



Universidade do Porto

Faculdade de Ciências do
Desporto e de Educação Física

Influência do Exercício Físico e da Temperatura Corporal em Marcadores de Cardiotoxicidade Aguda, Induzida pela Administração de D-Anfetamina, no Modelo Animal

**Maria Teresa do Vale
Ferreira**

Porto 2004

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DO DESPORTO E DE EDUCAÇÃO FÍSICA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA TEMPERATURA
CORPORAL EM MARCADORES DE CARDIOTOXICIDADE
AGUDA, INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE D-
ANFETAMINA, NO MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada com vista à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
do Desporto, na área de Especialização
de Desporto de Recreação e Lazer, nos
termos do Decreto-Lei nº 216/92 de 13 de
Outubro.

Orientador: Professor Doutor José Alberto Ramos Duarte

Co-Orientador : Professor Doutor Félix Dias Carvalho

Maria Teresa do Vale Ferreira

Porto, 2004

FERREIRA, M. (2004): Influência do exercício físico e da temperatura corporal em marcadores de cardiotoxicidade aguda, induzida pela administração de d – anfetamina, no modelo animal. Dissertação de Mestrado em Ciências do Desporto, na Área de Especialização de Desporto de Recreação e Lazer. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física – Universidade do Porto.

PALAVRAS-CHAVE: MIOCÁRDIO, LESÃO TECIDUAL, TEMPERATURA SUB-CUTÂNEA, RABDOMIÓLISE, STRESS OXIDATIVO.

AGRADECIMENTOS

A realização desta investigação não teria sido possível sem a colaboração de diversas pessoas e entidades, pelo que, neste espaço, lhes dirigimos os devidos agradecimentos.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia que, ao abrigo do projecto POCTI / ACT / 43562 / 2001, apoiou a realização deste trabalho experimental que decorreu no Centro de Investigação em Actividade Física, Saúde e Lazer da Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Ao Professor Doutor José Alberto Ramos Duarte, por toda a disponibilidade, apoio, orientação, conselhos, conhecimentos e ensinamentos transmitidos. Pela realização do estudo morfológico, e pela ajuda fundamental prestada na pesquisa de sites na Internet, bem como por todo o suporte bibliográfico cedido ao longo deste ano.

Ao Professor Doutor Félix Carvalho, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela co-orientação dada, pela sua preciosa colaboração na realização e coordenação do protocolo experimental, assim como na realização do estudo bioquímico laboratorial.

Ao Professor Doutor Jorge Mota pelo incentivo, apoio, alegria e boa disposição que sempre me transmitiu. Obrigado também pela disponibilidade e atenção que sempre me dispensou.

À Professora Doutora Paula Santos e ao Professor Doutor José Carlos Ribeiro pela disponibilidade e atenção que sempre demonstraram e, pela preciosa ajuda prestada na compreensão e aplicação do programa informático que permitiu o tratamento estatístico dos resultados.

À Rita Ferreira e Maria João Neuparth, assistentes do gabinete de Bioquímica do Desporto da FCDEF-UP, pela simpatia e atenção, e pela colaboração dada na realização do protocolo experimental e na análise laboratorial dos resultados.

À Luísa Aires pela preciosa ajuda dada na análise estatística dos dados, e pela simpatia, disponibilidade e amizade sempre dispensada durante esta aventura (Mestrado)!

À Inês e à Mariana, pela constante amizade, carinho, incentivo e companheirismo que sempre me dirigiram durante estes últimos dois anos. Obrigada por terem feito parte desta aventura, que sem vós não teria o mesmo brilho!

À Rita, Sónia, Liliana, Maria João, Inês, Helena, Mariana, sempre presentes nos bons e maus momentos. Obrigada pela alegria, paciência, disponibilidade e auxílio sempre constantes. Pelas aventuras que partilhámos. Obrigada por existirem!

Aos meus cunhados e sobrinhas, pela vossa presença na minha vida, pela alegria e encanto que lhe trouxeram.

Aos meus irmãos, pelo auxílio, disponibilidade, atenção, paciência e orientações dadas ao longo da vida.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e pela vossa imensa paciência e carinho!

ÍNDICE GERAL

	Pág.
AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE GERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE QUADROS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
RÉSUMÉ	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA – ANFETAMINAS	11
2.1. Aspectos Históricos	13
2.2. Evolução das Tendências de Consumo de Anfetaminas e Análogos	14
2.3. Apresentação e Formas de Administração	20
2.4. Farmacocinética	20
2.4.1. Absorção e Distribuição	20
2.4.2. Metabolismo da Anfetamina	22
2.4.3. Excreção Renal da Anfetamina e de seus Metabólitos	23
2.5. Ação Farmacológica	24
2.6. Toxicidade das Anfetaminas e Análogos	30
2.6.1. Mecanismos de Toxicidade Geral	31
2.6.2. Mecanismos e Manifestações de Cardiotoxicidade	40
2.6.3. Mecanismos e Manifestações de Toxicidade Muscular	44
2.6.4. Mecanismos e Manifestações de Toxicidade Metabólica	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1. Caracterização da Amostra	59
3.2. Procedimentos Experimentais	59
3.3. Análise Bioquímica	61
3.4. Análise Morfológica	62
3.5. Análise Estatística	63

ÍNDICE GERAL (continuação)

	Pág.
4. RESULTADOS	65
4.1. Alterações Metabólicas – Temperatura Subcutânea	67
4.2. Alterações Bioquímicas	70
4.3. Alterações Morfológicas	75
5. DISCUSSÃO	79
5.1. Discussão da Metodologia	81
5.1.1. Procedimentos Experimentais	81
5.1.2. Procedimentos Estatísticos	82
5.2. Discussão dos Resultados	85
6. CONCLUSÕES	99
7. BIBLIOGRAFIA	105

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Representação da estrutura química da anfetamina	20
Figura 2 – Etapas da rabdomiólise (adaptado de Criner et al., 2002)	51
Figura 3 – Representação esquemática do protocolo experimental	61
Figura 4 – Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios-padrão da temperatura subcutânea, registada pelos diferentes subgrupos, ao longo do protocolo experimental, nos vários momentos de avaliação.	67
Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios-padrão, do indicador bioquímico GSSG/GSH, avaliado nos diferentes subgrupos em estudo, no final do protocolo experimental.	72
Figura 6 – Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios-padrão, das concentrações cardíacas de grupos carbonilo em função da temperatura ambiente, da realização de exercício físico e da administração de d-anfetamina com base nas marcações de anti-dinitro-fenil-hidrazina (anti-DNPH) para cada grupo.	74
Figura 7 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20RC (A) e de um animal do grupo G37RC (B). A ultra-estrutura dos cardiomiócitos encontra-se preservada, sendo visíveis em A alguns sinais sugestivos de dilatação do retículo sarcoplasmático e um ligeiro “swelling” mitocondrial (ampliação original de A e de B - 3.150x).	75
Figura 8 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20ExC (A) e de um	76

animal do grupo G37ExC (B). Na fotografia A são observados evidentes sinais de dilatação do retículo sarcoplasmático e de “swelling” mitocondrial que contrastam com a normalidade estrutural observada em B (ampliação original de A e de B -12.500x).

Figura 9 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20RAnf (A) e de um animal do grupo G37RAnf (B), onde são observados sinais de intenso “swelling” mitocondrial (ampliação original de A – 10.000x e de B - 12.500x). 76

Figura 10 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20RAnf (A) e de um animal do grupo G37RAnf (B). De realçar o “swelling” mitocondrial afectando apenas alguns cardiomiócitos em A e em B, notando-se uma normalidade estrutural nas restantes fibras (ampliação original de A - 6.300x e de B - 8.000x). 77

Figura 11 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20ExAnf (A) e de um animal do grupo G37ExAnf (B). Nas duas fotografias são observados sinais de “swelling” mitocondrial e sinais ténues de dilatação do retículo sarcoplasmático (ampliação original de A - 6.300x e de B - 12.500x). 77

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 – Resultados médios (\bar{x}) e respectivos desvios-padrão (sd) das temperaturas médias subcutâneas exibidas pelos diferentes subgrupos, para cada momento de avaliação.	69
Quadro 2 – Resultados médios (\bar{x}) e respectivos desvios-padrão (sd) dos indicadores bioquímicos de stress oxidativo, avaliados nos diferentes subgrupos, no final do protocolo experimental.	70
Quadro 3 – Resultados médios (\bar{x}) e respectivos desvios-padrão (sd) dos indicadores bioquímicos de peroxidação lipídica (TBARS) e de oxidação proteica (grupos carbonilo), avaliados nos diferentes subgrupos, no final do protocolo experimental.	73

RESUMO

O presente estudo teve por objectivo estudar a influência do exercício físico e da temperatura corporal sobre os mecanismos de cardiotoxicidade aguda, induzida pela d-anfetamina, nomeadamente aqueles que são mediados pela produção exagerada de espécies reactivas de oxigénio.

A amostra foi constituída por 48 ratinhos, expostos a diferentes temperaturas ambientes no meio aquático (20°C e 37°C) e sujeitos à administração de d-anfetamina e/ou à realização de exercício físico; este protocolo experimental teve a duração de 60 minutos, ao longo dos quais se realizaram medições da temperatura subcutânea, tendo-se procedido, no final do referido tempo, ao sacrifício dos ratinhos, por deslocamento cervical, e à recolha de tecido muscular cardíaco para análise de indicadores bioquímicos de stress oxidativo, de lesão tecidual por stress oxidativo e para análise qualitativa das alterações morfológicas.

A nível morfológico foi possível observar-se que a d-anfetamina causou as mais extensas e evidentes alterações estruturais e ultra estruturais, as quais foram mais pronunciadas à temperatura de 20°C, sendo que todos os subgrupos expostos a esta condição protocolar exibiram sinais de dano celular e tecidual; a nível metabólico a exposição à temperatura de 20°C resultou numa significativa diminuição da temperatura subcutânea, a qual foi exacerbada pela realização de exercício físico e pela acção conjugada de exercício físico e de d-anfetamina; a exposição à temperatura de 37°C não provocou significativas oscilações na temperatura subcutânea; a nível bioquímico os diferentes subgrupos expostos a 37°C apresentaram níveis de stress oxidativo considerados fisiológicos, enquanto que os subgrupos expostos a 20°C revelaram superiores níveis de stress oxidativo e de lesão tecidual por oxidação proteica, os quais foram exacerbados pela realização de exercício físico, tendo-se verificado, apenas, uma tendência para a sua elevação pela administração de d-anfetamina.

Os principais resultados obtidos permitiram concluir que a d-anfetamina causou níveis mais evidentes de cardiotoxicidade, manifestados nas lesões estruturais e ultra estruturais observadas, os quais foram exacerbados à temperatura de 20°C, na água, pela ocorrência de hipotermia, e não pela realização paralela de exercício físico.

PALAVRAS-CHAVE: MIOCÁRDIO, LESÃO TECIDUAL, TEMPERATURA SUB-CUTÂNEA, RABDOMIÓLISE, STRESS OXIDATIVO.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the influence of physical exercise and body temperature on the mechanisms of acute cardiotoxicity induced by the d-amphetamine, namely on those mediated by over-production of reactive oxygen species.

The sample consisted of 48 mice, which were exposed to different ambient temperatures in water (20°C and 37°C) and administered d-amphetamine, and/or made to undergo physical exercise. The experimental protocol was of 60 minutes duration, during which time subcutaneous temperature measurements were taken. At the end of this time, the mice were killed by cervical dislocation; cardiac muscle tissue was then harvested and analysed for biochemical indicators and tissue lesion through oxidative stress, and a qualitative analysis was made of morphological alterations.

At the morphological level, it was found that d-amphetamine caused the most extensive and evident structural and ultra structural changes, with these being more pronounced at a temperature of 20°C; this protocol condition (20°C) was responsible for signs of cell and tissue damage for all subgroups. At the metabolic level, exposure to a temperature of 20° C resulted in a significant drop in subcutaneous temperature, and this was exacerbated by physical exercise and by the combined action of physical exercise and d-amphetamine; exposure to a temperature of 37°C caused no significant oscillations in subcutaneous temperature. At the biochemical level, the different subgroups exposed to ambient temperature of 37°C registered what were considered to be physiological levels of oxidative stress; the subgroups exposed to a temperature of 20°C registered higher levels of oxidative stress and tissue lesion through protein oxidation, that were exacerbated by physical exercise and, merely, revealed a tendency to increase with the administering of d-amphetamine.

The main results bear out the conclusion that d-amphetamine caused the highest levels of cardiotoxicity, manifest in the structural and ultra structural lesions observed, with these being exacerbated at an ambient water temperature of 20° C by the occurrence of hypothermia and not by the parallel performance of physical exercise.

KEY - WORDS : MYOCARDIUM, TISSUE LESION, TEMPERATURE, SUBCUTANEOUS, RABDOMYOLISIS, OXIDATIVE STRESS

RÉSUMÉ

La présente étude a eu pour objectif d'étudier l'influence de l'exercice physique et de la température corporelle sur les mécanismes de cardiotoxicité aiguë, induite par la d-amphétamine, notamment ceux qui sont créés par la production exagérée d'espèces réactives de l'oxygène.

Le groupe était constitué par 48 souris, exposées à de différentes températures ambiantes dans le milieu aquatique (20° C et 37° C) et sujettes à l'administration de d-amphétamine et/ou à la réalisation d'exercice physique. Ce protocole expérimental a eu la durée de 60 minutes, pendant lesquels ont été réalisés des mesurages de la température sous-cutanée; à la fin du temps cité, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et le tissu musculaire cardiaque a été recueilli pour analyse d'indicateurs biochimiques de stress oxydatif, de lésion tissulaire par stress oxydatif et pour l'analyse qualitative des altérations morphologiques.

Au niveau morphologique, il a été possible d'observer que la d-amphétamine a provoqué les altérations structurelles et ultra structurelles les plus vastes et évidentes qui ont été plus prononcées à la température de 20°C, étant donné que tous les sous-groupes exposés à cette condition protocolaire ont produit des signes de dommage cellulaire et tissulaire. Au niveau métabolique, l'exposition à une température de 20°C a eu comme résultat une diminution significative de la température sous-cutanée, qui a été exacerbée par la réalisation d'exercice physique et par l'action conjuguée d'exercice physique et de d-amphétamine ; l'exposition à une température de 37°C n'a pas provoqué d'oscillations significatives dans la température sous-cutanée. Au niveau biochimique, les différents sous-groupes exposés à 37°C ont présenté des niveaux de stress oxydatif considérés physiologiques tandis que les sous-groupes exposés à 20°C ont révélé des niveaux supérieurs de stress oxydatif et de lésion tissulaire par oxydation protéique, qui ont été exacerbés par la réalisation d'exercice physique et, seulement, une tendance à l'élévation de ces niveaux a été vérifiée par l'administration de d-amphétamine.

Les résultats principaux obtenus ont permis de conclure que la d-amphétamine a provoqué des niveaux de cardiotoxicité plus évidents, manifestés dans les lésions structurelles et ultra structurelles observées, qui ont été exacerbés à une température de 20° C, dans l'eau, par l'occurrence d'hypothermie et non par la réalisation parallèle d'exercice physique.

