

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

**MARTINS, D.B.^{1*}; LOPES, S.T.A.¹; MAZZANTI, C.M.²; SPANEVELLO, R.³;
SCHETINGER, M.R.C.²; MORSCH, V.²; SCHMATZ, R.²; CORRÊA, M.²;
STEFANELLO, N.²; OLSSON, D.C.¹**

INTRODUÇÃO

A quimioterapia é uma das ferramentas mais importantes para o médico veterinário tratar as doenças neoplásicas. Esta tem o propósito de prolongar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com os mais variados tipos de câncer (McKNIGHT, 2003). Dentre os agentes mais utilizados em pequenos animais, pode-se citar o sulfato de vincristina (CAVE et al., 2007). Sua aplicação 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). Seus efeitos colaterais podem incluir desde citotoxicidade não seletiva que resulta em mielossupressão moderada (tanto de eritrócitos quanto leucócitos) até anorexia, distúrbios intestinais e neurotoxicidade (CUDDON, 2002; NAK et al., 2005). 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 sanguíneas (SAITOH et al., 1999; BAGCHUS et al., 2005), principalmente na supressão medular por quimioterápicos como a vincristina (PEREZ et al., 2005).

A peroxidação lipídica é considerada um evento fisiopatológico importante na toxicidade por fármacos, com os anti-neoplásicos e EAA, em diversas doenças, e em danos isquêmicos e traumáticos (BRAUGHLER et al., 1987). A membrana celular é um dos locais mais atingidos por esta reação bioquímica, que acarreta 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/ TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). O sistema nervoso central (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).

¹ 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. *Apresentadora do trabalho.

² 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.

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

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 usado em associação a este medicamento para amenizar alguns de seus efeitos colaterais como a citotoxicidade (PEREZ et al., 2005), este estudo objetivou verificar a peroxidação lipídica (TBA-RS) do encéfalo e do soro de ratos normais, tratados com sulfato de vincristina e diferentes doses de decanoato de nandrolona. Esta pesquisa é relevante, pois, na literatura atual há escassas informações sobre os efeitos do sulfato de vincristina e do decanoato de nandrolona, combinados ou usados separadamente, e estresse oxidativo.

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 mg m²), G3 – SF, G4 – SF, G5 – sulfato de vincristina (4 mg m²) e G6- sulfato de vincristina (4 mg m²). Na segunda semana foi aplicado: G1 (controle) – SF novamente, G2 – SF, G3 – decanoato de nandrolona (1,8mg kg⁻¹), G4 – decanoato de nandrolona (10,0mg kg⁻¹), G5 – decanoato de nandrolona (1,8mg kg⁻¹) e G6 - decanoato de nandrolona (10,0 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 (1,8mg kg⁻¹/semana) (NELSON & COUTO, 2006) e à sobredose (10,0 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 tubos sem anticoagulante. As estruturas encefálicas foram separadas em cerebelo, córtex, estriado e hipocampo, e homogeneizadas isoladamente em Médium I e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos. O soro foi separado para avaliação do TBA-RS. A reação de TBA-RS foi determinada pelo método de JENTZSCH et al. (1996) para as diferentes partes encefálicas, e seus valores expressos em nmol MDA/mg de proteína. Para o soro sanguíneo utilizou-se a mesma técnica citada por JENTZSCH et al. (1996), porém com os resultados em nmol MDA/ mL.

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 ± erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados nas Figuras 1 e 2 para TBA-RS do tecido encefálico e do soro sanguíneo, respectivamente.

Foi observado nesta pesquisa, um aumento significativo no TBA-RS ($p < 0.05$) em todas as estruturas encefálicas analisadas (Figura 1). Isto pode ser compreendido, em parte, pelo SNC apresentar metabolismo aeróbico, altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados e baixa atividade das defesas antioxidantes (WAJNER et al., 2004). No estriado, foi observado um aumento significativo ($p < 0.05$) do TBA-RS em G2, G3 e G4 (Figura 1). Estes resultados demonstram que o uso em separado dos dois fármacos aumentou a produção de radicais livres neste local. Entretanto, quando usados em conjunto, seus produtos finais se igualaram ao grupo controle. Os valores se apresentaram mais elevados em G2 e G4, que em G3. Apesar da vincristina não ter boa penetração no SNC (RODASKI & DE NARDI, 2006), a dosagem usada nesta pesquisa foi suficiente para causar estresse oxidativo no estriado. Sabe-se que o aumento às espécies reativas ao oxigênio (ERO) pode causar uma maior permeabilidade da barreira hemato-encefálica e, assim, inibir a respiração mitocondrial, aumentar a oxidação protéica e a produção de histamina pelos mastócitos (GILMAN et al., 1993; ROVERE et al., 1995), o que prejudicaria a interação sináptica. O uso isolado do decanoato de nandrolona também aumentou estatisticamente a peroxidação lipídica. O valor apresentado por G4 pode ter sido mais expressivo que G3 devido à maior dose utilizada do medicamento, ou então, pelos tecidos não-reprodutivos, como o cerebral, exibirem uma quantidade variada de receptores androgênicos nos diferentes tipos de células do órgão (MANOLAGAS & KOUSTENI, 2001).

