

Decanoato de nandrolona no hemograma e nas células mononucleares da medula óssea de ratos Wistar hígidos

Nandrolone decanoate in the hemogram and bone marrow mononuclear cells of healthy Wistar rats

Danieli Brolo Martins^{I*} Sonia Terezinha dos Anjos Lopes^{II} Liliane Zimmermann de Oliveira^{III}
Roberto Marinho Maciel^I Ana Rita Lancini^{IV} Débora Cristina Olsson^I Luciele Varaschini Teixeira^I
Márcio Machado Costa^I Alexandre Mazzanti^{II}

RESUMO

O decanoato de nandrolona (DN), um estimulante do sistema hematopoético, caracteriza-se por ser um medicamento acessível aos proprietários de animais com escassos recursos econômicos. Assim, este estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes doses do DN no hemograma e na quantificação e a viabilidade das células mononucleares (CM) da medula óssea (MO), juntamente com a marcação das células hematopoéticas CD34⁺ de ratos Wistar saudáveis. Para isso, 48 animais foram separados em seis tratamentos, de forma aleatória, com oito 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 – 1,8mg kg⁻¹ de DN; G5 – 4,6mg kg⁻¹ de DN; e G6 – 10,0mg kg⁻¹ de DN. O fármaco foi aplicado semanalmente por três semanas. Os parâmetros hematológicos e medulares avaliados não tiveram diferença significativa entre os grupos, o que pode ter sido influenciado pela condição da MO ou pelo intervalo entre as doses. De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que esta pesquisa foi desenvolvida, pode-se concluir que o DN não altera o hemograma, a quantificação e a viabilidade das CM e a marcação de CD34⁺ em ratos wistar saudáveis.

Palavras-chave: esteróide anabólico androgênico, estimulante medular, hematopoese, células-tronco, fração mononuclear, CD34⁺.

ABSTRACT

Nandrolone Decanoate (ND), a hematopoietic system stimulant, is characterized as an accessible medication

for low-income pet owners. The aim of this research is to study the effect of different ND doses in the blood cytological parameters and the quantification and viability of the bone marrow (BM) mononuclear cells (MC), together with the labeling of CD34⁺ hematopoietic stem cells of healthy Wistar rats. Forty eight animals were randomly separated into six different groups of treatment, each composed of eight animals. These groups were divided in: G1 – control group (physiologic solution); G2 – diluent control (only vegetal oily vehicle); G3 – ND 0.42mg kg⁻¹; G4 – ND 1.8mg kg⁻¹; G5 – ND 4.6mg kg⁻¹ and G6 – ND 10.0mg kg⁻¹. The drug was weekly applied for three weeks. The hematologic and medullar analyzed parameters showed no significant difference between the groups, which may have been influenced by the BM conditions or by the applications frequency. According to the results obtained and according to the conditions under which this research was developed, it can be concluded that ND did not affect the blood cytological parameters, quantification and viability of MC and CD34⁺ labeling in healthy Wistar rats.

Key words: anabolic androgenic steroid, bone marrow stimulating factor, hematopoiesis, stem cells, mononuclear fraction, CD34⁺.

INTRODUÇÃO

O interesse por substâncias estimuladoras do sistema hematopoético tem aumentado consideravelmente na Medicina Veterinária

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Hospital Veterinário Univeritário, prédio 97, sala 103, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: vetdanielimartins@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Clínica de Pequenos Animais, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Laboratório de Hemato-oncologia, Hospital Universitário (HUSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV}Curso de Medicina Veterinária, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

(FELDMAN et al., 2000). O alto custo da eritropoetina recombinante e os sérios riscos colaterais levam à busca de outros medicamentos para tal finalidade (GHORBANIHAGHJO et al., 2005) em cães e gatos. Dentre as substâncias estimulantes da medula óssea (MO), podem ser listados os fatores de crescimento hematopoéticos (citocinas sintéticas) (FELDMAN et al., 2000), ou ainda, os andrógenos sintéticos, tais como o decanoato de nandrolona (DN), cuja eficácia para animais domésticos é pouco estudada (PEREZ et al., 2005).