MOTS-CLÉ: MIOCARDE, LESION TISSULAIRE, TEMPÉRATURE SOUS-CUTANÉE, RHABDOMYOLYSE, STRESS OXYDATIF

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ADH	Hormona anti-diurética
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
ALD	Aldolase
Alfa 2	Receptores adrenérgicos
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
Ca ²⁺	Ião cálcio
CAT	Catalase
Cl ⁻	Ião cloro
CK	Creatina fosfoquinase
CYP2D6	Citocromo P-450 2D6
D ₁	Receptores de dopamina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHPR	Receptor da dihidropiridina
DIC	Coagulação intravascular disseminada
DNP	Dinitro-fenil-hidrazina
ECG	Electrocardiograma
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	“Food and drug administration”
GOT	Transaminase glutâmica-oxaloacética
GPx	Glutaciona peroxidase
Gred	Glutaciona redutase
G-SNP	Grupos sulfidrilo não proteicos
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
G20	Grupo 20°C
G37	Grupo 37°C

GRC	Subgrupo repouso controlo
GRAnf	Subgrupo repouso anfetamina
GExC	Subgrupo exercício controlo
GExAnf	Subgrupo exercício anfetamina
H ₁	Receptores de histamina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindoleacético
HM	Hipertermia maligna
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HOCl	Ácido hipocloroso
5-HT	5-Hidroxitriptamina ou Serotonina
5-HT ₂	Receptores de Serotonina
I-R	Episódio de isquemia-reperfusão
LDH	Desidrogenase láctica
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LSD	Dietilamina do ácido lisérgico
M ₁	Receptores muscarínicos
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Metilendioxianfetamina
MDEA	Metilendioxietilamfetamina
MDMA	Metilendioximetamfetamina
ME	Microscopia electrónica
MPx	Mieloperoxidase
MO	Microscopia óptica
NADPH	Forma reduzida de nicotinamina adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NPM	Neutrófilos polimorfonucleares
O ₂	Oxigénio
O ₂ ⁻	Radical superóxido
HO [•]	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Radical peroxinitrito
RS	Retículo sarcoplasmático
RYR	Receptor de rianodina

SERCA	Ca ²⁺ – ATPase do Retículo Sarcoendoplasmático
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	Programa estatístico para ciências sociais
SSRA	Síndrome de stress respiratório no adulto
TBARS	Substâncias reactivas ao ácido tio-barbitúrico
TT	Túbulos transversos
XO	Xantina oxidase

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos os estimulantes têm sido incluídos, de forma mais ou menos regular, no quotidiano do ser humano (Pickering e Stimson, 1994). Este ensaio refere que a cafeína é, provavelmente, nos dias de hoje, o estimulante lícito mais comum, ocorrendo o seu consumo diariamente. Ainda segundo estes autores, no domínio dos estimulantes ilícitos, as anfetaminas são um dos mais frequentemente consumidos.

As anfetaminas são substâncias designadas como psicoestimulantes, psicotónicas ou psicoenergéticas (Carvalho, 1998). São compostos simpaticomiméticos de acção indirecta, com uma forte capacidade de estimulação do sistema nervoso central (SNC) e com efeitos periféricos que resultam, fundamentalmente, da sua estimulação adrenérgica e serotoninérgica (Carvalho et al., 1997). Por esta razão, a toxicidade das anfetaminas parece estar directamente relacionada com a libertação massiva de neurotransmissores simpáticos dos seus locais de armazenamento (vesículas dos terminais nervosos e da medula supra-renal), levando a uma estimulação constante das células alvo, que pode persistir durante várias horas (Carvalho et al., 1997).

Este efeito adverso é comum a vários compostos de estrutura anfetamínica, como a metanfetamina, a metilendioxietilamfetamina (MDEA), a metilendioxianfetamina (MDA), a 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), entre outras, o que leva a supor que existe um mecanismo de acção comum a estes derivados sintéticos da anfetamina, o qual poderá estar ligado a esta acção simpaticomimética indirecta (Carvalho, 1998).

As anfetaminas são substâncias com alguma utilidade terapêutica; assim, a anfetamina induz um potente efeito psicotrópico o qual, associado a outras acções farmacológicas, permite a sua utilização em algumas situações clínicas, como a narcolepsia, a síndrome hiperkinética com atenção deficiente, a enurese, a incontinência, a recuperação de isquemias cerebrais, a síncope

vasodressora e o tratamento paliativo em oncologia (para refs. ver Carvalho 1998; Murray, 1998). No entanto, a redução dos efeitos da fadiga e a manutenção de altos níveis de eficácia, bem como a facilitação da performance desportiva, efeitos que decorrem da sua acção estimulante, entre outros factores, têm originado um consumo ilícito por estudantes em épocas de exames, condutores de longo curso, militares em operações de combate nocturnas, desportistas, etc. (para refs. ver Murray, 1998).

Uma investigação recente debruçou-se sobre as actuais motivações para o consumo de estimulantes por estudantes universitários americanos e concluiu que estas variam entre a melhoria da performance académica, até ao aumento da resistência atlética (Low e Gendaszek, 2002). Segundo estes autores, a busca de sensações intensas também se associa ao consumo de estimulantes legais e ilegais. Neste mesmo estudo, constata-se que o aumento do consumo se associa positivamente ao aumento das prescrições médicas de estimulantes para o tratamento do défice de atenção e hiperactividade em jovens estudantes, e à ideia generalizada de que estas drogas são relativamente seguras.

O aumento do consumo de psicoestimulantes num contexto recreativo dos quais sobressai a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), conhecida comumente como “ecstasy” (Manning et al., 2001) está nomeadamente relacionado com um fenómeno relativamente recente (década de 80), designado de “movimento rave”, no qual a presença de jovens é muito frequente assim como o consumo de psicoestimulantes devido aos efeitos agudos destes, relacionados com o aumento da energia, da endurance, da diminuição da sensação de fadiga, de ampliação da sociabilidade e da sexualidade (Cohen, 2001; Harris et al., 2002; Verheyden et al., 2002; Sue et al., 2002; para refs. ver Schwartz e Miller, 1997; Kalant, 2001). Estes jovens que seguem o “movimento rave” participam em eventos de dança que se prolongam de forma vigorosa por muitas horas; como resultado desta “maratona” e do consumo de psicoestimulantes, a temperatura corporal dos indivíduos eleva-se consideravelmente (Cohen, 2001; para refs. ver Schwartz et al., 1997; Kalant, 2001).

Vários autores (para refs. ver Kalant, 2001; Gowing et al., 2002) têm-se debruçado sobre as consequências nefastas destes compostos anfetamínicos e têm procurado compreender os mecanismos de toxicidade que estarão na sua génese; no entanto, são ainda numerosas as dúvidas e as incertezas que rodeiam a acção destes compostos, face à complexidade dos mecanismos que parecem estar envolvidos, bem como pela influência que variáveis endógenas e exógenas parecem ter (Brody et al., 1998; Zhang et al., 2003; Duarte et al., 2004). As investigações realizadas têm incidido particularmente sobre os mecanismos e manifestações de toxicidade anfetamínica ao nível cardiovascular (Brody et al., 1998; Lester et al., 2000; Irvine et al., 2001; Phillis et al., 2001; Harris et al., 2002; Ratliff et al., 2002; Asghar et al., 2003), neurológico (Miller e O'Callaghan, 1995; Cadet e Brannock, 1998; Zheng e Laverty, 1998; Shankaran et al., 2001; Spielewoy et al., 2001; Yuan et al., 2002; Saadat et al., 2003; Zhang et al., 2003;), músculo-esquelético (Duarte et al., 1999; Reuter et al., 1998; Sue et al., 2002; Duarte et al., 2004), metabólico (Dafters e Lynch, 1998; Carvalho et al., 2002; Martinez et al., 2002; Mechan et al., 2002; Saadat et al., 2003;), hepático e renal (Carvalho et al., 1996; Carvalho et al., 1997; Carvalho et al., 1999; Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2002) e subjectivo e comportamental (Harris et al., 2002; Verheyden et al., 2002; Asghar et al., 2003). Com estas sucessivas pesquisas, e contrariamente à ideia geral, partilhada pelos consumidores, que as anfetaminas e outros psicoestimulantes são relativamente seguros, as referências na literatura sobre as consequências prejudiciais destes compostos anfetamínicos têm-se multiplicado; nestas consequências funestas incluem-se, em sobredosagem aguda, a hipertermia, a midríase, a hiperreflexia, as pré-cordialgias, as arritmias cardíacas, a confusão, o pânico, o comportamento agressivo, as alucinações, o delírio, as convulsões, a depressão respiratória, a depleção de fluídos e electrólitos, a coagulação intravascular disseminada, a rabdomiólise, a insuficiência renal aguda, a toxicidade hepática, o coma, o colapso circulatório e a morte (Ginsberg et al., 1970; para refs. ver Schwartz et al., 1997; Carvalho, 1998;). Apesar destas inúmeras manifestações de toxicidade, são também cada vez mais numerosas as evidências que apontam para o consumo crescente de psicoestimulantes, pela população mais jovem, as quais se

constatam em diversos estudos (Pickering e Stimson, 1994; Royo-Borbonada et al., 1997; Ghuran et al., 2001; Manning et al., 2001; Pedersen e Wichstrøm, 2001; Walters et al., 2002; para refs. ver Schwartz e Miller, 1997; Murray, 1998; Kalant, 2001; Gowing et al., 2002).

Várias pesquisas (Dafters e Lynch, 1998; Carvalho et al., 2002; Martinez et al., 2002; Mechan et al., 2002; Saadat et al., 2003) têm também chamado a atenção para as consequências nefastas do consumo de psicoestimulantes, de forma particular, para a sua acção sobre os mecanismos de regulação da temperatura corporal, nomeadamente para a ocorrência de hipertermia, sendo esta uma das manifestações da toxicidade induzida pela d-anfetamina. No entanto, a hipertermia parece constituir-se também, por si só, como um mecanismo de toxicidade, como o apontam variados estudos (Carvalho et al., 2001; Elster et al., 2002; Martinez et al., 2002; para refs. ver Jurkatt-Rott et al., 2000; Kosack e MacIntyre, 2001; Louis et al., 2001; Meis, 2001; Nelson, 2001). Por outro lado, algumas investigações apontam também para a possibilidade da temperatura ambiente ter alguma influência no âmbito da toxicidade induzida pela d-anfetamina, no sentido da exacerbação das consequências tóxicas destes compostos (Miller e O`Callaghan, 1995; Dafters e Lynch, 1998; Carvalho et al., 2002). No entanto, o papel da temperatura ambiente, na toxicidade induzida pela d-anfetamina, não está ainda plenamente estudado e clarificado, não se compreendendo totalmente a sua influência. Está também pouco esclarecido o fenómeno da hipertermia, que ocorre frequentemente como manifestação directa da toxicidade induzida pela d-anfetamina. Assim surgem ainda algumas incertezas a rodear este fenómeno, nomeadamente, no que diz respeito ao seu papel como factor despoletador de subsequentes manifestações de toxicidade.

Em alguns ensaios a ocorrência de rabdomiólise do músculo-esquelético como consequência do consumo de d-anfetamina, e de outros psicoestimulantes, tem sido descrita (Reuter et al., 1998; Duarte et al., 1999; Sue et al., 2002; Duarte et al., 2004). O dano do músculo-esquelético induzido pelo exercício físico tem sido também descrito em vários estudos (Line e Rust, 1995; Reuter et al., 1998; NG e Jonhston, 2000; Criner et al., 2002; Rupert, 2002; Lane e Phillips, 2003;

Duarte et al., 2004; para refs. ver Criddle, 2003). Apesar da evidência que a actividade física é um fenómeno que se associa frequentemente ao consumo de psicoestimulantes, são ainda escassas as investigações que se têm debruçado sobre esta questão, surgindo ainda muitas dúvidas acerca do papel da actividade física na toxicidade induzida pela d-anfetamina, nomeadamente naquela que atinge o músculo-esquelético. No que diz respeito à toxicidade induzida pela d-anfetamina sobre o músculo cardíaco, não há estudos conhecidos, pelo que a necessidade de serem realizadas investigações sobre esta problemática é ainda mais urgente.

Várias pesquisas têm defendido que a produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio, que resulta em stress oxidativo, poderá ser um dos mecanismos envolvidos na toxicidade cardíaca induzida pela d-anfetamina (Wolf et al., 2000; Carvalho et al., 2002; Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2003). Outros estudos parecem ainda demonstrar que o exercício físico se constitui como uma agressão orgânica favorável à produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio e ao incremento do stress oxidativo a nível celular, tecidual e orgânico (Poulsen et al., 1996; Bejma et al., 2000; Viña et al., 2000; Schippinger et al., 2002; Palazzetti et al., 2003; para refs. ver Packer, 1997; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Ascensão et al., 2003). Face ao exposto parece ser pertinente a investigação deste mecanismo, já que este parece ser, de facto, importante na toxicidade induzida pela d-anfetamina.

Confrontados pela vasta lista de consequências prejudiciais, que estão associadas ao consumo de anfetaminas e de outros psicoestimulantes, e pelas dúvidas e incertezas que rodeiam os mecanismos de toxicidade envolvidos, surge esta dissertação com o objectivo geral de contribuir para um esclarecimento mais aprofundado sobre os mecanismos de toxicidade aguda das anfetaminas. De forma mais particular este trabalho irá procurar debruçar-se sobre a cardiotoxicidade induzida pela d-anfetamina, nomeadamente sobre as alterações bioquímicas, morfológicas e metabólicas sofridas pelo músculo cardíaco. Este interesse particular justifica-se, em certa medida, pelo facto da grande maioria dos estudos já realizados (Brody et al., 1998; Lester et al., 2000; Irvine et al., 2001; Phillis et al., 2001; Harris et al., 2002; Ratliff et al.,

2002; Asghar et al., 2003) incidirem, de forma mais comum, sobre as alterações funcionais cardíacas provocadas pelas anfetaminas e análogos destas, existindo portanto um certo vazio científico neste âmbito. Este estudo irá também procurar compreender, para além das consequências térmicas directas que a d-anfetamina poderá ocasionar, a influência que a temperatura corporal poderá ter sobre a cardiotoxicidade induzida directamente pela d-anfetamina, nomeadamente aquela que é mediada pela produção exagerada de espécies reactivas de oxigénio (ERO). Esta dissertação irá também procurar esclarecer se o exercício físico, de forma aguda, poderá ser responsável por uma maior ou menor susceptibilidade individual aos efeitos tóxicos directos ou indirectos das anfetaminas. Parecendo actualmente relevante o estudo da acrescida produção de espécies reactivas de oxigénio, como mecanismo de cardiotoxicidade, esta dissertação irá utilizar como parâmetros de toxicidade aguda, alguns indicadores bioquímicos teciduais de stress oxidativo.

Para se atingirem estes objectivos, foi implementado um protocolo experimental com as seguintes características: foi utilizado um grupo de ratinhos, exposto a diferentes condições térmicas ambientais (20°C e 37°C), no meio líquido; alguns animais realizaram exercício físico, enquanto os restantes se encontraram em situação de repouso; a um grupo de animais foi administrada substância solvente e a outro foi administrado sulfato de d-anfetamina. A todos os animais foi medida a temperatura subcutânea e, após sacrifício, retirado o músculo cardíaco para posterior avaliação bioquímica e morfológica. Foram avaliados como indicadores bioquímicos de stress oxidativo a glutathiona oxidada (GSSG), a glutathiona reduzida (GSH) e a relação GSSG/GSH; como indicadores de lesão tecidual por stress oxidativo os grupos carbonilo e os TBARS (Substâncias reactivas ao ácido tio-barbitúrico).

No âmbito formal, no que concerne aos aspectos estruturais desta dissertação, esta foi dividida em duas partes fundamentais:

Na primeira parte surge a Revisão da Literatura na qual se procura dar a conhecer o percurso histórico deste composto (anfetamina), as tendências de consumo no passado e no presente, apresentação e formas de administração,

farmacocinética e mecanismos e efeitos farmacológicos. De forma mais extensiva são apresentados os mecanismos de toxicidade geral, nomeadamente o mecanismo oxidativo de toxicidade, e mecanismos e manifestações de toxicidade particular, particularmente o mecanismo de cardiotoxicidade, de toxicidade muscular (rabdomiólise) e o papel das repercussões metabólicas (hipertermia), no fenómeno de toxicidade.