O córtex cerebral e hipocampo tiveram comportamentos semelhantes em relação aos tratamentos, apresentando um aumento significativo ($p < 0.05$) nos níveis de TBA-RS nos grupos G3, G4 e G6 (Figura 1). Em adição, o uso isolado de ambas as doses do decanoato de nandrolona aumentou a produção de radicais livres. O resultado obtido em G6 mostrou que a formação do MDA supera de forma significativa G3 e G4, evidenciando uma potencialização da ação do decanoato de nandrolona pela vincristina nestas partes do cérebro. VEDDER et al. (1999) não detectaram nenhum efeito da testosterona e seus derivados nos níveis de TBA-RS em diferentes células do SNC *in vitro*. Desta forma, ressalta-se a relevância de estudos *in vivo* e associados a outros medicamentos, pois, o tipo de resposta pode sofrer modificações como neste caso.

O cerebelo também demonstrou alteração estatística em G6 (Figura 1). Neste local, nenhum dos medicamentos utilizados sozinhos apresentou aumento nos ERO. Todavia, o uso conjunto da droga anti-tumoral com o a sobredose do EAA estudado foi capaz de aumentar a peroxidação lipídica. De maneira semelhante, o uso isolado de certos hormônios, dentre eles a testosterona, não produziam nenhum efeito relacionado ao status oxidativo na próstata de ratos. Contudo, suas associações induziam um marcado aumento do estresse oxidativo, bem como, inibição da atividade enzimática antioxidante daquele local, o que poderia acarretar em um processo de carcinogênese (TAM et al., 2003).

Na avaliação do TBA-RS do soro houve alteração dos G2, G3 e G6 em relação ao grupo controle (Figura 2). O uso em separado dos medicamentos utilizados, causou um aumento na produção do MDA sérico. Este efeito foi reforçado analisando-se o comportamento de G6 que se mostrou significativamente mais elevado que G2 e G3. BENCHEKROUN & ROBERT (1992) publicaram pesquisas *in vitro* com culturas de células tumorais e doses

citotóxicas de vincristina e não encontraram indícios de peroxidação lipídica. Todavia, no presente estudo, houve a formação de radicais livres no tecido cerebral (estriado) e no soro sangüíneo, demonstrando, que a interação de diversos componentes *in vivo* com este alcalóide são determinantes para os resultados obtidos. O estresse oxidativo provocado pelo quimioterápico poderia agir como um fator colaborador apoptótico das células neoplásicas, diminuindo sua viabilidade. No entanto, maiores estudos são necessários.

É interessante ressaltar que a combinação farmacológica usada em G5 apresentou valores dentro da normalidade (semelhantes a G1) tanto no TBA-RS do soro quanto em todas as partes cerebrais estudadas. Assim, o decanoato de nandrolona, em dose terapêutica, protegeu as células neuronais e sistema sangüíneo contra danos oxidativos induzidos pela vincristina. GUZMÁN et al. (2005) verificaram o efeito antioxidante similar da testosterona no cérebro de ratos. Estudos *ex-vivo* também encontraram proteção desse hormônio em cultivo de células cerebelares induzidas a morte pelo estresse oxidativo (AHLBOM et al., 2001).

CONCLUSÃO

Nas condições em que esta pesquisa foi desenvolvida, conclui-se que a peroxidação lipídica do encéfalo aumenta com o uso isolado de vincristina (estriado) e do DN (estriado, hipocampo e córtex cerebral) e na associação da sobredose do éster com o agente anti-tumoral (cerebelo, hipocampo e córtex cerebral). 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;

Neste estudo, a dosagem utilizada de vincristina foi suficiente para a produção de radicais livres no tecido encefálico, 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.

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.

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.

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.

BRAUGHLER, J.M.; PREGENZER, J.F.; CHASE, R.L.; DUNCAN, L.A.; JACOBSEN, E.J.; McCALL, J.M. 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.

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.

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

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.

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

GUZMÁN, D.C.; MEJIA, G.B.; VÁSQUEZ, I.E.; GARCÍA, E.H.; ANGEL, D.S.; OLGUÍN, H.J. 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.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN, H.; FÜRST, P.; BIESALSKI, H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, n.2, p.251-256, 1996.

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

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, p.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.

PONCÉ, F.; MAGNOL, J.P.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **Journal of Small Animal Practice**, v.167, p.158-166, 2004.

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

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.

ROVERE, D.F.; GRANTA, A.; BROCCIO, M.; ZIRILLI, A. BROCCIO, G. Hemoglobin oxidative stress in cancer. **Anticancer Research**, v.15, p.2089-2095, 1995.

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.

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.

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.

VEDDER, H.; ANTHES, N.; STUMM, G.; WÜRZ, C.; BEHL, C.; KRIEG, J.C. 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.

WAJNER, M.; LATINI, A.; WYSE, A.T.S.; DUTRA-FILHO, C.S. 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.