Algumas pesquisas estão evidenciando que o DN seria capaz de afetar diretamente o crescimento de células progenitoras, inclusive as hematopoéticas da MO de murinos (GALLICCHIO et al., 1984; SAITOH et al., 1999; FORESTA et al., 2008). Quando usado de forma terapêutica, os riscos colaterais para pacientes que podem apresentar anemia, como os submetidos a quimioterapias ou doença renal, são relativamente baixos (SPIERS et al., 1981; BARTON et al., 2002). Há relatos na literatura que citam o aparecimento de alterações hematológicas com o uso de esteroides anabólicos androgênicos (EAA), como policitemia e aumento do hematócrito sem (DAWSON, 2001) ou com supressão medular (PEREZ et al., 2005).

As células-tronco (CT) são células raras, com capacidade de autorrenovação e possibilidade de se diferenciar em uma ou mais linhagens celulares. A produção de células sanguíneas é mantida por toda a vida por meio de CT hematopoéticas nos mamíferos adultos (CUMANO & GODIN, 2007), que residem principalmente na MO e, em menor número, na corrente sanguínea periférica. O aumento na mobilização dessas células e seus progenitores podem ocorrer por alguns estímulos, como a perda de sangue e o aumento na produção de eritropoetina (SAITOH et al., 1999; WRIGHT et al., 2001). O estudo com células-tronco mononucleares permite o desenvolvimento e/ou aprimoramento de terapias celulares, validando a chamada medicina regenerativa ou de reparo (HUANG et al., 2004; GALLIAN, 2005; CUMANO & GODIN, 2007). Trabalhos sobre a viabilidade das CT são necessários, já que há dúvidas se os andrógenos afetam a sobrevivência desse tipo de célula (KIM et al., 2005). Além disso, a identificação de marcadores moleculares de superfície dos fenótipos das CT hematopoéticas, como o CD34+, é importante no transplante clínico e na terapia gênica (ITO et al., 2000).

Todavia, parte da informação clínica a respeito dos efeitos do DN provém de relatos de casos isolados ou estudos em condições não controladas, o que torna as observações/conclusões mais difíceis de serem feitas (WU, 1997; DAWSON, 2001; GHORBANIHAGHJO et

al., 2005). Além disso, há poucas pesquisas nacionais sobre o uso de estimulantes hematopoéticos (LUCIDI & TAKAHIRA, 2007). Desse modo, este estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes doses do DN no hemograma, na quantificação e na viabilidade das células mononucleares (CM) da MO e na marcação das células hematopoéticas CD34+ de ratos Wistar saudáveis. É de grande relevância que se façam pesquisas sobre os efeitos dos andrógenos em condições normais e não só em quadros patológicos (FORESTA et al., 2008). O uso de estimulantes medulares, por vezes, torna-se dispendioso na clínica de pequenos animais, e novas opções terapêuticas devem ser pesquisadas, a exemplo do DN.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo do hemograma foi realizado com 48 ratos, com idade de três meses, machos, pesando entre 210 e 300g, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Destes, 35 também foram usados para isolamento e quantificação das CT mononucleares. Os murinos 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*. Os animais foram alocados em ratário próprio para pesquisas experimentais cedido pela instituição. As condições ambientais foram controladas, sendo temperatura de 25°C, ciclo de luminosidade de 12 horas claro/12 horas escuro e umidade relativa em torno de 60%.

Os ratos foram separados em seis grupos, de forma aleatória, com oito 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 – 1,8mg kg⁻¹ de DN; G5 – 4,6mg kg⁻¹ de DN; e G6 – 10,0mg kg⁻¹ de DN. As dosagens foram baseadas em doses subclínica, clínica, intermediária e supraclínica, respectivamente (VIEIRA et al., 2008).

O DN foi diluído em veículo oleoso de origem vegetal (azeite de oliva) adequado à administração intramuscular (IM). O protocolo experimental teve duração de um mês. As aplicações do medicamento foram realizadas com uma semana de intervalo (NELSON & COUTO, 2006), sempre no mesmo horário (vespertino), durante três semanas consecutivas.