Na segunda parte deste documento, são expostos os Procedimentos Experimentais implementados. Assim, são apresentados os materiais e métodos utilizados, procedimentos estatísticos implementados, principais resultados obtidos, discussão da metodologia e dos resultados, conclusões deste estudo e bibliografia consultada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA – ANFETAMINAS

2.1. Aspectos históricos

A anfetamina [(±)- α -metilfenetilamina] e outras drogas relacionadas, como a metanfetamina, a MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina) e a MDA (metilenodioxianfetamina), são drogas totalmente sintéticas, que não existem na natureza como tal (para refs. ver Kalant, 2001).

A anfetamina foi obtida pela primeira vez em 1887 (Pickering e Stimson, 1994; para refs. ver Murray, 1998) por Edeleanu, durante um trabalho de síntese de aminas alifáticas, trabalho esse que permaneceu esquecido até ao início dos anos 30 (para refs. ver Carvalho, 1998). Por esta altura, um outro investigador (Gordon Alles) deparou-se com as propriedades estimulantes deste composto (fenilisopropilamina) e a comunidade médica reagiu positivamente à introdução da anfetamina em protocolo terapêutico, recomendando-a para o tratamento de diversas doenças (para refs. ver Carvalho, 1998).

A MDA foi sintetizada em 1910 e a MDMA em 1912; a MDA foi patenteada como supressor de tosse, tranquilizante e inibidor de apetite, mas nunca foi comercializada para estes fins (para refs. ver Kalant, 2001). A MDMA também foi patenteada em 1914 como inibidor de apetite, tendo sido utilizada na década de 70 como auxiliar na psicoterapia devido aos seus efeitos sobre a comunicação facilitada, aceitação e redução de fobias; no entanto, o seu uso actual tem sido apenas para fins recreativos (Walubo e Seger, 1999; Harris et al., 2002; Walters et al., 2002; para refs. ver Kalant, 2001). A primeira referência ao uso recreativo desta substância surge em 1972 (Walubo e Seger, 1999).

A anfetamina foi comercializada na década de 30 para efeitos de perda de peso, como descongestionante nasal, como anti-depressivo, útil no tratamento da narcolepsia, entre outras utilizações terapêuticas, tendo o seu uso sido, mais tarde, restringido devido ao abuso e risco de dependência, entre outros factores adversos (Pickering e Stimson, 1994; para refs. ver Kalant, 2001).

Em 1931 surgiu o primeiro produto comercializado com fins terapêuticos que consistia num inalador nasal contendo Benzedrine, nome de patente para a fenilisopropilamina racémica (dl-anfetamina) (para refs. ver Murray, 1998). Este inalador era eficaz para o tratamento da congestão nasal, rinite, mas cedo se aferiu que também aliviava a sonolência e a fadiga, factos que conduziram à utilização deste composto para o tratamento da narcolepsia em 1935 (para refs. ver Murray, 1998). Estes efeitos publicitados pela indústria e imprensa contribuíram para o abuso generalizado da anfetamina (para refs. ver Murray, 1998).

2.2. Evolução das Tendências de Consumo de Anfetaminas e Análogos

O consumo abusivo de anfetaminas, com fins não terapêuticos, iniciou-se na década de 30; em 1936 estudantes universitários começaram a consumir anfetaminas para permanecerem acordados durante os períodos de exame, homens de negócios começaram igualmente a utilizá-las para permanecerem alerta e resistirem à fadiga, bem como condutores de longo curso para permanecerem acordados na estrada (para refs. ver Murray, 1998). A melhoria da performance desportiva era-lhe também atribuída, e estudos indicavam que pequenas doses de anfetaminas reduziam os efeitos da fadiga e mantinham altos níveis de eficácia (para refs. ver Murray, 1998).

O uso de estimulantes no contexto militar data da II Guerra Mundial, e tornou-se uma constante em todos os conflitos que lhe seguiram (Bower, 2003). Soldados canadianos, ingleses, alemães e japoneses usaram anfetaminas para contrariar a fadiga em condições de combate durante a II Guerra Mundial (Pickering e Stimson, 1994; para refs. ver Murray, 1998). Estas drogas permaneceram igualmente disponíveis durante as Guerras da Coreia e Vietname; soldados japoneses e trabalhadores fabris também as consumiram e, com o fim da guerra, o seu uso tornou-se indiscriminado conduzindo a situações de abuso (para refs. ver Murray, 1998). A primeira epidemia documentada de abuso de anfetaminas ocorreu no Japão imediatamente após a II Guerra Mundial, onde existiam 2 milhões de indivíduos consumidores

(Pickering e Stimson, 1994). Na Suécia o rápido aumento de consumo de estimulantes ocorreu em 1938, tendo-se tornado abusivo com o fim da II Guerra Mundial (Pickering e Stimson, 1994).

Nos anos 50 as anfetaminas eram frequentes entre elites sociais e políticas (Pickering e Stimson, 1994). Nas décadas de 50 e 60 o seu consumo continuou a crescer e, nos anos 70, uma acção para o controlo de substâncias, levada a cabo pela Food and Drug Administration (FDA) alterou a actuação face a esta droga, controlando mais asperamente a produção, importação e prescrição de anfetaminas e análogos (para refs. ver Murray, 1998). Assim em 1971 a FDA considerou as anfetaminas como substâncias de Grau II (possuem utilizações médicas mas com elevado potencial de abuso) e restringiu a sua produção e utilização legítima ao tratamento da narcolepsia, do comportamento hiperkinético em crianças e ao tratamento da obesidade (Shields, 1990). Estas restrições levaram ao início da sua produção clandestina (para refs. ver Murray, 1998). Também no Reino Unido o consumo e posse de anfetaminas tornaram-se ofensa em 1964 e, em 1971, estas foram incluídas no “Misuse of Drugs Act” (Pickering e Stimson, 1994).

Em 1981, no Reino Unido, as capturas policiais de anfetaminas foram apenas ultrapassadas pelas de Cannabis (Pickering e Stimson, 1994). Em 1987, as forças policiais dos Estados Unidos da América (EUA) descobriram 650 laboratórios clandestinos, envolvidos na síntese de anfetaminas (Shields, 1990).

Há referências à utilização da anfetamina em esforços de guerra recentes, como a Guerra do Golfo (1991) (operações “Desert Shield” e “Desert Storm”), bem como pelos astronautas nas missões Apolo (Bower, 2003). Segundo estes autores os efeitos mais promissores destes compostos, naquelas situações, revelaram-se fundamentalmente na restauração dos níveis de vigiância durante os períodos de diminuição da função. Na medida em que a natureza da guerra se alterou, com acções de combate nocturnas e missões de longa duração, continuarão a existir pressões para o uso de drogas que mantenham a performance (Bower, 2003).

Dados epidemiológicos do abuso de anfetamina e metanfetamina têm sido documentados nos EUA, Espanha, Suécia e Japão; este abuso é comum entre seguidores de dietas, entre jovens em idade escolar, entre participantes das chamadas festas “rave” e tem sido encontrado em urgências médicas e em pacientes do foro psiquiátrico (para refs. ver Murray, 1998).

Em 1985, os derivados da anfetamina (MDMA, MDA, MDEA) foram restringidos de forma completa nos EUA, Canadá e Reino Unido (para refs. ver Kalant, 2001), tendo a MDMA sido classificada de substância controlada tipo 1 pelo DEA (Drug enforcement administration), considerando-se que este composto apresentava potencialidades de abuso, não possuindo nenhum valor terapêutico (Walubo e Seger, 1999; Walters et al., 2002).

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), vulgarmente conhecida por “ecstasy”, é um análogo da anfetamina, partilhando as suas propriedades estimulantes, às quais se acrescentam propriedades alucinogénias (induz euforia, auto-conhecimento aumentado mas não produz efeitos psicóticos ou distorções visuais) (Walters et al, 2002).

Esta droga é apelativa para os jovens e considerada segura pelos utilizadores em contexto recreativo e por alguns psicoterapeutas, devido às suas características entactogénicas (aumenta a empatia, introspecção e comunicação, induzindo estados positivos de humor e sentimentos de tranquilidade e intimidade); no entanto, os efeitos adversos a curto prazo não se fazem esperar (para refs. ver Schwartz e Miller, 1997). Este composto já se encontra associado a várias fatalidades nos EUA e Reino Unido, e os casos de morbidade e mortalidade encontram-se relacionados, fundamentalmente, com hipertermia fulminante, arritmias cardíacas, coagulação intravascular disseminada, rabdomiólise, insuficiência renal aguda e toxicidade hepática (Irvine et al., 2001; para refs.ver Schwartz e Miller, 1997). O aparecimento dos eventos “rave” na década de 80 originou um vertiginoso aumento do consumo de “ecstasy” entre os jovens devido, particularmente, aos efeitos agudos desta substância (aumenta a energia, endurance, diminui a sensação de fadiga,

amplia a sociabilidade e sexualidade) (Cohen, 2001; Harris et al., 2002; Sue et al., 2002; Verheyden et al., 2002; para refs. ver Schwartz e Miller, 1997; Kalant, 2001). Esta é, actualmente, uma droga largamente consumida na Europa, Austrália e EUA e o seu uso associa-se mais fortemente a estes eventos “rave” do que a um uso solitário (Walubo e Seger, 1999; para refs. ver Gowing et al., 2002).

O facto de ser considerada uma droga relativamente segura também tem contribuído para a sua popularidade (para refs. ver Kalant, 2001). Em 1992, vinte mil a trinta mil jovens ingleses frequentavam semanalmente as festas “rave”, e nesta década, estas festas também se tornaram populares nos EUA (para refs. ver Schwartz e Miller, 1997). Dados recentes indicam que 1,5 milhões de jovens alemães participam de forma regular nas festas “rave”, existindo 2 milhões de participantes ocasionais; a grande maioria é do sexo masculino com idades compreendidas entre 14-43 anos (Hitzler, 2002)

Os frequentadores das festas “raves” participam num evento de dança, que se prolonga de forma vigorosa por muitas horas, ao som de música ritmada e electrónica, onde é muito frequente o consumo de substâncias psico-activas (speed, cannabis, alucinogénios) pelos seus efeitos estimulantes, aumento do contacto interpessoal e experiências sensoriais aumentadas (Hitzler, 2002). Analistas consideram, no entanto, o emergir do consumo de ecstasy e de outras drogas relacionadas, como um fenómeno cultural e transitório (Hitzler, 2002). Acompanhando as dimensões epidémicas do uso desta droga, o relato documentado dos seus efeitos adversos tem aumentado (Cohen, 2001; para refs. ver Schwartz e Miller, 1997; Kalant, 2001). Uma revisão detalhada levada a cabo por Kalant (2001) revelou a ocorrência, na literatura científica, até à data, do relato de 87 fatalidades relacionadas com o consumo de ecstasy e outras drogas estimulantes.

Estudos realizados sobre os efeitos adversos da MDMA (diminuição dos marcadores de função serotoninérgicos, efeitos cognitivos e fisiológicos) não contribuíram para uma diminuição do seu consumo; dados de 2000, confirmam

que 8,2% dos estudantes do 12º ano nos EUA consumiram MDMA no último ano (Harris et al., 2002).

Uma outra pesquisa corrobora estas informações e refere que o consumo de drogas recreativas atingiu dimensões epidémicas, estimando-se que cerca de 45 milhões de europeus já consumiram cannabis em algum momento das suas vidas; este consumo tem se associado frequentemente a risco de morte prematura e, de forma particular, as drogas recreativas têm se associado fortemente a nefastos efeitos sobre a função cardiovascular (Ghuran et al., 2001).

Na Noruega o uso de drogas ilegais como a cannabis, as anfetaminas, e a MDMA aumentou durante os anos 90 (Pederson e Wichstrøm, 2001). Este estudo revela uma evolução no consumo de drogas, existindo uma sequência típica na utilização social de drogas ilícitas: 1º cannabis, 2º outras anfetaminas, 3º MDMA e 4º heroína. O estudo evidencia ainda uma associação positiva entre o consumo de tabaco, álcool e o consumo de drogas ilícitas (Pedersen e Wichstrøm, 2001).

Uma outra investigação constatou que a anfetamina é a segunda droga mais consumida em Londres, logo após a cannabis (Manning et al., 2001). Estes autores verificaram ainda que a possibilidade de experimentar drogas alucinogénias é particularmente elevada, face à sua ampla disponibilidade e que as questões chaves que explicam o consumo de drogas, como a cannabis e anfetaminas, são a sua grande disponibilidade, o baixo preço, os baixos níveis de risco percebido, o controlo dos efeitos e o impacto limitado noutras actividades (Manning et al., 2001).

Uma outra pesquisa, nos EUA, debruçou-se sobre as motivações para o consumo de estimulantes por estudantes universitários e concluiu que estas variam entre a melhoria da performance académica, até ao aumento da resistência atlética (Low e Gendaszek, 2002); também a busca de sensações aumentadas se associa ao consumo de estimulantes legais e ilegais. Também se constata neste estudo que o aumento do consumo se associa positivamente

ao aumento das prescrições médicas de estimulantes para o tratamento do deficit de atenção, hiperactividade em jovens estudantes e devido à relativa percepção de estas serem drogas seguras (Low e Gendaszek, 2002).

Também em Espanha um estudo recente revela que entre as drogas ilícitas a cannabis é a mais consumida, iniciando-se o seu uso na adolescência (Royo-Borbonada et al., 1997). Segundo este estudo as anfetaminas apresentam o valor mais alto de consumo entre os estudantes e, recentemente, o consumo de um novo tipo de drogas ilícitas, as “designer drugs”, tem-se elevado entre os jovens.

O consumo de MDMA tem surgido em idades cada vez mais precoces e os investigadores constatam que estes jovens não são estudantes mal sucedidos, como se poderia pensar; verificaram ainda que o factor demográfico que mais se associa ao consumo de MDMA é o consumo de marijuana (Walters et al., 2002).

Em Portugal, no que diz respeito ao consumo de substâncias psicoestimulantes, existem poucos dados conhecidos. Recentemente foram revelados dados referentes a um inquérito nacional ao consumo de substâncias psicoactivas, realizado em 2001, pela Universidade Nova de Lisboa. Este revelou que em Portugal a Cannabis é a droga mais consumida seguindo-se a cocaína, a ecstasy (MDMA), outras anfetaminas, o LSD e a heroína. O intervalo etário onde o consumo é mais frequente situa-se entre os 15 e os 34 anos, sendo o sexo masculino predominante. O contexto de consumo destas drogas verificou-se ser geralmente festivo (Noite de passagem de ano, festas públicas, festas rave/techno, festas transe, etc.) (in revista Visão, 3 de Junho de 2004).

2.3. Apresentação e formas de administração

A anfetamina corresponde a uma mistura racémica (equimolecular das formas dextrógira e levógira) da (\pm) - α -metilfenetilamina (IUPAC), e possui muitos sinónimos como desoxinorefedrina, fenilisopropilamina, benzedrina, entre muitos outros (para refs. ver Carvalho, 1998).

As anfetaminas são aminas que podem existir sob a forma de uma base ou como sal de variadíssimos ácidos (para refs. ver Kalant, 2001). Como bases são voláteis e podem ser inaladas e, de facto, a anfetamina foi inicialmente comercializada desta forma, num inalador como descongestionante nasal; como sais, não são voláteis, mas são muito solúveis na água e podem, por isso, ser administrados de forma venosa e/ou oralmente (para refs. ver Kalant, 2001).