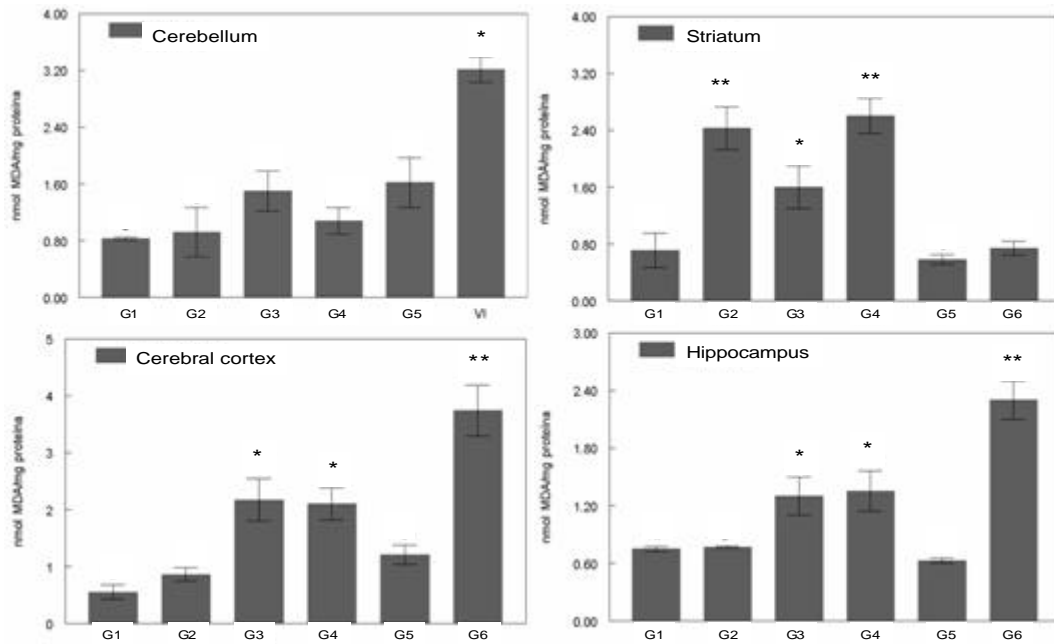


FIGURA 01 – Valores médios do TBA-RS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para avaliação do tecido cerebral (cerebelo, estriado, córtex e hipocampo) de ratos submetidos a diferentes tratamentos: G1 – controle, G2 – somente vincristina (4mg m^{-2}), G3 – somente decanoato de nandrolona ($1,8\text{ mg kg}^{-1}$), G4 – somente decanoato de nandrolona ($10,0\text{ mg kg}^{-1}$), G5 – associação de vincristina (4mg m^{-2}) e decanoato de nandrolona ($1,8\text{ mg kg}^{-1}$) e G6 – associação de vincristina (4mg 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).

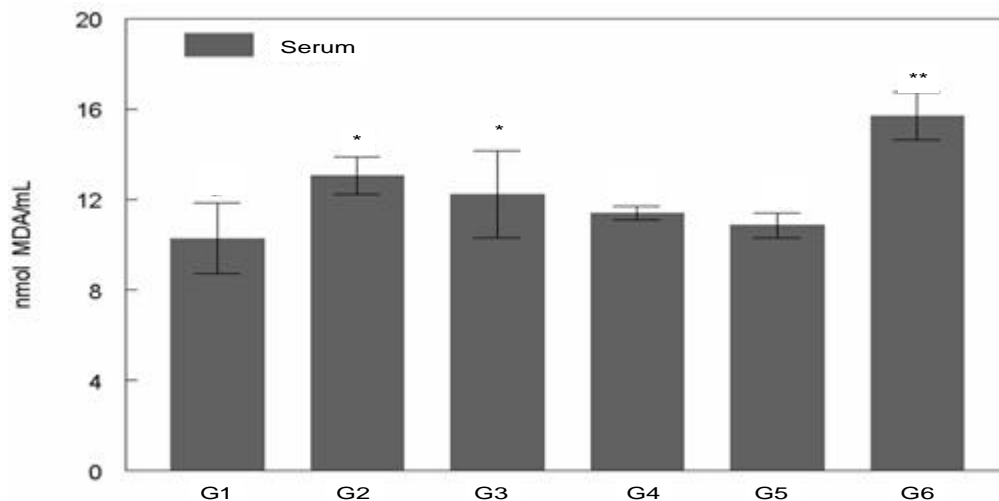


FIGURA 02 – Valores médios do TBA-RS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para avaliação do soro sanguíneo de ratos submetidos a diferentes tratamentos: G1 – controle, G2 – somente vincristina (4mg m^{-2}), G3 – somente decanoato de nandrolona ($1,8\text{ mg kg}^{-1}$), G4 – somente decanoato de nandrolona ($10,0\text{ mg kg}^{-1}$), G5 – associação de vincristina (4mg m^{-2}) e decanoato de nandrolona ($1,8\text{ mg kg}^{-1}$) e G6 – associação de vincristina (4mg 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).