Na quarta semana, o sangue foi coletado por meio de punção cardíaca e armazenado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético disódico (EDTA) a 10%. O processamento das amostras sanguíneas foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET), do Hospital Veterinário

Universitário (HVU), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A contagem de hemácias e leucócitos totais foi determinada no contador de células sanguíneas CC550[®]. O teor de hemoglobina foi quantificado pelo método da cianometahemoglobina. O volume globular foi determinado em microhematócrito, após cinco minutos de centrifugação a 19720G. Os índices hematimétricos (VCM – volume corpuscular médio e CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média) foram determinados por cálculos indiretos. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por microscopia de luz, com corante comercial panótico rápido.

O processamento da fração mononuclear da MO foi realizado conforme BOYUM (1968), com pequenas modificações, em sala previamente desinfetada do Laboratório de Processamento de Células-Tronco (UFSM). Momentos antes da dissecação dos animais, o fluxo laminar passava por limpeza com álcool 70% e após exposição à luz ultravioleta por 15 minutos. Para a obtenção das CM, realizou-se a lavagem do canal medular dos ossos do fêmur, da tíbia e do úmero (bilaterais) de cada animal. O material foi filtrado em um tecido de nylon tipo peneira de cerca de 100µm e diluído em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e solução salina 0,9% e colocado em tubos Falcon de 15mL. Em seguida, a solução foi inserida lentamente sob o gradiente de densidade Histopaque^{®a} (densidade 1083g mL⁻¹), na proporção 2:1, e foi centrifugada a 440G, por 30 minutos. O anel de células mononucleares, localizado na interfase, foi retirado e transferido para um tubo Falcon contendo a proporção de 1:1 de salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7,2.

As células foram lavadas três vezes com PBS e centrifugadas, após cada lavagem, a 440G, por 10 minutos para obtenção do botão celular padronizado em 300µL, como produto final. Desse botão, foram retirados 50µL, os quais foram destinados à quantificação de células mononucleares em câmara de Neubauer (diluição em solução salina 0,9%) e a teste de viabilidade com o corante azul de Trypan 1%. O restante da fração, 250µL, foi enviado para quantificação de CD34+ por citometria de fluxo.

O botão celular foi incubado com anticorpos monoclonais (AcM) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (anticorpo anti-CD45 de rato produzido em camundongo, FITC) e ficoeritrina (anticorpo anti-CD34 de rato produzido em camundongo, PE) por dupla coloração. Em seguida, foram realizadas lise e lavagem^d das amostras para minimizar possíveis interferentes. A quantidade de células e de AcM para análise seguiu as recomendações dos fabricantes^{b,c}. Em seguida, as

células foram lavadas com PBS e, finalmente, ressuspensas e imediatamente analisadas pelo citômetro de fluxo^e, usando o programa *CellQuest*^{®f}. A análise dos dados foi realizada seguindo o protocolo ISHAGE (SUTHERLAND et al., 1996).

Para a estatística dos valores obtidos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer* (P<0,05). Os resultados foram expressos por média ± erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do hemograma estão expressos nas tabelas 1 e 2 para o eritograma e leucograma, respectivamente. Na série vermelha, os valores não tiveram variação significativa entre os diferentes grupos. Entretanto, KURLING et al. (2005), estudando o DN em ratos sadios nas doses de 5 e 20mg kg⁻¹ com uma injeção diária por cinco dias na semana, durante duas semanas, observaram um aumento significativo no último dia de tratamento (17^a dia), nos eritrócitos totais e na hemoglobina somente nos animais que receberam 5mg kg⁻¹. Dessa forma, as doses utilizadas em G5 e G6 podem não ter estimulado a linhagem eritrocítica devido ao número e/ou intervalo de tempo em que as injeções foram aplicadas, pois a resposta ao tratamento de estimulação hematopoética é dependente de sua duração, ou ainda, do número de CT viáveis na MO (FELDMAN et al., 2000).