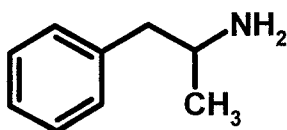


Figura 1 – Representação da estrutura química da anfetamina

2.4. Farmacocinética

2.4.1. Absorção e Distribuição

A anfetamina e a MDMA são bem absorvidas pelas mucosas do tracto gastrointestinal (para refs. ver Kalant, 2001; Gowing et al., 2002), nasofaringe, ramificação traqueobrônquica e vagina, sendo distribuídas por todo o organismo através do sangue (Vree e Henderson, 1980; Lapierre e Hrdina, 1988; Shields, 1990).

No homem, após administração oral de uma dose de 0,25 mg/Kg, os picos plasmáticos podem aparecer entre a segunda e terceira hora, variando de acordo com os níveis de actividade física (aumenta a velocidade de absorção) e a presença de alimentos no estômago (diminui a velocidade de absorção) (Angrist et al., 1987; Shields, 1990; Brauer et al., 1996), sendo os seus efeitos máximos atingidos ao redor da segunda hora (Angrist et al., 1987). No caso da MDMA, os picos de concentração plasmática ocorrem normalmente duas horas após administração oral, e doses de 50, 75 e 125 mg de MDMA em indivíduos saudáveis causaram picos de concentração sanguínea de 106, 131 e 236 ng/ml respectivamente (para refs. ver Kalant, 2001).

A via intramuscular também permite uma ampla distribuição da anfetamina pelo organismo; no entanto, a velocidade de difusão dependerá da perfusão sanguínea do músculo onde a anfetamina seja administrada (Vree e Henderson, 1980).

Doses de 25 mg de d-anfetamina originaram, num estudo, valores pico de concentração plasmática de 41 ng/ml após 3,5 horas da administração oral e, de acrescentar que, entre os 90 minutos e os 500 minutos, as concentrações plasmáticas se mantiveram em mais de 75% do valor pico (Asghar et al., 2003). Neste estudo, o valor pico da pressão arterial ocorreu aos 90 minutos e os efeitos subjectivos máximos ocorreram no intervalo 60-90 minutos.

A anfetamina possui características anfipáticas e atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica, distribuindo-se pelo cérebro de forma não homogénea (Lapierre e Hrdina, 1988); a ligação às proteínas plasmáticas e o volume de distribuição variam muito no Homem, podendo alternar entre 15% a 40% e de 3 a 4 L/Kg, respectivamente (Moffat, 1986; Lapierre e Hrdina, 1988; Shields, 1990).

Após administração intraperitoneal em ratos (4 mg/kg) e em ratinhos (2,5 e 10 mg/kg), a concentração máxima plasmática é atingida em 15 minutos e o tempo de semi-vida é de cerca de 1 hora acontecendo o mesmo ao nível dos

diferentes órgãos (pulmões, coração, rins, fígado e cérebro) (Jonsson e Lewander, 1974; Rifee et al., 1978). Após administração intravenosa (0,5 mg/kg) em ratos, o tempo de semi-vida plasmático e cerebral é também cerca de 1 hora (Cho et al., 1973)

A d-anfetamina, administrada intraperitonealmente, atinge concentrações no plasma e cérebro, duas vezes superiores à l-anfetamina, o que contribuirá para a maior potência estimulante do isômero dextro; na administração intravenosa, a d- e l- anfetamina atingem concentrações semelhantes no plasma e cérebro, embora a l-anfetamina apresente um menor tempo de semi-vida (Rifee et al., 1978).

2.4.2. Metabolismo da Anfetamina

A anfetamina, a MDMA e outras drogas semelhantes, são metabolizadas principalmente no fígado, onde a CYP2D6, isoenzima do citocromo P450, é a principal responsável, exibindo uma actividade polimórfica, a qual origina rápidos e lentos metabolizadores, encontrando-se estes últimos em maior risco de toxicidade; no entanto, outras enzimas parecem estar também envolvidas na sua degradação (Walubo e Seger, 1999; para refs. ver Kalant, 2001; Gowing et al., 2002; Cho et al., 1999).

As drogas de abuso são geralmente químicos lipossolúveis e a sua eliminação depende do seu metabolismo (para refs.ver Cho et al., 1999). O citocromo P450 é uma super-família de proteínas com ferro, com numerosos papéis fisiológicos; um subconjunto destas proteínas férricas é responsável pela fase I do metabolismo de substâncias lipossolúveis, convertendo-as em derivados mais polares e funcionais, para que possam depois passar à fase II, ou metabolismo baseado na conjugação (para refs. ver Cho et al., 1999).

Os principais passos metabólicos da anfetamina são a hidroxilação aromática, dando origem à 4-hidroxianfetamina, a desaminação oxidativa para dar origem à fenilacetona e a N-oxidação, que origina a N-hidroxianfetamina (para refs. ver

Cho et al., 1999). Ainda, segundo estes autores, a hidroxilação aromática gera a 4-hidroxianfetamina, farmacologicamente activa, sendo este o passo mais importante nos ratos, com 70 a 90% da dose excretada sob esta forma. O metabolismo da l- anfetamina é cerca de 1,3 a 4 vezes mais rápido que o da d- anfetamina (para refs. ver Carvalho, 1998).

2.4.3. Excreção renal da Anfetamina e de seus metabolitos

A anfetamina é excretada, fundamentalmente, pela via renal (para refs. ver Gowing et al., 2002), ocorrendo igualmente a sua excreção pela via biliar (em ratos), pelo suor, saliva, existindo igualmente a sua acumulação nas fânegas (para refs. ver Carvalho, 1998).

No homem, após ingestão de doses elevadas, a anfetamina pode ser detectada na urina durante vários dias (Moffat, 1986); assim, segundo este autor, sob condições normais, cerca de 30% da anfetamina é excretada na forma não modificada, num período de 24 horas, e cerca de 90% da quantidade total é excretada em 3 ou 4 dias. A anfetamina, sendo um composto com características básicas, é facilmente excretada na urina sem biotransformação prévia, embora a quantidade dependa do fluxo e do pH da urina (para refs ver Carvalho, 1998). Se a urina estiver acídica (pH 5) a anfetamina fica praticamente toda ionizada, sendo pouco reabsorvida nos túbulos após ter ocorrido a filtração glomerular (a quantidade excretada de anfetamina não modificada pode atingir os 74% na urina acidificada e diminuir para 1 a 4% na urina alcalinizada) (Vree e Henderson, 1980; Moffat, 1986; Shields, 1990). Sob condições alcalinas, o ácido hipúrico e o ácido benzóico atingem cerca de 50% do total da anfetamina excretada (Moffat, 1986). Em condições normais, 16% a 28% da anfetamina é excretada em 24 horas como ácido hipúrico, 4% como benzoilglucurónido, 2 a 4% como 4-hidroxianfetamina, 2% como norefedrina, detectando-se também pequenas quantidades de 4-hidroxinorefedrina e de fenilacetona (Moffat, 1986).

2.5. Acção Farmacológica

A Anfetamina e os compostos de estrutura anfetamínica (MDA, MDEA, MDMA) são substâncias que se assemelham aos neurotransmissores naturais, tais como a epinefrina e dopamina, e a maior parte dos seus efeitos e acções biológicas assemelham-se aos da epinefrina, dopamina e serotonina (para refs. ver Kalant, 2001).

A produção de serotonina pelos neurónios regula a agressividade, humor, sono, sensibilidade à dor, sexualidade, memória e temperatura; a dopamina exerce, por sua vez, uma acção importante sobre o controlo do movimento, cognição, motivação e reforço (para refs. ver Gowing et al., 2002). A dopamina está igualmente envolvida na regulação da pressão arterial e da frequência cardíaca, produzindo hipertensão e taquicardia (Phillis et al., 2001). A serotonina e norepinefrina, também têm um papel regulador da função cardiovascular (Phillis et al., 2001).

A anfetamina é um composto simpaticomimético de acção indirecta e a sua acção ocorre através da libertação de neurotransmissores simpáticos das vesículas dos terminais nervosos e da medula supra-renal, nomeadamente serotonina (5- hidroxitriptamina ou 5-HT) e catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina); estes compostos, por sua vez, activam os respectivos receptores levando a um estado de estimulação simpática, com uma intensidade e duração dependente da dose e da via de administração (Carvalho et al., 1997; Carvalho et al., 1999; para refs ver Kalant, 2001).

A anfetamina provoca a libertação de aminas biogénicas, por diferentes mecanismos, de acordo com a dose administrada; assim, para doses baixas, a anfetamina leva à libertação das monoaminas por permuta com estas a nível dos seus transportadores de membrana, segundo um processo designado por difusão por permuta, segundo o qual a anfetamina é levada para o interior pelos sistemas de captação neuronal, e estes, uma vez no interior das membranas, transportam as monoaminas livres para o espaço sináptico (Liang e Rutledge, 1982; Zaczec et al., 1991; Kuczenski e Segal, 1994). Em doses

moderadas a altas (> 5mg /Kg), verifica-se que para além do processo de difusão por permuta, ocorre a penetração da anfetamina nos terminais nervosos por difusão passiva e deslocação das monoaminas das vesículas onde se encontram armazenadas (Liang e Rutledge, 1982; Seiden et al., 1993). Uma vez no interior dos neurónios, a anfetamina possui uma potente acção inibidora da captação vesicular das catecolaminas, aumentando a permanência destas no espaço sináptico (Kuczenski e Segal, 1994). Sendo uma base fraca, a anfetamina pode também causar aumento do pH vesicular e um efluxo de catecolaminas e 5-HT uma vez que estas aminas são mantidas no interior das vesículas através de um gradiente de iões H^+ mantido por uma bomba de prótons ATP dependente (Seiden et al., 1993; Kuczenski e Segal, 1994). A d-anfetamina, comparativamente à l-anfetamina, manifestou ser dez vezes mais potente neste processo (Zaczec et al., 1991). No SNC, a área do estriado, que é rica em neurónios dopaminérgicos, foi a que demonstrou ter maior capacidade de transporte para a anfetamina (Zaczec et al., 1991), sugerindo assim uma grande especificidade desta para os neurónios dopaminérgicos do SNC (Carvalho, 1998).

A anfetamina, para além de aumentar a libertação de catecolaminas, nomeadamente dopamina, e inibir a sua recaptção neuronal (Phillis et al., 2001), aumentando assim o tempo de permanência das aminas biogénicas na fenda sináptica, provoca ainda uma diminuição do metabolismo destas pela monoamina oxidase (MAO), o que implica o prolongamento da estimulação simpática (para refs. ver Frishman et al., 2003). A anfetamina, quando administrada em doses baixas (0,25 -1,5 mg /Kg), estimula a síntese de dopamina, o que parece dever-se a uma estimulação da tirosina hidroxilase pela ausência do seu produto final, uma vez que a dopamina é libertada para o espaço sináptico; no entanto, este efeito não se verifica para doses mais elevadas, o que parece dever-se à interferência com o armazenamento da dopamina nas vesículas (Kuczenski e Segal, 1994). Nos núcleos *caudado* e *accubens*, a anfetamina (2 mg/Kg) origina um aumento da dopamina extracelular nos primeiros 20 a 40 minutos, 15 a 20x, atingindo 25 nM, havendo um retorno gradual até aos níveis basais durante 2 a 3 horas; para doses mais

elevadas ($> 5 \text{ mg /Kg}$), as concentrações extracelulares de dopamina podem atingir níveis de cerca de $1,5 \mu\text{M}$ (Kuczenski e Segal, 1994).

A MDMA tem uma acção neurotóxica potente a nível cerebral, actuando fundamentalmente sobre os terminais nervosos serotoninérgicos, causando, nestes locais, depleção de serotonina (5-HT) e do seu principal metabolito, ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA), bem como diminuição da actividade da enzima triptofano hidroxilase e redução dos locais de recaptção de 5-HT (Shankaran et al., 2001; Darvesh et al., 2002).

O mecanismo de acção da MDMA sobre a serotonina parece ser o seguinte: inicialmente causa a libertação da 5-HT armazenada nos nervos terminais, seguidamente previne a recaptção do excesso de 5-HT da fenda sináptica e, por fim, inibe a triptofano hidroxilase, inibindo assim a nova síntese de 5-HT; o efeito sobre a triptofano hidroxilase permite prever a atenuação de 5-HT central por alguns dias após a dose aguda, causando efeitos sub-agudos (Verheyden et al., 2002).

Um estudo revela que a dopamina endógena cerebral não é necessária para a expressão da neurotoxicidade induzida pela MDMA sobre a serotonina (Yuan et al., 2002); no entanto, a MDMA, quando associada a temperaturas elevadas, provoca também danos sobre os axónios serotoninérgicos e axónios terminais dopaminérgicos. Parece assim, segundo este estudo, que a MDMA tem uma actuação predominante sobre a serotonina a baixas dosagens e um pequeno efeito sobre a dopamina a doses mais elevadas. Dados confirmam ainda que a hipotermia protege contra os efeitos tóxicos sobre a serotonina pela MDMA, enquanto que a hipertermia aumenta esta toxicidade e que alterações na dose e temperatura são interactivas, e podem influenciar significativamente as propriedades neurotóxicas da MDMA (Yuan et al., 2002).

Outros autores sugerem que, de facto, a MDMA aumenta os níveis extracelulares de serotonina e dopamina e tem grande afinidade pelos transportadores que recaptam a serotonina (Harris et al., 2002). A estes se acresce igualmente uma afinidade, em concentração na ordem dos micromolar,

pelos receptores de 5-HT-2, alfa-2 adrenérgicos, M-1 muscarínicos e H-1 receptores de histamina; adicionalmente aos efeitos sobre os neurotransmissores e receptores, a MDMA aumenta a corticotropina (ACTH), cortisol e prolactina em humanos (Harris et al., 2002).

A anfetamina é uma das aminas simpaticomiméticas com maior potência estimulante do SNC (para refs. ver Carvalho, 1998). Os efeitos variam de acordo com a dose, frequência e duração do consumo (para refs. ver Kalant, 2001), do estado mental e da personalidade do indivíduo (para refs. ver Carvalho, 1998). A dose não é preditiva das consequências, surgindo como explicações para este facto algumas formas de miopatia metabólica ou variabilidade individual no metabolismo; parece, no entanto, que a combinação da dose, com o contexto do seu consumo, associado aos comportamentos individuais, determinam as consequências (para refs. ver Gowing et al., 2002).

As anfetaminas são potentes anorexígenos e, por esse motivo, foram usadas clinicamente no tratamento da obesidade; os efeitos anorécticos são mediados pelos neurotransmissores dopaminérgicos, estando os mecanismos serotoninérgicos provavelmente envolvidos; no entanto, a tolerância a estes efeitos quase sempre se desenvolve (para refs. ver Murray, 1998).

No caso do tratamento da hiperactividade e do défice de atenção, de referir que o uso de medicamentos estimulantes quase que triplicou desde 1990 (para refs. ver Seeman e Madras, 1998). A utilização terapêutica da anfetamina em humanos deve-se à sua actuação bifásica (para refs. ver Seeman e Madras, 1998). Em pequenas doses (dose clínica varia entre 0,2 e 0,6 mg/Kg), porque provoca o aumento dos níveis basais de dopamina extracelular (6 x mais), diminui a libertação relativa de dopamina com os impulsos nervosos (2 x mais em relação ao nível basal), reduzindo assim a actividade locomotora e a distracção; para doses mais elevadas (acima de 1 ou 2 mg/Kg), a magnitude do aumento dos níveis basais varia entre as 14 a 35 x mais, e o nível pulsátil de dopamina aumenta 7 x mais, associando-se por tal a sintomas psicológicos, comportamentais e somáticos hiperdopaminérgicos (para refs. ver Seeman e Madras, 1998).

