

## **ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM RATOS TRATADOS COM SULFATO DE VINCRISTINA E DECANOATO DE NANDROLONA**

**MARTINS, D.B.<sup>1</sup>; LOPES, S.T.A.<sup>1</sup>; MAZZANTI, C.M.<sup>2</sup>; SPANEVELLO, R.<sup>3</sup>; SCHMATZ, R.<sup>2</sup>; CORRÊA, M.<sup>2</sup>; STEFANELLO, N.<sup>2</sup>; SCHETINGER, M.R.C.<sup>2</sup>; MORSCH, V.<sup>2</sup>; LANCINI, A.R.<sup>1</sup>; TEIXEIRA, L.V.<sup>1</sup>; ROSA, S.Z.<sup>1\*</sup>**

### **INTRODUÇÃO**

A seleção do protocolo medicamentoso adequado para cada paciente oncológico é um ponto crítico para o sucesso do tratamento anti-tumoral (McKNIGHT, 2003). O decanoato de nandrolona é um esteróide anabólico androgênico (EAA), derivado da testosterona, que possui vasta utilização na clínica médica. Sua indicação serve tanto para reverter a caquexia presente nos pacientes com câncer quanto com outras doenças crônicas (BASARIA et al., 2001; MORLEY et al., 2006). 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 discreta supressão medular por quimioterápicos, tais como a vincristina (PEREZ et al., 2005). Dentre os efeitos colaterais causados pela vincristina se pode citar 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 periférica e, mais raramente, central (WHITTAKER et al., 1973; HAMILTON et al., 1991; CUDDON, 2002).

A duração do efeito de vários medicamentos é dependente de sua quebra por enzimas hidrolíticas endógenas, como por exemplo, a acetilcolinesterase (AChE - E.C. 3.1.1.7). Esta enzima participa da inativação de diversos xenobióticos, tais como ésteres (por exemplo, o decanoato de nandrolona) e alcalóides de plantas (sulfato de vincristina) (McGEHEE et al., 2000). A AChE é uma das mais eficientes catálises biológicas e têm um papel vital no sistema nervoso e junções neuromusculares, por hidrolisar rapidamente o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas (MASSOULIÉ et al., 1999). 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 (MARCEL et al., 1998). Em adição, a concentração de AChE no sangue (RBC -AChE) pode funcionar como um bom marcador periférico para estudar desordens neurotóxicas e neurodegenerativas, pois permite avaliar através de métodos mais acessíveis a ação desta enzima no sistema nervoso central (SNC) (BERNHARDI et al., 2005). Também é interessante ressaltar que

---

<sup>1</sup> Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Email: [vetdanielmartins@yahoo.com.br](mailto:vetdanielmartins@yahoo.com.br). \*Apresentador do trabalho.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-9000, Santa Maria, RS, Brasil.

a RBC-AChE tem demonstrado propriedades funcionais e estruturais similares àquelas da AChE do cérebro (THIERMANN et al., 2005).

Neste contexto, considerando que o sulfato de vincristina é um quimioterápico bastante usado na clínica médica de pequenos animais e que o decanoato de nandrolona tem sido utilizado em associação a este medicamento para amenizar alguns de seus efeitos colaterais como a citotoxicidade (PEREZ et al., 2005), este estudo objetivou verificar a atividade da AChE encefálica e eritrocitária de ratos normais, tratados com sulfato de vincristina e diferentes doses de decanoato de nandrolona. O conhecimento sobre possíveis toxicidades decorrentes de interações medicamentosas é de extrema importância para o clínico. Assim, efeitos colaterais poderão ser identificados e tratados, e em alguns casos, prevenidos, a fim de assegurar o bem-estar do animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 ratos adultos Wistar, machos, pesando entre 260 a 360 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O período de adaptação foi de 14 dias e as dietas sólida e hídrica fornecidas *ad libitum*.

Os animais foram divididos, de forma aleatória, em seis grupos com cinco animais cada. Os tratamentos foram aplicados uma vez por semana, durante duas semanas. A colheita das amostras ocorreu na terceira semana. Durante a primeira semana aplicou-se nos grupos: G1 (controle) – solução fisiológica (SF), G2 – sulfato de vincristina ( $4 \text{ mg m}^2$ ), G3 – SF, G4 – SF, G5 – sulfato de vincristina ( $4 \text{ mg m}^2$ ) e G6- sulfato de vincristina ( $4 \text{ mg m}^2$ ). Na segunda semana foi aplicado: G1 (controle) – SF novamente, G2 – SF, G3 – decanoato de nandrolona ( $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ), G4 – decanoato de nandrolona ( $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), G5 – decanoato de nandrolona ( $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e G6 - decanoato de nandrolona ( $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

A dosagem de vincristina foi baseada em PEREZ et al. (2005). As dosagens de decanoato de nandrolona correspondem à dose terapêutica para pequenos animais ( $1,8 \text{ mg kg}^{-1}/\text{semana}$ ) (NELSON & COUTO, 2006) e à sobredose ( $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ). A vincristina foi aplicada intraperitonealmente (IP). O decanoato de nandrolona foi diluído em veículo oleoso de origem vegetal (azeite de oliva), previamente testado e que não influenciou os parâmetros analisados, adequado para aplicação via intramuscular profunda (IM).