Em outro estudo com o quimioterápico sulfato de vincristina como depressor medular, os autores verificaram efeito protetor e estimulante desse EAA (1,5mg kg⁻¹) em casos de anemia leve a moderada, com valores que se aproximaram estatisticamente ao controle sadio (PEREZ et al., 2005). Em camundongos irradiados e medicados com DN (1,25mg), se verificou que o fármaco foi capaz de estabilizar os valores de VCM entre os animais irradiados e os irradiados/tratados, além de aumentar a eritropoese, como constatado por meio do aumento do número de colônias eritroides (CFU-e e BFU-e) na MO e no baço (GALLICCHIO et al., 1984). O fato de os animais analisados neste estudo serem hígdos pode ter contribuído para a não estimulação medular pelo DN, pois roedores irradiados ou sob ação de quimioterapia, quando tratados com DN, mesmo em doses e frequências menores do que as usadas nos grupos desta pesquisa, apresentaram resposta da MO (GALLICCHIO et al., 1984; PEREZ et al., 2005).

O leucograma dos diferentes grupos também não apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Pessoas submetidas a diferentes drogas citotóxicas, quando expostas ao DN,

Tabela 1 - Eritrograma de ratos saudáveis submetidos a diferentes doses de decanoato de nandrolona (DN), aplicadas uma vez/semana, durante três semanas, com amostras sanguíneas coletadas na quarta semana.

Tratamento	Eritrócitos (x10 ⁶)	Hb (g dl ⁻¹)	Ht (%)	VCM (fl)	CHCM (%)
G1 (controle SF)	6,1±0,9	14,5± 2,7	45,6± 8,9	74,2±9,6	32,0±1,0
G2 (controle VO)	6,4±1,4	14,8±2,2	45,9±8,12	72,6±10,3	32,4±2,0
G3 (0,42mg kg ⁻¹ DN)	6,1±1,0	14,4±1,5	44,1±4,0	72,5±8,0	32,6± 0,6
G4 (1,8mg kg ⁻¹ DN)	6,6±1,2	14,3±0,8	44,9±1,4	69,1±11,2	32,0±14
G5 (4,6mg kg ⁻¹ DN)	7,6±1,3	15,5±0,8	47,6± 2,2	64,0±9,9	32,6±0,5
G6 (10,0mg kg ⁻¹ DN)	7,1±1,7	14,5±1,2	44,9±3,6	65,0±12,5	32,3±1,0

Médias nas colunas seguidas de letras diferentes são estatisticamente significativas (P<0,05) pelo teste de Tukey-Kramer. Hb – hemoglobina; Ht – hematócrito; VCM – volume corpuscular médio; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; SF – solução fisiológica; VO – veículo oleoso.

apresentaram melhora nos valores de hemoglobina, tendo uma redução significativa no número de transfusões sanguíneas necessárias para o retorno de valores hematológicos aceitáveis. Porém, o número de neutrófilos manteve-se similar aos indivíduos que não receberam o EAA (SPIERS et al., 1981). Contudo, PEREZ et al. (2005) observaram efeito estimulador da leucopose em casos de depressão medular discreta a moderada causada pelo sulfato de vincristina em ratos. É importante salientar que tal efeito não foi observado nos grupos em que a MO foi severamente suprimida. Em pesquisa realizada com camundongos saudáveis, jovens e geriátricos, o DN, na dose de 2,5mg, por três dias consecutivos, estimulou a liberação de leucócitos na circulação periférica, bem como a formação de colônia granulocítica-monocítica (CFU-GM e BFU-GM) na MO e no baço (SAITOH et al., 1999). Resultados semelhantes foram encontrados por GALLICCHIO et al. (1984), com a dose de 1,25mg, em camundongos irradiados. Subentende-se que, de forma semelhante ao que ocorreu no eritrograma, as doses utilizadas em G5 e G6 podem não ter estimulado o aumento da série branca na circulação sanguínea devido ao número e/ou intervalo de tempo em que as injeções foram aplicadas.

Parte da literatura consultada cita a presença de estimulação medular com doses inferiores às utilizadas no trabalho, porém com intervalos de tempos diários (SAITOH et al., 1999; KURLING et al., 2005). Contudo, outros autores comentam o uso semanal do DN, com dosagens inferiores ou não as utilizadas no presente estudo (BARTON et al., 2002; NELSON & COUTO, 2006). Pelos valores obtidos no hemograma, sugere-se que a metodologia de aplicação do fármaco possa ter influenciado a ausência de aumento no número de células sanguíneas em murinos saudáveis.