Como efeitos agudos desejáveis surgem o aumento da energia e resistência, a criação de estados de vigília, a diminuição da fadiga e do sono, a modificação do humor, o bem-estar, o aumento da iniciativa, autoconfiança, euforia, eloquência, a percepção sensorial aumentada, a maior sociabilidade e extroversão; estes efeitos fizeram com que em tempos se achasse que a anfetamina e outras drogas relacionadas, teriam um valor potencial como auxiliar na psicoterapia (para refs. ver Kalant, 2001, Gowing et al., 2002).

Como efeitos agudos indesejáveis, as anfetaminas provocam midríase, o relaxamento dos músculos lisos do tracto intestinal, a elevação da frequência cardíaca e o aumento da tensão arterial (para refs. ver Murray, 1998). Provocam também um aumento da actividade locomotora e actividade muscular, a qual, aliada à acção directa sobre o sistema de termorregulação provoca um aumento da temperatura corporal; rigidez e dores musculares são comuns nos dias seguintes ao consumo, assim como cefaleias, náuseas, perda de apetite e insónias; a frequência cardíaca e a pressão arterial mantêm-se elevadas ou apresentam grandes flutuações nos dias seguintes (para refs. ver Kalant, 2001; Gowing et al., 2002).

Os efeitos psicológicos incluem hiperactividade, falta de concentração, alucinações, despersonalização, ansiedade, agitação, comportamentos bizarros ou desprendidos que podem evoluir para ataques de pânico, delírios ou breves episódios psicóticos, défices de memória e alteração dos padrões do sono; nos dias seguintes continuam as dificuldades de concentração, surgem sentimentos depressivos, ansiedade e fadiga (Walters, 2002; para refs. ver Murray, 1998; Kalant, 2001; Gowing et al., 2002). Sintomas de abstinência envolvem disforia, anergia, estados de sonolência e fadiga prolongados (para refs. ver Murray, 1998). Este autor faz ainda referência a um estudo que revela a ocorrência de sintomas psicóticos após o consumo de d-anfetamina (euforia inicial, depressão, sintomas hipocondríacos, alucinações, delírios, ideias paranóicas e sintomas psiquiátricos excessivos).

A exposição do organismo a drogas de abuso pode também resultar na modulação das suas respostas imunitárias, quer por imunodepressão, quer por imunoestimulação; no entanto estudos indicam que os efeitos negativos sobre o sistema imunitário serão mais frequentes (para refs. ver Carvalho, 1998). A anfetamina tem um efeito estimulante sobre a secreção da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e, conseqüentemente, de corticoesterona, a qual interfere de forma inibitória com a resposta imune (para refs. ver Carvalho, 1998).

A MDMA partilha as características estimulantes da anfetamina, sendo classificada como uma anfetamina alucinogénia, mimetizando os efeitos dos estimulantes, aos quais se acrescentam sentimentos de bem-estar, de prazer, de euforia e desinibição no campo sexual (Cohen, 2001).

Os efeitos adversos deste composto incluem sudação, fadiga, espasmos musculares, taquicardia, depleção de fluidos e electrólitos, inadequada secreção da hormona anti-diurética e anemia aplástica, disfunções musculares e do SNC, hemorragias internas, danos hepáticos, falha renal, ataques cardíacos, golpe de calor fatal, convulsões e coma (Walubo e Seger, 1999; Cohen, 2001; Irvine et al., 2001; Traub et al., 2002; para refs. ver Schwartz e Miller, 1997). Como efeitos psicológicos e comportamentais são referidos a depressão, ansiedade, ataques de pânico, paranóia, despersonalização, mudanças de humor e também alucinações (Cohen, 2001).

Um estudo realizado recentemente (Harris et al., 2002) que se debruçou sobre os efeitos fisiológicos, subjectivos e hormonais da MDMA, mostrou que para uma dose de 1,5 mg/Kg existiram aumentos significativos na pressão diastólica e sistólica arterial; os níveis das hormonas cortisol, dehidroepiandrosterona (DHEA) e prolactina também aumentaram significativamente. Neste estudo também se verificaram efeitos subjectivos significativos mais consistentes com a acção de psicoestimulantes do que com alucinogénios.

Também é apresentado como efeito adverso raro, causado pela MDMA, a hiponatremia, atribuindo-se esta situação clínica à inapropriada secreção da

hormona anti-diurética pela acção deste composto; adicionalmente, o consumo excessivo de água contribui para o desenvolvimento de hiponatremia induzida (Sue et al., 2002; Traub et al., 2002). A indução de hiponatremia pela MDMA tem várias explicações; assim, existem evidências que sugerem que a libertação da hormona anti-diurética é mediada pela serotonina; outras explicações apontam para o excessivo consumo de água o qual é potenciado pela hipertermia induzida pela MDMA (Traub et al., 2002). Outros estudos alertam para o efeito dos metabolitos da MDMA, no aumento da libertação da hormona antidiurética arginina vasopressina, chamando a atenção, nomeadamente, para a 4-hidroxy-3-metoxymetanfetamina (HMMA), principal metabolito da MDMA, a qual apresenta o efeito mais potente (Forsling et al., 2002; Fallon et al., 2002).

2.6. TOXICIDADE DAS ANFETAMINAS E ANÁLOGOS

A dose tóxica da anfetamina é variável e as manifestações tóxicas podem aparecer para doses tão baixas como 2 mg mas são mais comuns para doses superiores a 15 mg; as reacções mais severas têm sido observadas para doses superiores a 30 mg e os casos fatais podem ocorrer para doses de 400 a 500 mg, embora pelo seu uso crónico, se possam tolerar doses mais elevadas (para refs. ver Carvalho, 1998).

Para a MDMA é referido que não existe linearidade entre a dose consumida e a concentração sanguínea; assim, pequenos aumentos na dose podem ocasionar desproporcionados aumentos nas concentrações, contribuindo assim para a sua toxicidade (para refs. ver Gowing et al., 2002). Os efeitos adversos podem igualmente ocorrer tanto em utilizadores crónicos como em utilizadores primários (para refs. ver Murray, 1998).

2.6.1. Mecanismos de Toxicidade Geral

As drogas de abuso actuam por diversos mecanismos, concorrendo para diferentes formas de toxicidade (toxicidade neurológica, cardiotoxicidade, toxicidade músculo-esquelética, toxicidade metabólica, etc.). Actualmente, um dos mecanismos de toxicidade mais estudados é o mecanismo oxidativo de toxicidade ou stress oxidativo, fenómeno mediado pela produção acrescida de radicais livres e outras espécies reactivas pró-oxidantes (Wolf et al., 2000; Carvalho et al., 2002; Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2003). Este mecanismo de toxicidade tem sido igualmente associado ao exercício físico (Poulsen et al., 1996; Bejma et al., 2000; Viña et al., 2000; Schippinger et al., 2002; Palazzetti et al., 2003; para refs. ver Packer, 1997; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Ascensão et al., 2003;).

Neste âmbito, parece ser consensual que os radicais livres participam em inúmeros processos biológicos; no entanto, ganham predominância ao nível da fisiopatologia de um leque variado de doenças, nomeadamente degenerativas, como a arterosclerose, a doença da artéria coronária, cancro e envelhecimento (Fabiani et al., 2001; Mezzetti et al., 2001; Lim et al., 2002; Jatuporn et al., 2003; Zhang et al., 2003; para refs. ver Ascensão et al., 2003).

Um radical livre é um átomo ou molécula portadoras de electrões desemparelhados numa das suas órbitas, situação que lhes confere instabilidade e reactividade bioquímica; para readquirirem a estabilidade química estes radicais cedem o electrão desemparelhado a uma molécula estável, formando um radical reduzido, ou aceitam um electrão a partir de uma molécula estável, convertendo-a em radical oxidado (para refs. ver Ascensão et al., 2003). Ainda segundo estes autores os diferentes radicais encontram-se associados habitualmente a 4 átomos (carbono, enxofre, azoto e oxigénio). Nos estudos já efectuados, tem sido dada uma primordial importância aos radicais livres associados ao oxigénio e às espécies reactivas de oxigénio (ERO), de onde se salienta o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (para refs. ver Cadet e Brannock, 1998; Mak e Newton, 2001; Ascensão et al., 2003).

O desequilíbrio entre os mecanismos de produção e neutralização das ERO, a favor das espécies reactivas, denomina-se Stress Oxidativo e resulta da incapacidade dos sistemas antioxidantes em combater a produção adicional de ERO (Fabiani et al., 2001; Lim et al., 2002; Jatuporn et al., 2003; Palazzetti et al., 2003; para refs. ver Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Mak e Newton, 2001;).

As ERO e outras espécies reactivas podem provocar modificações oxidativas em vários componentes celulares como lípidos (ataques sobre a membrana celular originando peroxidação lipídica), proteínas (oxidar proteínas tornando-as susceptíveis a ataques proteolíticos), ADN (originar perda de informação genética, favorecendo o processo de envelhecimento) e enzimas antioxidantes (afectar a função de enzimas como a CAT, SOD, GPx) (Bejma et al., 2000; Fabiani et al., 2001; Lim et al., 2002; Palazzetti et al., 2003; para refs. ver Cadet e Brannock, 1998).

O tecido muscular e o tecido nervoso são particularmente susceptíveis a este tipo de stress, pois ambos possuem células pós-mitóticas, as quais são capazes de acumular o dano oxidativo ao longo do tempo (Lim et al., 2002). Estes autores acrescentam que o tecido muscular, sendo o maior tecido corporal, é responsável pelo maior consumo de O_2 , pelo que está exposto ao grande fluxo de radicais livres de oxigénio (Lim et al., 2002).

As células, por sua vez, possuem enzimas antioxidantes que participam nos mecanismos de protecção tecidual ao stress oxidativo, sendo as principais a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx); para além destas enzimas, existem outras substâncias antioxidantes não enzimáticas, endógenas e exógenas tais como a Glutathione (GSH), as vitaminas C e E, o ubiquinol, o beta-caroteno, o ácido úrico e o ácido lipóico (Bejma et al., 2000; Viña et al., 2000; Palazzetti et al., 2003; Vaziri et al., 2003; para refs. ver Packer, 1997; Cadet e Brannock, 1998; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Mak e Newton, 2001; Ascensão et al., 2003).

Os grupos sulfidrilo não proteicos (GSNP), tais como a glutathiona e a cisteína, participam no sistema de defesas anti-oxidantes celulares, prevenindo ou minorando os efeitos adversos do stress oxidativo (causado por agentes oxidantes e xenobióticos) (Carvalho et al., 1993; Carvalho et al., 1997). Acrescentam, ainda, que qualquer depleção dos GSNP pode aumentar a susceptibilidade celular a agentes prejudiciais, como aos radicais livres, para os quais a glutathiona reduzida actua como desintoxicante, participando nomeadamente no metabolismo e na manutenção do estado redox de vários órgãos.

As enzimas anti-oxidantes actua da seguinte forma: a SOD promove a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ formando H_2O_2 e O_2 . A CAT catalisa a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 . A GPx catalisa a redução de H_2O_2 em água ou de hidroperóxidos em aldeídos, utilizando para tal a glutathiona reduzida (GSH) como dadora de electrões; esta enzima assume-se como um dos principais neutralizadores de hidroperóxidos provenientes das diferentes fontes celulares; devido ao facto da GSH ser oxidada pelo GPx e formar glutathiona oxidada (GSSG), as células deverão possuir uma via de regeneração de GSH; esta reacção é catalisada pela enzima Glutathiona reductase (GRed) a qual utiliza NADPH como cofactor e agente redutor, transformando a GSSG em GSH; a maior parte da síntese de novo GSH ocorre no fígado e, em situações de stress oxidativo adicional, este exporta quantidades superiores de GSH para o sangue, a partir do qual os restantes tecidos importam o GSH via ciclo gama-glutamil (para refs. ver Ascensão et al., 2003).

A glutathiona surge como uma substância antioxidante muito relevante e existem algumas evidências que aumentando o estado antioxidante celular (tratamento com N-acetilcisteína que aumenta o nível de GSH intracelular) se previne algum do dano induzido pelo exercício (para refs. ver Packer, 1997).

No que diz respeito à suplementação antioxidante (Vitaminas C e E, coenzima Q10) os resultados são menos claros (para refs. ver Packer, 1997) e pouco convincentes (para refs. ver Mak e Newton, 2001). Neste âmbito um estudo refere, no entanto, que a ingestão aumentada de antioxidantes (vitaminas C e

E) parece actuar de forma protectora, alterando a progressão da arterosclerose e doença coronária (Jatuporn et al., 2003), assim como a vitamina E parece ser eficaz na protecção do ADN do dano oxidativo (Fabiani et al., 2001). Outros autores defendem, igualmente, o papel protector destas duas vitaminas na prevenção da doença vascular arteroesclerótica, através de mecanismos que incluem a inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), inibição da interacção entre leucócitos e células endoteliais (adesão celular) e prevenção da disfunção vascular por acção do ascorbato e do α -tocoferol que actuam de forma anti-oxidante destruindo radicais livres (para refs. ver Carr et al., 2000). Outro estudo defende que o ácido ascórbico actua na atenuação da depleção dos níveis de 5-HT induzida pela MDMA, e também na supressão do stress oxidativo induzido por esta neurotoxina (Shankaran et al., 2001).

Entre as principais fontes de produção de ERO encontra-se a mitocôndria; embora a sua principal função seja a produção de energia existem evidências que apontam para a formação de ERO durante as reacções de fosforilação oxidativa; a cadeia transportadora de electrões mitocondrial parece ser responsável por produzir uma pequena mas significativa quantidade de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HO^{\cdot} (Bejma et al., 2000; Viña et al., 2000; Palazzetti et al., 2003; Vaziri et al., 2003; para refs. ver Packer, 1997; Cadet e Brannock, 1998; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Mak e Newton, 2001; Ascensão et al., 2003). Surgem ainda os mecanismos associados às enzimas Xantina Oxidase (XO), nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), aldeído oxidase, aminoácido oxidase, aos peroxissomas, ao citocromo P450 e aos neutrófilos polimorfonucleares (NPM) (Bejma et al., 2000; Viña et al., 2000; Palazzetti et al., 2003; Vaziri et al., 2003; para refs. ver Packer, 1997; Cadet e Brannock, 1998; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Mak e Newton, 2001; Ascensão et al., 2003).

Outros autores corroboram que os fagócitos (neutrófilos) são também uma importante fonte de oxidantes, já que estes utilizam na resposta inflamatória uma diversidade de espécies reactivas para destruir os patogénios invasores ($O_2^{\cdot-}$, ON^{\cdot} , H_2O_2 , HOCl), intervindo enzimas como a NADPH oxidase, a NO sintetase e a mieloperoxidase (Fabiani et al., 2001; para refs. ver

Leeuwenburgh e Heinecke, 2001). Num estudo particular constatou-se que a activação de monócitos (células fagocíticas) induziu dano no ADN de linfócitos pela acção dos radicais livres (Fabiani et al., 2001).

Recentemente descobriu-se que a mitocôndria também gera óxido nítrico (ON[•]), o qual tem implicações na produção de oxidantes durante o exercício, sendo que em quantidades moderadas o ON[•] pode reagir com radicais como o O₂⁻ para formar peroxinitrito (ONOO⁻), um poderoso oxidante (para refs. ver Cadet e Brannock, 1998; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001). Estes autores localizaram a Oxido Nítrico Sintetase (NOS) em mitocôndrias isoladas do coração, rim, cérebro e músculo-esquelético. Outro estudo defende a ligação entre a formação de ON[•] e alguma da neurotoxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA (Zheng e Laverty, 1998); assim esse estudo verificou que a administração de MDMA causou um aumento na actividade da NO sintetase e constatou que a inibição desta enzima bloqueou, em certa medida, a neurotoxicidade sobre a 5-HT induzida pela MDMA.