Após o período de tratamento os animais foram deixados em jejum alimentar de 12 horas e após submetidos à eutanásia em campânula com éter etílico. O sangue foi colhido por punção cardíaca e colocado em frascos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As estruturas encefálicas foram separadas em cerebelo, córtex, estriado e hipocampo, e homogeneizadas isoladamente em Médiun I e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos. O sangue total foi homogeneizado com tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) contendo Triton X – 100 (0.03%) e estocado a  $-20^\circ\text{C}$  por uma semana para posterior avaliação enzimática.

A atividade da AChE foi determinada pelo estudo de ELLMAN et al. (1961), modificado por ROCHA et al. (1993) em cada uma das estruturas do encefálo. A atividade da AChE eritrocitária também foi determinada pelo estudo de ELLMAN et al. (1961), porém modificada por WOREK et al. (1999). A enzima de origem encefálica foi expressa em  $\mu\text{moles AcScCh/h/mg}$  de

proteína. A atividade específica da AChE dos glóbulos vermelhos foi calculada a partir do quociente entre a atividade da AChE e a quantidade total de hemoglobina contida, e os resultados medidos em mU/ $\mu$  mol Hb.

Para a análise estatística utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de testes de comparações múltiplas de Duncan ( $p < 0.05$ ). Os resultados foram expressos por média  $\pm$  erro padrão da media (EPM).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados nas Figuras 1 e 2 para a atividade acetilcolinesterásica encefálica e eritrocitária, respectivamente.

Um importante dado observado neste estudo, é que no estriado, uma estrutura rica em vias colinérgicas houve uma inibição significativa ( $p < 0.05$ ) na atividade da AChE nos grupos G3, G4, G5 e G6 (Figura 1). Nesta região, sugere-se que exista interferência do decanoato de nandrolona na funcionalidade do sistema colinérgico (COOPER et al., 1991), pois os grupos mais significativamente inibidos foram G3 e G4. Os grupos G5 e G6 (que possuíam associação com a vincristina) também tiveram inibição significativa ( $p < 0.05$ ) da enzima, todavia, de forma mais branda se comparados aos grupos onde somente se aplicou o EAA.

O córtex cerebral e o hipocampo apresentaram aumento significativo da atividade enzimática ( $p < 0.05$ ) (Figura 1). É interessante observar que no córtex cerebral o grupo que diferiu estatisticamente foi G6, enquanto que no hipocampo foi G4. A sobredose do decanoato de nandrolona aplicada isoladamente, como no hipocampo, ou em conjunto com a vincristina, como no córtex cerebral, causou uma hiperestimulação da enzima avaliada. JAMESON et al., 2007 citam que o aumento da atividade da AChE está relacionada a neurotoxicidade e neurodegeneração. Assim, sugere-se que a sobredose do esteróide quando usada sozinha (G4) no hipocampo é capaz de aumentar a atividade acetilcolinesterásica, entretanto, a função da enzima volta ao normal quando a mesma dosagem é associada à vincristina (G5). No córtex cerebral, contudo, a associação da sobredose do decanoato de nandrolona a vincristina (G6) estimulou a atividade da AChE, enquanto que o uso isolado de ambas as doses dos medicamentos (G2 e G4) não influenciaram a atividade daquela enzima.

O cerebelo, uma estrutura com baixas vias colinérgicas (ZIMMERMAN & SOREQ, 2006), foi a única fração cerebral analisada em que os tratamentos não influenciaram estatisticamente a atividade da enzima (Figura 1). Nenhuma das partes estudadas teve alteração do G2, o que poderia ser compreendido por ter sido usado apenas uma dose de vincristina, enquanto que a toxicidade é dose-dependente (RODASKI & DE NARDI, 2006).