Os resultados sobre a quantificação e viabilidade das CM da MO estão dispostos na tabela 3. Pode-se observar que, ratificando os achados do sangue circulante, não houve diferença estatística entre os grupos, o que demonstra que as doses utilizadas de DN, mesmo em doses supraclínicas, não foram capazes de afetar o número de CM da MO em ratos saudáveis. Esses achados concordam com KIM et al. (2005), que não encontram estimulação de dois outros andrógenos sobre as CT e os progenitores sanguíneos *in vitro*.

Tem sido relatada a interação dos esteroides androgênicos na hematopoese de animais, sendo o estímulo a progenitores hematopoéticos um dos possíveis mecanismos envolvidos (BESA, 1994). Em

Tabela 2 - Leucograma de ratos saudáveis submetidos a diferentes doses de decanoato de nandrolona (DN), aplicadas uma vez/semana, durante três semanas, com amostras sanguíneas coletadas na quarta semana.

Tratamento	Leuc.Totais (Absoluto ul ⁻¹)	Bast	Neut	Linf	Eos	Mon
G1 (controle SF)	3800±1784,4	00±0,0	850 ±600,8	2800±1354,7	00 ±0,0	150 ±139,3
G2 (controle VO)	4000±2136,6	03±7,4	894 ±466,0	2915±1668,5	27±40,9	161±178,4
G3 (0,42mg kg ⁻¹ DN)	4600±4266,5	43 ±102,6	1381 ±1903,6	2961±2080,6	18 ±52,3	197±294,3
G4 (1,8mg kg ⁻¹ DN)	3300±1037,1	00±0,0	900±236,0	2302±981,0	08 ±15,5	90±61,5
G5 (4,6mg kg ⁻¹ DN)	2700±688,2	00±0,0	587 ±191,2	2053±622,8	04 ±10,6	56±48,6
G6 (10,0mg kg ⁻¹ DN)	2300±718,0	00±0,0	610 ±328,1	1629 ±547,7	04 ±12,7	57±31,5

Médias nas colunas seguidas de letras diferentes são estatisticamente significativas (P<0,05) pelo teste de Tukey-Kramer. Leuc – leucócitos; Bast – bastonetes; Neut – neutrófilos; Linf – Linfócitos; Eos – eosinófilos; Mon – monócitos; SF – solução fisiológica; VO – veículo oleoso.

Tabela 3 - Quantificação das células mononucleares e viabilidade da medula óssea de ratos saudáveis submetidos a diferentes doses de decanoato de nandrolona (DN), aplicadas uma vez/semana, durante três semanas, com amostras coletadas na quarta semana.

Tratamento	Células mononucleares (Absoluto ul ⁻¹) (x10 ⁵)	Viabilidade (%)
G1 (controle SF)	1,6±0,6	92±1,0
G2 (controle VO)	1,7±0,7	95±1,0
G3 (0,42mg kg ⁻¹ DN)	1,5±0,8	96±1,0
G4 (1,8mg kg ⁻¹ DN)	1,8±1,4	91±2,0
G5 (4,6mg kg ⁻¹ DN)	2,0±1,0	96±1,0
G6 (10,0mg kg ⁻¹ DN)	2,5±0,9	95±1,0

Médias nas colunas seguidas de letras diferentes são estatisticamente significativas (P<0,05) pelo teste de Tukey-Kramer. SF – solução fisiológica, VO – veículo oleoso, DN – decanoato de nandrolona.

um estudo, observou-se que a administração do DN causou uma resposta mínima na MO (SAITOH et al., 1999). Os valores similares da viabilidade entre os tratamentos sugerem que o andrógeno utilizado nesta pesquisa não foi capaz de afetar a sobrevivência das células hematopoéticas progenitoras. Esse fato deve ser considerado relevante, principalmente em pacientes que possuam um número reduzido de progenitores sanguíneos, como ocorre em alguns tipos de anemias.