Tem sido verificado que o consumo de doses elevadas de anfetaminas resulta, frequentemente, numa marcada hipertermia no homem e em animais; esta parece ser uma condição pró-oxidante, já que ocorre um decréscimo nos níveis hepáticos de glutathiona reduzida (GSH) (Carvalho et al., 1993). Estudos experimentais, *in vivo*, permitiram testemunhar a depleção dos grupos sulfidrílo não proteicos, nomeadamente a nível hepático e renal, não se verificando, no entanto, o mesmo efeito no coração, pulmão e cérebro (Carvalho et al., 1996).

As catecolaminas endógenas parecem ter também um papel na depleção observada dos GSNP, induzidas pelas anfetaminas; de facto, tanto a adrenalina como a noradrenalina e outros agonistas adrenérgicos já revelaram capacidade para diminuir a glutathiona hepática em ratos, tendo este efeito sido contrabalançado por antagonistas adrenérgicos (Carvalho et al., 1993). Os resultados deste estudo mostraram que a administração aguda de d-anfetamina alterou a homeostasia dos GSNP, nomeadamente no fígado e rim, de forma dependente da dose (Carvalho et al., 1993).

As aminas biogénicas simpáticas (dopamina, adrenalina e noradrenalina), libertadas das terminações nervosas, podem contribuir para a toxicidade celular; de facto, através do metabolismo destas, mediado pela MAO, há síntese de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) como produto paralelo (Carvalho et al., 1999). Ainda, segundo estes autores, quando as enzimas que metabolizam as catecolaminas ficam saturadas, as catecolaminas oxidam-se de forma apreciável, convertendo-se em compostos altamente reactivos (semi-quinonas, quinonas e radicais livres), os quais provocam danos em componentes celulares como os lípidos, proteínas e ADN (ácido desoxirribonucleico). Outros autores defendem o papel da auto-oxidação das catecolaminas, como fonte alternativa de produção de ERO (para refs. ver Paker, 1997; Cadet e Brannock, 1998; Givertz e Colucci, 1998).

Outro estudo sugere que existe produção de radicais superóxido no striatum de ratinhos tratados com metanfetamina, a qual se deve provavelmente à libertação de dopamina no cérebro e subsequente oxidação desta nos terminais dopaminérgicos (para refs. ver Cadet e Brannock, 1998).

A estimulação α -adrenérgica, induzida pela acção da d-anfetamina, tem ainda efeitos sobre a respiração mitocondrial e sobre os níveis intracelulares de cálcio livre, levando à elevação destes factores (para refs. ver Carvalho, 1998). No 1º caso, com o aumento da respiração mitocondrial, pode ocorrer um incremento na produção do anião superóxido, o qual poderá originar peroxidação lipídica (Fawthrop et al., 1991); a manutenção de elevados níveis de cálcio livre intracelular pode, por sua vez, activar enzimas degradativas, como as fosfolípases, originando disfunções membranares e peroxidação lipídica (Jaeschke, 1990), ou como as proteases, levando à degradação proteica, podendo ser afectadas as proteínas responsáveis pela estrutura celular (Corcoran e Ray, 1992). No caso dos hepatócitos, o aumento do cálcio do núcleo activa as endonucleases dependentes do cálcio tendo como consequência a fragmentação do ADN (Shen et al., 1991, 1992); provoca ainda a conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, a qual participa na oxidação de grupos sulfidrilo, dos ácidos gordos e fosfolípidos, originando como produtos de reacção o peróxido de hidrogénio e o ião superóxido, os

quais representam um elevado nível de toxicidade para a célula (Jaeschke, 1990; Groot, 1992).

As catecolaminas são também responsáveis por induzirem peroxidação lipídica celular (Carvalho et al, 1997), a qual é potenciada pela acção da anfetamina sobre a monoamina oxidase (MAO) cuja inibição irá contribuir para a prevalência de um nível elevado de catecolaminas (para refs. ver Murray, 1998; Carvalho, 1998).

O metabolismo da d-anfetamina também pode perturbar a homeostasia da GSH; assim, é conhecido que o metabolismo oxidativo da d-anfetamina envolve a hidroxilação aromática, pelo sistema enzimático do citocromo P450 2D, dando origem à p-hidroxianfetamina (para refs. ver Cho et al., 1999); no entanto, um outro estudo demonstrou que o metabolismo da d – anfetamina não ocorre de forma tão linear, ao revelar que a alteração na homeostasia da glutathione pode ocorrer, igualmente, devido à conversão metabólica da d-anfetamina, pelo citocromo P450 2D, num intermediário reactivo (muito provavelmente um epóxido reactivo) que reage com a glutathione para formar o aducto (glutathione-S-yl)-p-hidroxianfetamina, originando assim a depleção de GSH (Carvalho et al., 1996).

Alguns estudos sugerem que o abuso de MDMA pode também originar stress oxidativo e dano potencial por acção de radicais livres, apresentando algumas explicações possíveis para este facto; assim, o abuso de MDMA potencia a hipertermia, a qual pode ser uma importante causa para o aparecimento de radicais livres como $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} entre outros; também podem ser produzidos radicais livres durante o metabolismo da MDMA (existem evidências que a MDMA é bio-transformada num intermediário reactivo capaz de se conjugar com a GSH e assim causar a sua depleção e produzir radicais); o abuso deste composto induz ainda a libertação aguda de serotonina e dopamina, sendo esta última desaminada pela MAO, o que resulta na produção de radicais livres e de ERO, os quais induzem peroxidação lipídica e outros tipos de stress oxidativo nas membranas celulares (Zhang et al., 2003; Zhou et al., 2003; para refs. ver Cadet e Brannock, 1998).

Outros autores corroboram que o metabolismo hepático da anfetamina e MDMA origina produtos secundários, alguns altamente reactivos com a glutathione, cuja diminuição permite uma série de alterações bioquímicas (influxo de cálcio massivo, alterações oxidativas nos lípidos das membranas celulares) que podem resultar em morte celular (para refs. ver Kalant, 2001).

Outra via pela qual o abuso de MDMA induz stress oxidativo é pela via alimentar, que fica diminuída pela acção anorexígena desta droga, a qual favorece uma diminuição do intake alimentar e conseqüentemente uma diminuição da quantidade de vitaminas C, E e beta-caroteno adquiridas pela dieta alimentar, as quais têm características anti-oxidantes (Carvalho et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Outros autores também defendem que o exercício físico, apesar dos reconhecidos benefícios (diminuição do risco de doença cardiovascular, de cancro, de osteoporose e diabetes) se constitui como uma agressão orgânica favorável à produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e ao incremento do stress oxidativo a nível celular, tecidual e orgânico devido ao aumento das exigências metabólicas, nomeadamente sobre o músculo cardíaco (Bejma et al., 2000; Viña et al., 2000; Palazzetti et al., 2003; para refs. ver Packer, 1997; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Ascensão et al., 2003).

O exercício físico causa, de facto, uma produção acrescida de ERO, observada em vários estudos, a qual origina maiores índices de oxidação lipídica (100% no músculo exercitado e fígado e 60% a 100% no cérebro), de oxidação proteica, de oxidação de ácidos nucleicos, embora neste caso surjam resultados controversos (para refs. ver Packer, 1997). Neste âmbito há autores que referem que a presença de ERO é vista como a principal causa de dano oxidativo de ADN manifestada pela excreção urinária de 8-hidroxi-guanina (Poulsen, 1996).

O exercício físico crónico é, todavia, capaz de provocar adaptações positivas, ao nível das defesas antioxidantes (Poulsen, 1996; Jatuporn et al., 2003; para

refs. ver Leeuweburgh e Heinecke, 2001). Assim, alguns estudos mostraram que o treino regular de resistência diminuiu os níveis basais de H_2O_2 produzidos pela mitocôndria isolada, pela elevação dos níveis de antioxidantes e enzimas antioxidantes tanto no músculo-esquelético como cardíaco (GPx, SOD e GSH) (para refs. ver Leeuweburgh e Heinecke, 2001) bem como pela elevação dos níveis plasmáticos de vitaminas C e E (Poulsen, 1996). De facto pensa-se que, possivelmente, os antioxidantes também têm um efeito positivo sobre a performance e a prevenção da fadiga, no entanto estudos em humanos têm sido pouco conclusivos (Viña et al., 2000). Ainda segundo estes autores, o exercício, quando não exaustivo, é claramente benéfico e os seus efeitos prejudiciais podem ser, em parte, prevenidos pelo treino. Estudos revelam que o exercício regular diminui a susceptibilidade ao dano oxidativo, provoca a indução de enzimas antioxidantes (Viña et al., 2000), aumenta os níveis de repouso de GSH, associando-se estes a uma diminuição dos marcadores de stress oxidativo induzido pelo exercício (Palazzetti et al., 2003); no entanto, um desequilíbrio entre carga de treino e recuperação, pode conduzir a um estado de sobre-treino, o qual pode envolver também a incapacidade dos sistemas antioxidantes se adaptarem ao treino, originando stress oxidativo crónico e dano celular (Palazzetti et al., 2003). Uma investigação registou um aumento da actividade da CK em repouso, bem como um aumento dos níveis de actividade de GPx plasmática, assim como uma diminuição no estado antioxidante total, durante o sobre-treino, o que parece confirmar a hipótese de ocorrência de stress oxidativo nesta situação específica (Palazzetti et al., 2003).

Para além do stress oxidativo estar envolvido no mecanismo de toxicidade pela MDMA e outras anfetaminas, surgem algumas evidências para o papel do stress bioenergético nesta mesma toxicidade (Darvesh et al., 2002). Neste estudo a administração de MDMA resultou num aumento da glicogenólise e no aumento da concentração de glicose extracelular. Pareceu também existir, segundo este estudo, uma associação entre a propensão para a MDMA provocar hipertermia e induzir glicogenólise, já que esta foi de facto aumentada pelo estado hipertérmico, e não foi alterada pela administração de fenfluramina, a qual não tem efeitos sobre a temperatura corporal. Outros estudos revelam

que a MDMA provoca uma inibição da função mitocôndrial com perda de ATP striatal e origina a depleção de glicogénio cerebral; esta depleção das reservas de energia pode resultar em desregulação iónica e dano proteolítico dos terminais de 5-HT (Darvesh et al., 2002).

Os efeitos neurotóxicos da anfetamina, relacionados com a produção de ERO, parecem também estar ligados ao aumento dos níveis extracelulares de glutamato (Wolf et al., 2000). O stress oxidativo e a produção de ERO podem ser induzidos pela anfetamina através do aumento do fluxo e do metabolismo oxidativo da dopamina, e pelo aumento do fluxo de glutamato (Wolf et al., 2000).

2.6.2. Mecanismos e Manifestações de Cardiotoxicidade

O consumo de anfetaminas pode conduzir ao aparecimento de efeitos cardiovasculares nefastos, responsáveis por cefaleias, calafrios, palidez ou ruborização, hipertensão ou hipotensão, palpitações e, em casos severos, arritmias, dor anginosa e colapso circulatório, podendo a morte ocorrer por insuficiência cardíaca aguda ou por acidente cerebrovascular (para refs. ver Carvalho, 1998). Outros autores acrescentam a este leque de consequências a hemorragia intra-cerebral, as cardiomiopatias, a hipertensão pulmonar, a formação e ruptura de aneurisma, a morte súbita e o enfarte do miocárdio (para refs. ver Frishman et al., 2002). A cocaína, o ecstasy e outras anfetaminas partilham os efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular, os quais se relacionam predominantemente com a activação do sistema nervoso simpático, com a consequente libertação de norepinefrina, dopamina e serotonina (Ghuran et al., 2001).

Microscopicamente verifica-se a ocorrência, no caso da cardiomiopatia, de edema intersticial, infiltração por leucócitos, degeneração das fibras musculares e necrose, anormalidades mitocôndriais que incluem grânulos mitocôndriais e perda de matriz; a formação de trombos parece ser o factor despoletador de enfarte do miocárdio, pela acção da anfetamina (para refs. ver

Frishman et al., 2003). Estes autores acrescentam que o abuso crónico de anfetamina tem sido também associado a vasculite necrosante, a qual se manifesta no estreitamento das artérias de pequeno e médio tamanho.

A anfetamina exerce os seus efeitos, sobre o sistema cardiovascular, de forma indirecta, pela sua acção sobre as catecolaminas (dopamina e noradrenalina) (Walubo e Seger, 1999; para refs. ver Kalant, 2001). Segundo estes autores, o efluxo das catecolaminas, nomeadamente noradrenalina, é responsável pelos mais graves efeitos adversos sobre este sistema; a vasoconstrição ou vasodilatação induzida pelo consumo de anfetaminas pode levar à hipertensão ou hipotensão, sendo que a hipertensão apresenta o risco subsequente de ruptura dos vasos sanguíneos e hemorragias internas, e a taquicardia o conseqüente aumento do trabalho cardíaco, e risco de falha cardíaca (Walubo e Seger, 1999; para refs. ver Kalant, 2001).

Os efeitos das anfetaminas sobre o sistema cardiovascular são também referidos por outra investigação que refere a ocorrência de 6 fatalidades relacionadas com aspectos da função cardíaca (para refs. ver Gowing et al., 2002). O relato de 12 casos de hemorragia ou AVC sugeriu que rápidas e inapropriadas alterações na pressão sanguínea ou no fluxo sanguíneo, associadas ao consumo de MDMA e outras anfetaminas, resultam em isquemia cerebral ou rupturas de vasos sanguíneos (para refs. ver Gowing et al., 2002). Um estudo efectuado no âmbito do consumo de ecstasy concluiu que os consumidores de MDMA, aparentemente saudáveis, exibiam sinais cardiovasculares de desregulação autonómica (disfunção parassimpática) (Brody et al., 1998). Uma outra pesquisa, realizada sobre os efeitos cardíacos de MDMA, revelou elevações na tensão arterial sistólica e diastólica, aumento na demanda de oxigénio pelo miocárdio, dependente da dose, sem aumento na sua contractilidade, sendo que esta combinação pode originar um maior risco de complicações cardiovasculares (Lester et al., 2000). Os resultados de um outro estudo apontam para elevações na frequência cardíaca, pressões diastólica e sistólica, amplitude e largura das ondas T (ECG) para doses de 10 a 20 mg/kg (Irvine et al., 2001).

Existem diferenças nas taxas de produção de ERO e susceptibilidade ao dano oxidativo entre vários órgãos e tecidos; assim tecidos pós-mitóticos como o miocárdio parecem ser mais vulneráveis aos agentes oxidantes do que tecidos com maior capacidade de proliferação (ex.: fígado) (Bejma et al., 2000).

Estudos *in vitro* e *in vivo* em animais, têm demonstrado que um excesso de produção de radicais livres, ou função antioxidante danificada, causam efeitos adversos em várias funções dos miócitos; diminuem a sua contractilidade, provocam lesões nos tecidos do miocárdio e apoptose (para refs. ver Mak e Newton, 2001). Segundo estes autores, os resultados das investigações em humanos têm sido, no entanto, pouco convincentes já que as medidas bioquímicas de stress oxidativo apresentam grandes limitações, não existindo um “gold standard” para a medição de ERO ou danos que lhe estão associados.

