOLAGAS, S.C.; KOUSTENI, S. Perspective: nonreproductive sites of action of reproductive hormones. **Endocrinology**, v.142, n.6, p.2200-2204, 2001.

MARCEL, V. et al. Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. **The Biochemical Journal**, v.329, p.329-334, 1998.

MASSOULIÉ, J. et al. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. **Chemico-Biological Interactions**, v.v.119-120, p.29-42, 1999.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v.41, p.31-91, 1993.

MATTSON, M.P. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. **Trends in Neuroscience**, v.21, n.2, p.53-57, 1998.

MATTSSON, J.L. et al. Reanalysis with optimized power of red blood cell acetylcholinesterase activity from a 1-year dietary treatment of dogs to chlorpyrifos. **Toxicology**, v.160, p.155-164, 2001.

MAZZANTI, C.M.A. **Efeito do interferon beta, da ciclosporina A, do ebselen e da vitamina E no sistema colinérgico e purinérgico de ratos normais e submetidos**

à desmielinização pelo brometo de etídio, 2007. 160 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAZZANTI, C.M. et al. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.803-807, 2004.

McCLELLAND, R.B. Cyclophosphamide therapy in lymphoma of the dog. **Cornell Veterinarian**, v.53, p.319-322, 1963.

McGEHEE, D.S. et al. Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurium metabolism. **Anesthesiology**, v.93, p. p.510-511, 2000.

McKNIGHT, J.A. Principles of Chemotherapy. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, n.2, p.67-72, 2003.

MELNIK, B.; JANSEN, T.; GRABBE, S. Abuse of anabolic-androgenic steroids and bodybuilding acne: an underestimated health problem. **Journal of the German Society of Dermatology**, v.5, n.10, p.110, 2007.

MESHORER, E.; BITON, I.E.; BEN-SHAUL, Y.; BEN-ARI, S.; ASSAF, Y.; SOREQ, H.; COHEN, Y. Chronic cholinergic imbalances promote brain diffusion and transport abnormalities. **The FASEB Journal**, v.19, p.910-922, 2005.

MESULAM, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, v.110, p.627-639, 2002.

MINTO, C.F. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nandrolone esters in oil vehicle: effects of ester, injection site and injection volume. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.281, p.93-102, 1997.

MORLEY, J.E.; THOMAS, D.R.; WILSON, M.M.G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.735-743, 2006.

MUIR, J.L.; EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function. **Journal of Neuroscience**, v.14, n.4, p. 2313-2326, 1994.

MUZYLAŁ, M.; MASLINSKA, D. Neurotoxic effect of vincristine on ultrastructure of hypothalamus in rabbits. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.30, n.3, p.113-117, 1992.

NAK, D. et al. A clinical-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, 366-370, 2005.

NARDI, A.B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios da micção. In:_____. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 48, p. 625-633.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical in Biology and Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312.

NORRIS, A.M.; WITHROW, S.J. A review of cancer chemotherapy for pet animals. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 25, n.4, p.153-157, 1984.

NUNES-TAVARES, N. et al. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.34, n.9, p.1071-1079, 2002.

ODA, Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathology International**, v.49, p.921-937, 1999.

OLBY, N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p.399-407, 1999.

PAPAZISIS, G. et al. Anabolic androgenic steroid abuse and mood disorder: a case report. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.10, n.2, 291-293, 2007.

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

PERRY, E. et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends in Neuroscience**, v.22, n.6, p.273-280, 1999.

PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Changes in brain testosterone and allopregnanolone biosynthesis elicit aggressive behaviour. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.6, p.2135-2140, 2005.

PONCÉ, F. et al. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **Journal of Small Animal Practice**, v.167, p.158-166, 2004.

RAO, G.M. et al. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. **Clinica Chimica Acta**, v.296, n.1-2, p.203-212, 2000.

ROCHA, J.B.T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M.E. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, n.53, p.431-437, 1993.

RODASKI, S.; NARDI, A.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. 2 ed. Curitiba: Bio, 2006. 308 p.

ROGERS, K.S.; WALKER, M.A.; DILLON, H.B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.34, p.463-470, 1998.

ROSA E SILVA, A.C.J.S.; SILVA DE SÁ, M.F. Efeitos dos esteróides sexuais sobre o humor e a cognição. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.33, n.2, p.60-67, 2006.

ROVERE, D.F. et al. Hemoglobin oxidative stress in cancer. **Anticancer Research**, v.15, p.2089-2095, 1995.

SAITOH, T. et al. Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senesce accelerated mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.109, p.125-139, 1999.

SANTOS, A.M. **O mundo anabólico**: análise do uso de esteróides anabólicos nos esportes. 2 ed. Barueri: Manole, 2007. 1360 p.

SCHOLS, A.M.W.J. Nutritional and metabolic modulation in chronic obstructive pulmonary disease management. **European Respiratory Journal**, v.22, supl. 46, p.81-86, 2003.

SEAMAN, R.L.; PATTON, C.S. Treatment of Renal Nephroblastoma in a Adult Dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.39, p. 76-79, 2003.

SHEASHAA, H. et al. Use of nandrolone decanoate as an adjuvant for erythropoietin dose reduction in treating anemia in patients on hemodialysis. **Nephron Clinical Practice**, v.99, p.102-106, 2005.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 1314 p.

SKAU, K.A. Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocytes of laboratory animals. **Comparative Biochemistry and Physiology – Comparative Pharmacology**, v.80, p.207-210, 1985.

SKLAN, E.H. et al. Acetylcholinesterase modulates stress-induced motor responses through catalytic and noncatalytic properties. **Biological Psychiatry**, v.60, n.7, p.741-751, 2006.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews - Neuroscience**, v.2, p.8-17, 2001.

SUSSMAN, J.L. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v.253, p.872-879, 1991.

TAM, N.N.; GHATAK, S.; HO, S.M. Sex hormone-induced alterations in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in the prostate of Noble rats. **Prostate**, v.55, n.1, p.1-8, 2003.

TAMAKI, T. et al. Nandrolone decanoate enhances hypothalamic biogenic amines in rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.35, n.1, p.32-38, 2003.

TAYLOR, P.; BROWN, J.H. Acetylcholine. In: SIEGEL, G.J. et al. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p.214-242.

THIERMANN, H. et al. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. **Chemico-Biological Interactions**, v.157-158, p.345-347, 2005.

VANDERSCHUEREN, D. et al. Androgens and bone. **Endocrinology reviews**, v.25, n.3, p.389-425, 2004.

VEDDER, H. et al. Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v.72, n.6, p.2531-2538, 1999.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v.27, n.4, p.655-660, 2004.

VIEIRA, R.P. **Estudo do Decanoato de Nandrolona sobre o fígado de ratos Wistar**. 2003. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo.

VILLALOBOS, A. Dealing with chemotherapy extravasations: a new technique. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.42, p. 321-325, 2006.

WHITTAKER, J.A. et al. Coma associated with vincristine therapy. **British Medical Journal**, v.4, p.335-337, 1973.

WILSON, J.D. Androgens. In: GILMAN, A.G. et al. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed. Singapura: McGraw-Hill, 1996. p.1441-1457.

XIE, H.Q. et al. Regulation of a transcript encoding the proline-rich membrane anchor of globular muscle acetylcholinesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.16, p.11765-11775, 2007.

WAJNER, M. et al. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.27, p.427-448, 2004.

WHITTAKER, J.A. et al. Coma associated with vincristine therapy. **British Medical Journal**, v.4, p.335-337, 1973.

WOREK, F. et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v.288, p.73-90, 1999.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. **Cell Tissue Research**, v.326, p.655-669, 2006.