A análise do CD34⁺ por citometria de fluxo foi realizada com o grupo controle (G1) e o grupo com 1,8mg kg⁻¹ de DN (G4). O grande potencial de aplicação clínica da quantificação do CD34⁺ indica a capacidade de reconstituição hematopoética após o transplante de CT em animais (NAKAGE et al., 2005). Assim, este quadro cria a expectativa que estimulantes medulares, como o DN, também atuem na fração mononuclear da MO marcada com CD34⁺, pois ainda há carência de pesquisas no assunto. Os valores médios relativos para G1 foram de 0,02% (±0,009), enquanto que, para G4, de 0,03% (±0,015), não havendo diferença estatística para ambos os grupos. Na MO, o marcador de superfície CD34⁺ está em quantidade relativamente baixa, perfazendo cerca de 1 a 2% das células mononucleares (KRAUSE et al., 1996), com possível declínio de acordo com a idade (SUTER et al., 2004). Assim, é possível que animais mais jovens que os usados nesta pesquisa apresentem um percentual discretamente maior desse tipo celular. A expressão do CD34⁺ pelas CT de murinos adultos parece refletir um estado de ativação, podendo ser reversível (SATO et al., 1999). A ausência ou um número reduzido de receptores androgênicos na superfície de membrana pode influenciar a resposta celular frente aos andrógenos (FORESTA et al., 2008).

Contudo, pelo fato de os animais deste trabalho serem hígidos, é possível que seus receptores androgênicos não tenham sido suficientemente estimulados, uma vez que o medicamento possui propriedades androgênicas menores quando comparada com a testosterona (VIEIRA et al., 2008).

CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos e nas condições em que esta pesquisa foi desenvolvida, pode-se concluir que o DN não influencia o hemograma, a quantificação e a viabilidade das CM da MO e a marcação do CD34⁺ em ratos wistar saudáveis. Desse modo, há a possibilidade desse andrógeno não se comportar como um estimulante medular em condições fisiológicas nessa espécie. Novos estudos deverão ser conduzidos com diferentes intervalos entre doses e parâmetros medulares, como anemia e imunossupressão, a fim de esclarecer melhor a ação do medicamento, especialmente frente à fração mononuclear da MO.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a – Histopaque® 1083 – Sigma, St. Louis, USA.
- b – CD45 MR6901 FITC – Caltag Laboratories, Burlingame, USA.
- c – CD34 (IC0115): sc-7324 PE– Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA.
- d – FACS Lysing Solution® – Becton Dickinson, San Jose, USA.
- e – FACS Calibur® – Becton Dickinson, San Jose, USA.
- f – CellQuest® – Becton Dickinson, San Jose, USA.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este estudo foi desenvolvido de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – RS, sob o n. 23081.000780/2007-15.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (D.B. Martins) e ao Programa de Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Pesquisa (PIBIC/CNPq) (A.R. Lancini), pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BARTON, P.A. et al. The effects of nandrolone decanoate on nutritional parameters in hemodialysis patients. **Clinical Nephrology**, v.58, p.38-46, 2002.
- BESA, E.C. Hematologic effects of androgens revisited: an alternative therapy in various hematologic conditions. **Seminars in Hematology**, v.31, p.134-145, 1994.

- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v.97, p.77-89, 1968.
- CUMANO, A.; GODIN, I. Ontogeny of the hematopoietic system. **Annuals Reviews of Immunology**, v.25, p.745-785, 2007. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538>>. Acesso em: 25 set. 2009. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538.
- DAWSON, R.T. Drugs in sport – the role of the physician. **Journal of Endocrinology**, v.170, p.55-61, 2001. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/reprint/170/1/55>>. Acesso em: 25 set. 2009. doi: 10.1677/joe.0.1700055.
- FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.1344.
- FORESTA, C. et al. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway. **Clinical Endocrinology**, v.68, p.284-289, 2008.
- GALLIAN, D.M.C. Por detrás do último ato da ciência-espetáculo: as células-tronco embrionárias. **Estudos Avançados**, v.19, p.251-260, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v19n55/17.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2009. doi: 10.1590/S0103-40142005000300018.
- GALLICCHIO, V.S. et al. The enhancement of committed hematopoietic stem cell colony formation by nandrolone decanoate after sublethal whole body irradiation. **International Journal of Cell Cloning**, v.2, p.383-393, 1984. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/121604507/issue>>. Acesso em: 27 nov. 2007. doi: 10.1002/stem.5530020606.
- GHORBANIHAGHJO, A. et al. Effect of nandrolone decanoate on paraoxonase activity in hemodialysis patients. **Clinical Biochemistry**, v.38, p.1076-1080, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TDD-4H2FY6R-1-7&_cdi=5196&_user=687358&_orig=search&_coverDate=12%2F31%2F2005&_sk=999619987&view=c&wchp=dGLbVlW-zSkWz&md5=27d5742b54c1f59c8ad1f0865df81db9&ie=/sarticle.pdf>. Acesso em: 25 set. 2009. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.08.006.
- HUANG, P.P. et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. **Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart**, v.91, p.606-609, 2004.
- ITO, T. et al. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. **Experimental Hematology**, v.28, p.1269-1273, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VP8-41J66XP-9&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanch or=&view=c&_searchStrId=1023468602&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=f37a2ce54b5aabe03120b345f8cbce28>. Acesso em: 25 set. 2009. doi: 10.1016/S0301-472X(00)00535-X.
- KIM, S.W. et al. Direct and indirect effects of androgens on survival of hematopoietic progenitor cells in vitro. **Journal of Korean Medical Science**, v.20, p.409-416, 2005.
- KRAUSE, D. et al. CD34⁺: structure, biology, and clinical utility. **Journal of the American Society of Hematology**, v.87, n.1, p.1-13, 1996.
- KURLING, S. et al. The effect of sub-chronic nandrolone decanoate treatment on dopaminergic and serotonergic neuronal systems in the brains of rats. **Brain Research**, v.1044, p.67-75, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6SYR-4FV9MM7-D&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1025262341&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=b598a174b348576639f269009f6e152d>. Acesso em: 27 nov. 2007. doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.071.
- LUCIDI, C.A.; TAKAHIRA, R.K. Uso do estimulante de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos. **Ciência Rural**, v.37, p.915-920, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782007000300054&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 26 set. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782007000300054.
- NAKAGE, A.P.M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v.35, p.966-973, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000400040&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 26 jun. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782005000400040.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios da micção. In: **Medicina interna de pequenos animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap.48, p.625-633.
- PEREZ, R.R. et al. A ação do decanoato de nandrolona (Decadurabolin) 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, p.589-595, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000300015&script=sci_arttext&tlng=e>. Acesso em: 26 jun. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782005000300015.
- SAITOH, T. et al. Comparison of erythropoietic to androgen in young and old senescence accelerated mice. **Mechanisms of Aging and Development**, v.109, p.125-139, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T31-3X942SK-4&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1025269711&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=69c6e254db231df6bacf7843a1252a08>. Acesso em: 26 set. 2009. doi: 10.1016/S0047-6374(99)00032-9.
- SATO, T. et al. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. **Blood**, v.94, p.2548-2554, 1999.

SPIERS, A.S. et al. Beneficial effects of an anabolic steroid during cytotoxic chemotherapy for metastatic cancer. **Journal of Medicine**, v.12, p.433-445, 1981.

SUTER, S.E. et al. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34+ cells. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.101, p.31-47, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TD5-4CKFKXT-2-1R&_cdi=5189&_user=687358&_orig=search&_coverDate=09%2F30%2F2004&_sk=998989998&view=c&wchp=dGLzV1z-zSkWA&md5=4ed7c381ed7b4a8d1794da25182a4094&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 26 set. 2009. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.03.009.

SUTHERLAND, R. et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. **Journal of Hemotherapy**, v.5, p.213-226, 1996.

VIEIRA, R.P. et al. Dose-dependent hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.40, p.842-847, 2008.

WRIGHT, D.E. et al. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. **Science**, v.294, p.1933-1936, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/294/5548/1933.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2009. doi: 10.1126/science.1064081.

WU, F.C.W. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clinical Chemistry**, v.43, n.7, p.1289-1282, 1997.