As fontes de ERO mais determinantes a nível cardíaco são a mitocôndria e os mecanismos associados à XO, contudo as catecolaminas, os peroxissomas e os neutrófilos polimorfonucleares (NPM) também se incluem (para refs. ver Ascensão et al., 2003). O elevado volume e densidade mitocondriais e o elevado fluxo mitocondrial de O_2 , são duas características que influenciam a produção de ERO no miocárdio (Bejma et al., 2000; para refs. ver Ascensão et al., 2002). De facto, mesmo em repouso, o consumo de O_2/g de tecido cardíaco é superior ao consumo de O_2/g de músculo-esquelético durante exercício intenso; durante o exercício físico, o fluxo sanguíneo coronário aumenta até 4X e a elevação da taxa metabólica oxidativa cardíaca decorrente do exercício físico constitui-se como factor predisponente para a produção acrescida de ERO (para refs. ver Ascensão et al., 2003). Alterações nas concentrações intracelulares de ATP, com aumento das concentrações de AMP e ADP, diminuição das reservas de glicogénio, modificações na temperatura e pH, perda da homeostasia do ião Ca^{2+} e respiração mitocondrial não acoplada podem ser estímulos para a formação adicional de ERO (para refs. ver Ascensão et al., 2003).

Um composto não enzimático determinante na actividade antioxidante tecidual geral e do miocárdio em particular é a GSH (Leichtweis e Ji, 2001; para refs. ver Ascensão et al., 2003). Dados providenciam evidências que a homeostasia da GSH tem um papel crítico na protecção do miocárdio dos agentes oxidantes (Leichtweis e Ji, 2001).

Como antioxidantes exógenos cardíacos temos a vitamina E que parece combater a peroxidação lipídica cardíaca (Venditti et al., 1999). Este estudo refere que o tratamento com vitamina E melhorou a recuperação funcional e reduziu a peroxidação lipídica, após um episódio de Isquemia-Reperusão (I-R), provavelmente pelo seu papel na estabilidade da estrutura da membrana, actuando tanto como antioxidante, como inibidor de fosfolipase. Outro estudo confirma a importância da vitamina E na redução do risco de ocorrência de eventos cardiovasculares, estando o mecanismo ainda em estudo; no entanto, sugere-se que os seus benefícios se devem à redução na adesão e agregação plaquetária, inibição de factores de coagulação dependentes de potássio e redução da susceptibilidade das LDL à oxidação (Mezzetti et al., 2001).

A Glutathione, como antioxidante multifuncional, tem um papel vital na protecção do miocárdio face aos oxidantes, sendo não apenas um intermediário dador de electrões para neutralizar H_2O_2 e lipoperóxidos mas também um destruidor de radicais livres de oxigénio e azoto (Leichtweis e Ji, 2001). Ainda, segundo estes autores, em situação de stress oxidativo a GSH é transportada do plasma para os cardiomiócitos, via o ciclo gama-glutamil, e os níveis circulatórios de GSH são mantidos por exportação hepática por estimulação de catecolaminas, glucagina e vasopressina. A depleção dos níveis de GSH no coração originaram, neste estudo, uma mais baixa contractilidade, pressão e trabalho no ventrículo esquerdo, ou seja, uma menor capacidade de recuperação das funções cardiovasculares após um episódio de I-R, em comparação com um coração normal sujeito ao mesmo episódio. O radical HO^\bullet foi indicado como o intermediário de ataque à Ca^{2+} -ATPase miocárdial, danificando assim a função contráctil cardíaca (Leichtweis e Ji, 2001).

2.6.3. Mecanismos e Manifestações de Toxicidade Muscular – Rabdomiólise

A rabdomiólise pode ocorrer em qualquer pessoa, sob circunstâncias particulares e pode ter consequências severas e até fatais; pode acontecer de forma recorrente e ser considerada endógena (por desordens enzimáticas que resultam na disfunção do metabolismo dos glícidos, lípidos, etc.), ou surgir como consequência de um episódio agudo isolado, apresentando uma origem exógena [ex: exercício físico, factores traumáticos, isquémicos, infecciosos, inflamatórios, metabólicos, toxinas (álcool, anfetaminas, heroína, metadona, cocaína, penicilina, LSD, esteróides), temperatura elevada, etc.] (Line e Rust, 1995; NG e Johnston, 2000; Criner et al., 2002; Rupert, 2002). De forma mais comum, a combinação do calor, do exercício físico e da desidratação precipitam a rabdomiólise (Criner et al, 2002).

Episódios únicos são comuns, causados por infecções (bacterianas e virais), drogas, toxinas e venenos, factores físicos como o síndrome compartimental, isquemia-reperfusão e traumas físicos directos; exercício severo ou inabitual, particularmente em situações de calor extremo, têm sido causas comuns; álcool, opiáceos e todas as drogas potencialmente miotóxicas podem induzir rabdomiólise, tal como drogas que induzem estados de agitação extrema (anfetamina e ecstasy) (Tan e Herzlich, 1995; Blanco et al., 2002; Çelik et al., 2002; Lane e Phillips, 2003; para refs. ver Criddle, 2003). A estas causas se acrescem deficiências enzimáticas, miopatias, distúrbios electrolíticos (Tan e Herzlich, 1995), desordens endocrinológicas e desordens genéticas e auto-imunes (para refs. ver Criddle, 2003).

A rabdomiólise foi relatada pela primeira vez por Hough em 1902, tendo sido já observada numa variedade de espécies incluindo humanos, cavalos, cães, ratos, etc. (Reuter et al., 1998). Outro autor refere casos de rabdomiólise que assomam na literatura germânica em 1911, onde surge descrita a tríade clássica de sintomas que a caracterizam: a dor muscular, a fraqueza muscular e a urina acastanhada (Rupert, 2002). Esta desordem ganhou evidência durante a II Guerra Mundial como resultado de lesões por esmagamento, altura

(1941) em que é identificada a primeira relação causa – efeito entre rabdomiólise e falha renal aguda (Rupert, 2002).

Até 1960 a rabdomiólise por exercício exaustivo era achada um fenómeno raro (Line e Rust, 1995). Estes autores referem que a atenção para este fenómeno aumentou em 1971, no contexto militar, com o aparecimento de 40 casos de militares hospitalizados com pigmentúria, dor muscular, edema e fraqueza muscular. Em 1988 foram relatados 50 casos de rabdomiólise relacionados com a actividade física vigorosa, nomeadamente em corredores de longa distância, halterofilistas, futebolistas, etc. (Line e Rust, 1995). O exercício físico é considerado, mais recentemente, causa comum da rabdomiólise (Lopez e Rojas, 1995).

A rabdomiólise caracteriza-se por ruptura das fibras do músculo-esquelético, com libertação de enzimas musculares (creatina fosfoquinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), transaminase glutâmica-oxaloacética (GOT), aldolase (ALD)), mioglobina, potássio, fósforo, cálcio e outros constituintes intracelulares para o espaço extracelular (Line e Rust, 1995; Tan e Hezlich, 1995; Blanco et al., 2002; Çelik et al., 2002; Criner et al., 2002; Rupert, 2002; para refs. ver Criddle, 2003). As evidências mais comuns de rabdomiólise consistem em mialgias, fraqueza muscular, dor, rigidez muscular, mioedemas, mioglobinúria e aumento plasmático das enzimas musculares (CK e GOT), de creatinina, de potássio e de difosfato de adenosina (ADP) (Lopez e Rojas, 1995; Kendrick et al., 1997; Reuter et al., 1998;). Manifestações gerais incluem mal-estar, febre, taquicardia, vômitos, náuseas, distúrbios nos electrólitos o que pode originar agitação, confusão, estados mentais alterados e baixa produção urinária (Rupert, 2002).

As causas da rabdomiólise são várias, mas todas têm em comum o aumento crítico do cálcio sarcoplasmático e dano intracelular pela activação das proteases e fosfolipases dependentes do cálcio (Tan e Herzlich, 1995; Blanco et al., 2002; Çelik et al., 2002; Lane e Phillips, 2003; para refs. ver Criddle, 2003).

Os mecanismos potencialmente envolvidos são a depleção de metabolitos essenciais, destabilização da membrana celular e depleção de ATP mitocondrial (para refs. ver Evans e Rees, 2002). A depleção de ATP, factor inicial que despoleta uma cascada de eventos, ocorre por contracção muscular sustentada ou por bloqueio dos patamares metabólicos necessários à sua produção, o que leva a graves alterações no equilíbrio dos electrólitos intracelulares (Backer e McCutchan, 2003). O primeiro distúrbio ocorre ao nível do cálcio, com elevação dos seus níveis intracelulares os quais actuam de forma tóxica activando proteases, fosfolipases e outras enzimas que danificam a membrana celular e a mitocôndria o que resulta em dano oxidativo por radicais livres e libertação de toxinas intracelulares para a circulação (Backer e McCutchan, 2003). Assim que a membrana celular perde funcionalidade ocorre um fluxo massivo de Na^+ para a célula o qual é acompanhado naturalmente pelo fluxo de água que origina edema intracelular; por esta razão, grandes quantidades de fluído intravascular pode deixar a circulação e ficar sequestrado no interior das células (para refs. ver Criddle, 2003). Esta mudança de fluído produz hipovolemia e instabilidade hemodinâmica; a dramática diminuição do volume plasmático leva a vasoconstrição e falência pré-renal (para refs. ver Criddle, 2003). Os iões Cl^- e Ca^{2+} também se movimentam para dentro das células causando hipocalcemia e deposição de cálcio no músculo-esquelético e tecidos renais; entre os conteúdos intracelulares que saem das células danificadas encontra-se o potássio, podendo ocorrer hiperkalemia fatal pela cardiotoxicidade e arritmias que se agravam pela existente hipocalcemia e hipovolemia (para refs. ver Criddle, 2003). O ião fosfato também deixa as células, originando hiperfosfatemia a qual potencia a hipocalcemia; os miócitos danificados também libertam ácido láctico e ácidos orgânicos o que produz acidose metabólica e acidúria; as purinas, libertadas pelas células que se desintegram, são metabolizadas para ácido úrico originando hiperuricemia; são também nefrotóxicas danificando os túbulos renais; a mioglobina, proteína muscular, libertada com a lise das células musculares origina mioglobinúria; finalmente a tromboplastina libertada pelas células endoteliais danificadas torna provável a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (para refs. ver Criddle, 2003).

A rabdomiólise resulta, assim, em hiperkalemia, hipernatremia, acidose láctica, hiperfosfatemia, hipocalcemia, hipovolemia e hiperuricémia. Coagulação intravascular disseminada, falha renal aguda e síndrome compartimental podem também ocorrer (Line e Rust, 1995; Reuter et al., 1998; para refs. ver Criddle, 2003). A libertação muscular de CK, creatinina, e ADP pode ainda originar a agregação plaquetária; a libertação de um activador de plasminogénio muscular, a hiperpirexia e as catecolaminas podem provocar a fibrinólise excessiva; hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia também surgem como consequências da rabdomiólise; o conjunto destes factores acaba por induzir um estado de coagulação intravascular disseminada (DIC) (Line e Rust, 1995; Kendrick et al, 1997). A paragem cardíaca também está descrita num estudo, embora a este facto se tenham associado outros como a desidratação, o consumo de um anti-inflamatório não-esteróide e exercício exaustivo (Ratliff et al., 2002).

A actividade física intensa, por si só, também causa severos danos musculares que incluem formação de edemas, perda da estrutura celular, infiltração de células inflamatórias, ruptura da membrana celular com consequente derrame dos conteúdos intracelulares para a corrente sanguínea e necrose (para refs, ver Kalant, 2001). O músculo passa por dois episódios de dano por rabdomiólise pelo exercício: o dano inicial é mecânico e pensa-se ser o resultado de uma maior força ser aplicada em menos fibras o que resulta em maior tensão sobre as pontes transversas de actina e miosina para além do limite de estiramento destas; este dano é seguido de lesão metabólica e bioquímica que atinge o pico entre o 1º e o 3º dias após o incidente; o principal mecanismo desta última lesão parece ser a formação de radicais livres de oxigénio (Reuter et al., 1998).

No caso da anfetamina, a rabdomiólise parece ser causada por exercício muscular vigoroso, hipermetabolismo celular, diminuição da perfusão muscular, coagulopatia, hipotensão e hipertermia (para refs. ver Carvalho, 1998). A super-imposição do exercício físico, a hipertermia e os efeitos hipercinéticos da anfetamina, a hipotensão e a relativa hipoxia tecidual podem predispor ao desenvolvimento da rabdomiólise (Kendrick et al., 1997).

A Rbdomiólise pode ser também despoletada por hipertermia. A Hipertermia Maligna (HM), uma reacção hipermetabólica potencialmente fatal, é uma desordem farmacogenética do músculo-esquelético (Hopkins e Ellis, 1991; McCoy et al., 1994; Elster et al., 2002; para refs. ver Jurkat-Rott, 2000; Kozack e MacIntyre, 2001; Louis et al., 2001; Melzer e Dietze, 2001; Nelson, 2001). Segundo estes autores, entre os factores que despoletam esta reacção hipermetabólica, que ocorre em indivíduos geneticamente predispostos para tal, encontram-se alguns anestésicos de inalação (halotano, isoflurano), relaxantes musculares despolarizantes (succinilcolina), ou situações de stress sob a forma de calor ou exercício físico. A HM é uma predisposição genética autossómica dominante, que causa uma disrupção da homeostasia celular do cálcio no músculo-esquelético, provocando uma reacção hipermetabólica; os níveis de cálcio intracelular aumentam substancialmente durante esta reacção, iniciando uma contracção muscular possivelmente irreversível e hipermetabolismo (Hopkins e Ellis, 1991; McCoy et al., 1994; para refs. ver Jurkat-Rott et al., 2000; Kozack e MacIntyre, 2001; Melzer e Dietze, 2001). De facto a viabilidade do músculo-esquelético depende de forma crítica dos processos de regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} (para refs. ver Louis et al., 2001).

Este fenómeno foi identificado em 1960 após investigações numa família australiana, na qual 10 elementos tinham morrido de forma inesperada, durante a anestesia cirúrgica, apresentando o síndrome hipermetabólico (Elster et al., 2002; para refs. ver Nelson, 2001), que se manifestava através de contracturas musculares e temperatura corporal elevada (para refs. ver Jurkat-Rott et al., 2000).

Após o diagnóstico desta doença em humanos, também este foi descrito em algumas espécies tais como o porco (valioso modelo animal para o estudo desta doença), gatos, cavalos e cães, que apresentavam um fenótipo comum de anormal sensibilidade contráctil do músculo-esquelético à cafeína, ao halotano, bem como semelhante etiologia (para refs. ver Jurkat-Rott et al., 2000; Nelson, 2001).

Quando o receptor da rianodina (RYR1-canal de libertação do cálcio), que se situa na tríade de junção do retículo sarcoplasmático (RS), é estimulado no músculo – esquelético, o cálcio é libertado do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma, causando contracção muscular; durante uma reacção de HM induzida por anestésicos, ou outros factores, excessivas quantidades de cálcio vão para o mioplasma, causando rigidez muscular, produção aumentada de calor e acidose; esta ruptura na homeostasia do cálcio pode resultar em necrose celular e rabdomiólise (para refs. ver Kozack e MacIntyre, 2001; Louis et al., 2001; Nelson, 2001). O processo de excitação-contracção é dependente da comunicação entre os canais RyR com os canais DHPR (receptor da dihidropiridina - responsável pelo início e pelo término da libertação de cálcio pelo receptor da rianodina) dos túbulos transversos e da despolarização de ambos, estando estes dois elementos envolvidos no processo de HM (para refs. ver Jurkat-Rott et al., 2000; Louis et al., 2001; Melzer e Dietze, 2001; Nelson, 2001). Assim, durante a despolarização do sarcolema, a alteração do potencial de membrana é sentida pelo receptor da dihidropiridina (DHPR), situado na base dos túbulos T, e o canal é activado; justapostos aos túbulos T estão as cisternas terminais do RS, locais de armazenamento de cálcio, de onde o cálcio é libertado para activar a contracção; na membrana das cisternas terminais do RS localizam-se os receptores de rianodina; a alteração de voltagem no receptor da dihidropiridina leva à abertura do canal RYR1, o que conduz à libertação de cálcio para o exterior do RS (para refs. ver Nelson, 2001).