Outra importante informação obtida neste estudo, foi em relação à atividade da AChE no sangue (RBC-AChE). Esta enzima demonstrou uma inibição significativa ( $p < 0.05$ ) nos grupos G4, G5 e G6 (Figura 2). É interessante ressaltar que a RBC-AChE apresentou resultados similares àqueles encontrados no estriado, com exceção de G3 demonstrando que esta enzima no sangue pode refletir seu estado com a AChE da fenda sináptica (THIERMANN et al., 2005). Além disso, esses resultados podem sugerir que a RBC-AChE pode funcionar como um bom marcador periférico para avaliar

desordens cerebrais, pois permite avaliar através de métodos mais acessíveis a ação desta enzima no SNC (BERNHARDI et al., 2005).

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o uso isolado de decanoato de nandrolona e suas associações com o sulfato de vincristina alteram a atividade da AChE cerebral e RBC-AChE. Sugere-se que o decanoato de nandrolona seja capaz de interferir na neurotransmissão colinérgica. A atividade da RBC-AChE apresentados são fidedignos àqueles exibidos pelo tecido encefálico, mostrando-se passível de uso na rotina clínica de animais domésticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGCHUS, W.M.; SMEETS, J.M.W.; VERHEUL, H.A.M.; DE JAGER-VAN DER VEEN, S.M.; PORT, A.; GEURTS, T.B.P. 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 Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n.11, p.5108-5117.
- BERNHARDI, R.V.; ALARCÓN, R.; MEZZANO, D.; FUENTES, P.; INESTROSA, N.C. Blood cells cholinesterase activity in early Alzheimer's disease and vascular dementia. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.19, p.204-212, 2005.
- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Acetylcholine. In: \_\_\_\_\_ The biochemical basis of neuropharmacology. 6ed. 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.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.J.; FEATHER-STONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.21, n.19, p.88-95, 1961.
- HAMILTON, T.A.; COOK, J.R.; BRAUND, K.G.; MORRISON, W.B.; MEHTA, J.R. Vincristine-induced peripheral neuropathy in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.198, n.4, p.635-638, 1991.
- 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.
- MARCEL, V.; PALACIOS, L.G.; PERTUY, C.; MASSON, P.; FOURNIER, D. Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. **The Biochemical Journal**, v.329, p.329-334, 1998.
- MASSOULIÉ, J.; ANSELMET, A.; BON, S.; KREJCI, E.; LEGAY, C.; MOREL, N.; SIMON, S. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. **Chemico-Biological Interactions**, v.v.119-120, p.29-42, 1999.

McGEHEE, D.S.; KRASOWSKI, M.D.; FUNG, D.L.; WILSON, B.; GRONERT, G.A.; MOSS, J. 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.

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.

NAK, D.; NAK, Y.; CANGUL, I.T.; TUNA, B. A clinical-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, 366-370, 2005.

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.

PEREZ, R.R.; SILVA, M.A.M.L.; VARZIM, F.L.S.B.; OLIVEIRA, S.B.; HUCKE, E.E.T.S. 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.

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**. 2ed. Curitiba: Bio Editora, 2006. 308p.

SAITOH, T. MORIMOTO, K.; KUMAGAI, T.; TSUBOI, I.; AIKAWA, S.; HORIE, T. Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senescence accelerated mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.109, p.125-139, 1999.

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

THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; EYER, P.; ZILKER, T.; WOREK, F. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. **Chemico-Biological Interactions**, v.157-158, p.345-347, 2005.

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

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

WHITTAKER, J.A.; PARRY, D.H.; BUNCH, C.; WEATHERALL, D.J. Coma associated with vincristine therapy. **British Medical Journal**, v.4, p.335-337, 1973.

WOREK, F.; MAST, U.; KINDERLEN, D.; DIEPOLD, C.; EYER, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v.288, p.73-90, 1999.

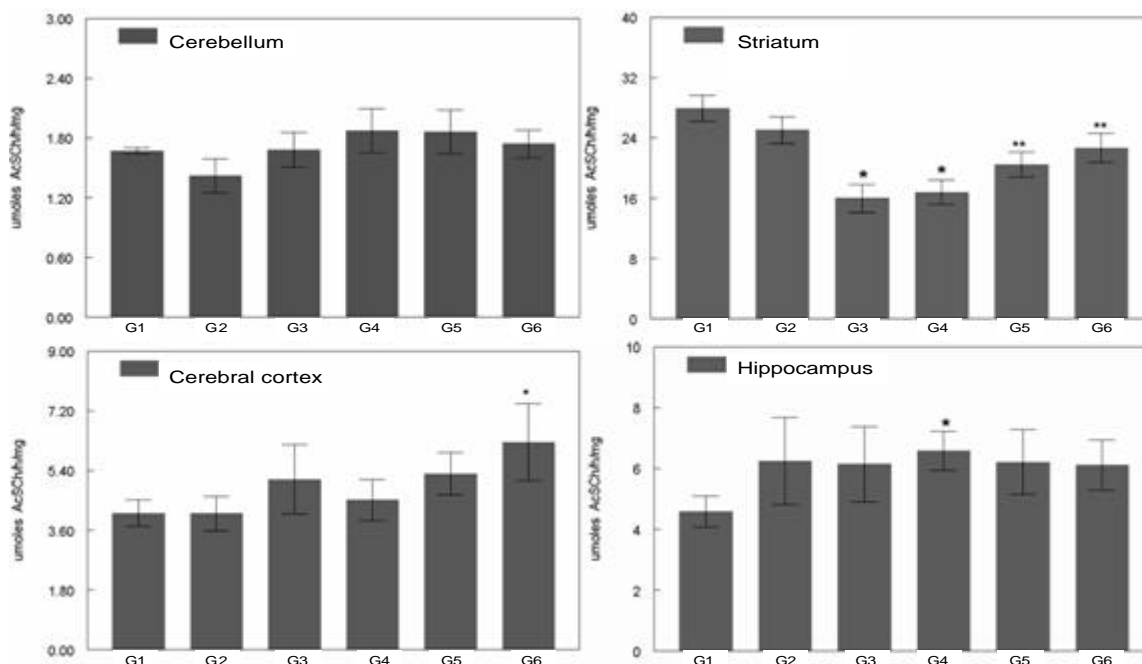


FIGURA 01 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) encefálica (cerebelo, estriado, córtex e hipocampo) e eritrocitária (RBC-AChE) para avaliação do sistema colinérgico de ratos submetidos a diferentes tratamentos: G1 – controle, G2 – somente vincristina ( $4\text{mg m}^{-2}$ ), G3 – somente decanoato de nandrolona ( $1,8\text{ mg kg}^{-1}$ ), G4 - somente decanoato de nandrolona ( $10,0\text{ mg kg}^{-1}$ ), G5 – associação de vincristina ( $4\text{mg m}^{-2}$ ) e decanoato de nandrolona ( $1,8\text{ mg kg}^{-1}$ ) e G6 - associação de vincristina ( $4\text{mg m}^{-2}$ ) e decanoato de nandrolona ( $10,0\text{ mg kg}^{-1}$ ). Símbolos diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ). Valores expressos por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

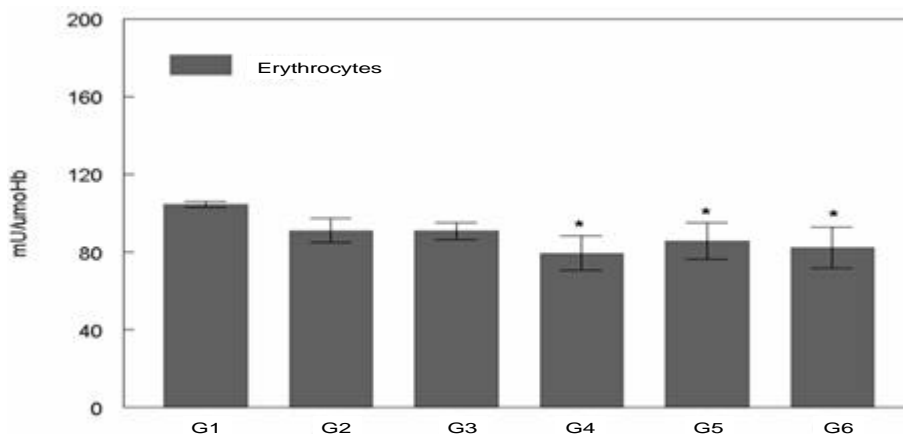


FIGURA 02 – Atividade da acetilcolinesterase eritrocitária (RBC-AChE) para avaliação do sistema colinérgico de ratos submetidos a diferentes tratamentos: G1 – controle, G2 – somente vincristina ( $4\text{mg m}^{-2}$ ), G3 – somente decanoato de nandrolona ( $1,8\text{ mg kg}^{-1}$ ), G4 - somente decanoato de nandrolona ( $10,0\text{ mg kg}^{-1}$ ), G5 – associação de vincristina ( $4\text{mg m}^{-2}$ ) e decanoato de nandrolona ( $1,8\text{ mg kg}^{-1}$ ) e G6 - associação de vincristina ( $4\text{mg m}^{-2}$ ) e decanoato de nandrolona ( $10,0\text{ mg kg}^{-1}$ ). Símbolos diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ). Valores expressos por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).