A HM é provocada, pois, por uma aberração dos mecanismos de homeostasia corporal, levando a uma situação limite (para refs. ver Meis, 2001; Melzer e Dietze, 2001; Nelson, 2001). Evidências científicas sugerem que a HM é causada por uma elevação crónica mioplasmática de Ca^{2+} , produzida por mutações em proteínas que regulam o cálcio nas células musculares (fundamentalmente as que envolvem o canal de libertação de Ca^{2+} - RyR, DHPR) sendo ineficaz a acção da SERCA (sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) na remoção do Ca^{2+} do mioplasma para o retículo sarcoplasmático (RS) (para refs. ver Meis, 2001; Melzer e Dietze, 2001; Nelson, 2001).

Hipermetabolismo é o sinal mais comum, com elevação de consumo de O₂ e produção de CO₂ (5x) e aumento do nível de lactato no sangue (15x); hipertermia, hipoxia, taquicardia, cianose, rigidez muscular generalizada e arritmias cardíacas são indicações típicas de HM (Elster et al., 2002; para refs. ver Jurkat-Rott et al., 2000; Kozack e MacIntyre, 2001; Louis et al., 2001; Melzer e Dietze, 2001; Nelson, 2001). Acidose, hiperkalemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia podem ocorrer quando a integridade muscular se perde devido ao hipermetabolismo; contracção muscular sustentada e estado hipermetabólico que a acompanha pode resultar em rabdomiólise a qual por sua vez pode originar a síndrome compartimental, falha renal e coagulação intravascular disseminada (Elster et al., 2002; para refs. ver Jurkat-Rott et al., 2000; Kozack e MacIntyre, 2001). Se os pacientes não forem tratados em tempo útil, pode ocorrer morte por fibrilação ventricular, edema pulmonar, coagulopatia intravascular, dano por hipoxia cerebral, edema cerebral ou falha renal (para refs. ver Jurkat-Rott et al., 2000).

As substâncias que induzem um estado de excitação do SNC com hiperactividade central autonómica, também ocasionam uma resposta hipertérmica, e esta resposta é por vezes imprevisível e, em certos indivíduos, pode de facto reflectir uma miopatia metabólica com desregulação da homeostasia mioplasmática do ião cálcio (McCoy et al., 1994).

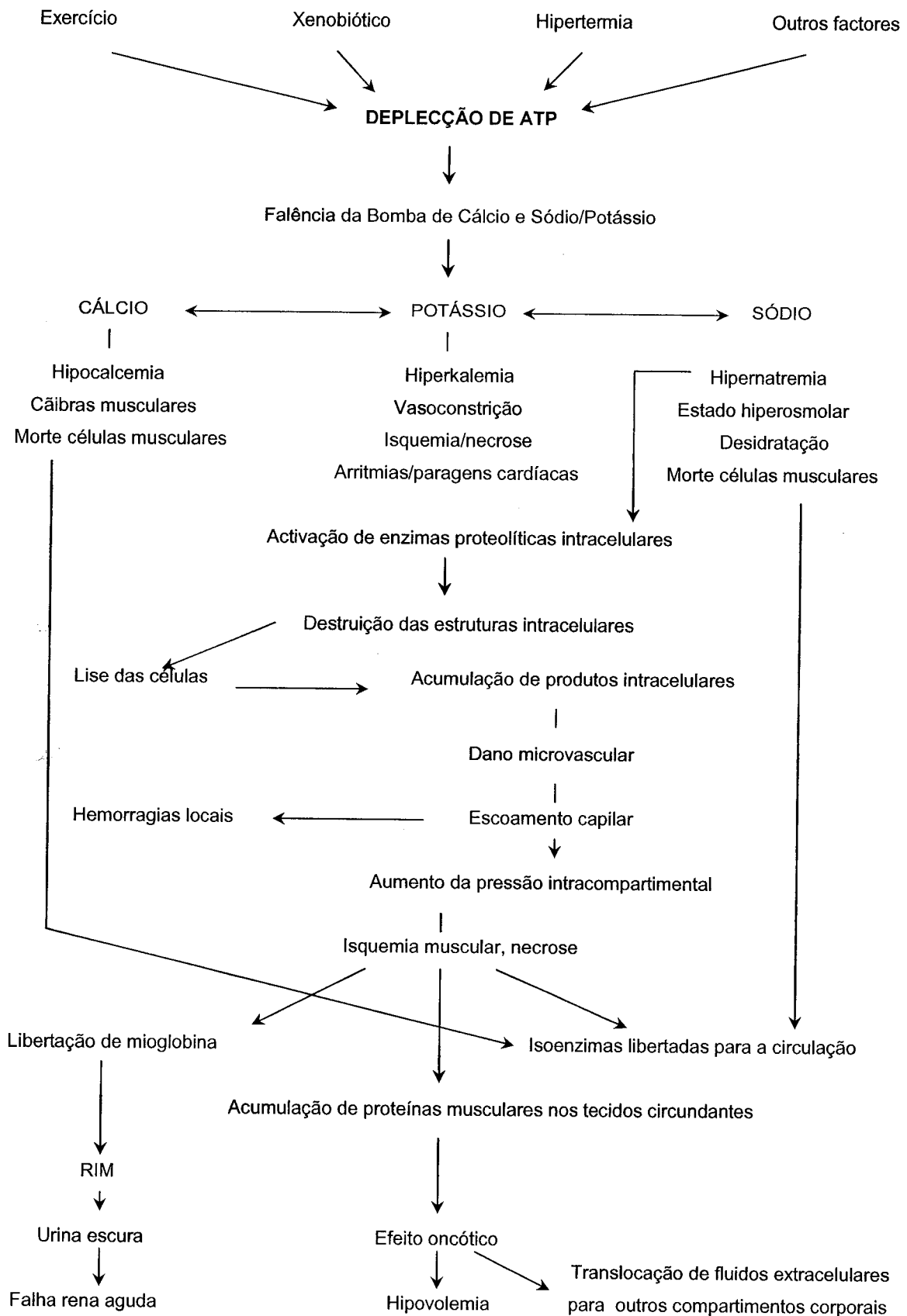


Figura 2 – Etapas da rabdomiólise (adaptado de Criner et al., 2002)

2.6.4. Mecanismos e Manifestações de Toxicidade Metabólica – Hipertermia

A elevação da temperatura corporal pode ser induzida pelo ambiente, pelo aumento da actividade metabólica ou por acção de toxinas, que actuam de forma directa ou indirecta (Martinez et al., 2002). A temperatura corporal normal é mantida através da regulação do centro hipotalâmico de controlo da temperatura, o qual é responsável pela activação de mecanismos nervosos e hormonais os quais regulam as taxas de produção e perda de calor; face à elevação da temperatura são despoletadas respostas neuro-endócrinas que induzem vasodilatação periférica e aumento do débito cardíaco, aumentando o fluxo sanguíneo à periferia e a perda de calor, e respostas comportamentais que incluem hidratação e procura de locais frescos (Martinez et al., 2002).

O consumo de anfetaminas resulta, frequentemente, em hipertermia no homem e nos animais de experiência (Carvalho et al., 1997). Esta hipertermia parece ser um importante factor de toxicidade oxidativa celular, manifestada pela depleção de GSH, aumento de GSSG, indução de peroxidação lipídica e a perda de viabilidade celular (Carvalho et al., 1997). A maior parte dos casos relatados de toxicidade induzida pela anfetamina relaciona-se com a hipertermia e é, de facto, provável que as complicações que se lhe seguem como a rabdomiólise, a coagulação intravascular disseminada (CID), síndrome de stress respiratório no adulto (SSRA) e insuficiência renal aguda se relacionem com o grau e duração da hipertermia (Bodenham e Mallick, 1996; Mechan et al., 2002). A hipertermia surge, frequentemente, como a primeira consequência do consumo de drogas psicoestimulantes (Bodenham e Mallik, 1996).

A hipertermia tem sido regularmente observada em sobredosagem de anfetamina e estudos referem que a maior parte das complicações que advêm da toxicidade da anfetamina, relacionam-se com a sua capacidade de produzir extremas elevações da temperatura corporal, sendo a sua histopatologia semelhante à do golpe de calor; em ambas as situações surgem hemorragias subendocardiais, necrose das vísceras, hemorragias petequiais disseminadas

e degeneração neuronal (Ginsberg et al., 1970). Em alguns casos, a mortalidade dos indivíduos intoxicados por anfetaminas está, de forma evidente, associada à hipertermia que atinge frequentemente temperaturas da ordem dos 43° C (para refs. ver Carvalho, 1998), sendo esta também responsável pelas complicações que se seguem, nomeadamente rabdomiólise, falha renal, acidose e SSRA (Walubo e Seger, 1999). De referir que, todavia, o efeito hipertérmico não está claramente associado à quantidade de anfetaminas ingerida (Carvalho et al., 1997). Nos casos mais severos, esta elevação da temperatura corporal provoca danos hepáticos (as altas temperaturas e os distúrbios metabólicos consequentes, podem provocar vários graus de danos hepáticos como efeitos secundários) e coagulopatia intravascular disseminada (o aumento da temperatura pode despoletar coagulação nos vasos sanguíneos menores, causando a obstrução dos mesmos em todo o corpo, ocasionando microenfartes) (para refs. ver Kalant, 2001).

A hipertermia, consequência clínica da intoxicação por MDMA, tem sido também apresentada como elemento chave na toxicidade deste composto (Miller e O`Callaghan, 1995). Numa pesquisa, a agressão concomitante pela MDMA e hipertermia provou ser sinérgicamente tóxica (Carvalho et al., 2001). A MDMA produz uma aguda e massiva libertação de 5-HT das terminações nervosas e tem sido assumido que a hipertermia induzida pela MDMA é uma consequência da libertação de 5-HT e da subsequente estimulação dos receptores de serotonina envolvidos na termorregulação (Mechan et al., 2002); no entanto, a dopamina também parece estar implicada no fenómeno da hipertermia; de facto a dopamina parece ter um papel fundamental neste âmbito, fundamentalmente ao nível da estimulação dos receptores D1 (Mechan et al., 2002).

Esta resposta termogénica parece resultar do aumento dos níveis cerebrais de serotonina, os quais estimulam as regiões de controlo termal no hipotálamo anterior/ área pré-óptica (Carvalho et al., 1997; Walubo et al., 1999; Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2002; Martinez et al., 2002; para refs. ver Kalant, 2001). Como consequência é estimulado o centro simpático, o qual aumenta a

descarga simpática; as catecolaminas são libertadas e estimulam os receptores alfa e beta adrenérgicos, os quais aumentam o metabolismo mitocondrial e a produção de calor; o aumento da actividade motora, acompanhado por um estado hipermetabólico do músculo-esquelético, também origina um aumento da temperatura corporal, especialmente quando a perda de calor, através da pele, está inibida pela vasoconstrição periférica induzida pelas catecolaminas; a lipólise, originada pela estimulação dos receptores β dos adipócitos, também contribui para este efeito; finalmente a actividade física sustentada, a temperatura ambiente elevada e a inadequada reposição de líquidos, podem potenciar o efeito directo da droga nos mecanismos termorregulatórios, causando uma maior elevação da temperatura corporal (Carvalho et al., 1997; Walubo e Seger, 1999; Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2002; Martinez et al., 2002; para refs. ver Kalant, 2001).

A indução de hipertermia pela MDMA é, pois, potenciada pelas temperaturas ambiente elevadas, pela desidratação e pelo exercício físico exaustivo (Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2002). De facto, outro estudo refere que a resposta termogénica à MDMA é muito sensível à temperatura ambiente, sendo a direcção e duração da resposta complexa e determinada parcialmente pela temperatura (Dafters e Lynch, 1998). Estes autores acrescentam que, geralmente, doses de MDMA elevadas e temperatura ambiente elevada produzem hipertermia, doses baixas e temperatura ambiente baixa produzem hipotermia.

Pela análise de estudos publicados sobre os efeitos da MDMA em humanos, identificaram-se 69 casos, envolvendo a hipertermia, dos quais 32 resultaram em morte (para refs. ver Gowing et al., 2002). Estes estudos referem que a hipertermia é acompanhada de convulsões, coagulação intravascular disseminada, rabdomiólise, danos renais e hepáticos que podem ser induzidos ou exacerbados pela hipertermia. A MDMA altera de forma evidente a termorregulação, o que resulta em hipertermia em ambientes quentes (Irvine et al., 2001).

Outros estudos confirmam o papel da hipertermia no mecanismo de toxicidade da MDMA, embora existam outros mecanismos envolvidos tais como o metabolismo da MDMA, o aumento do fluxo de neurotransmissores e a oxidação das aminas biogénicas (Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2002). Estes autores consideraram a hipertermia uma condição agressiva pró-oxidante e verificaram que a elevação da temperatura de 37° C para 41° C, por si só, causou stress oxidativo, reflectido na indução de peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Amostra

No presente estudo foi utilizada uma amostra constituída por 48 ratinhos adultos, machos, com 10 a 12 semanas de idade, com $35,82 \pm 1,85$ g de peso (balança digital Cobos Precision, C-300-SX, com aproximação às 0,01 g), da estirpe Charles River, provenientes dos Charles River Laboratories, España, S.A. Estes animais foram hospedados individualmente ou em pares, em gaiolas, devidamente acondicionados, com livre acesso a água e alimentação, sujeitos a ciclos habituais de luz e escuro (12 horas cada ciclo) e a uma temperatura ambiente constante ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), durante o período temporal que antecedeu o protocolo experimental; este período, de uma semana, foi utilizado para promover a adaptação tecidual e orgânica aos sensores de temperatura e para ambientação dos animais às condições laboratoriais.

3.2. Procedimentos Experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Conselho Científico da Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Quatro dias antes do protocolo experimental propriamente dito, cada ratinho, anestesiado com éter dietílico, foi sujeito à introdução, no tecido celular subcutâneo da região dorsal inter-escapular, de um sensor electrónico de temperatura (Pocket Scanner IPTT™ -200, da Biomedic Data Systems Inc.) que possibilitou a medição da temperatura subcutânea e a identificação numérica de cada ratinho.

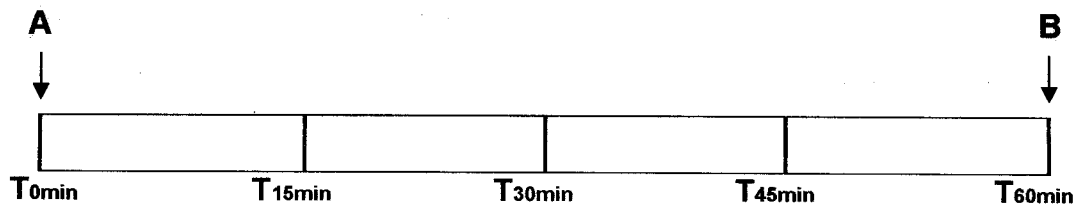
No início do protocolo experimental, os ratinhos da totalidade da amostra ($n=48$), foram distribuídos aleatoriamente por dois grandes grupos (G20 e G37) com o mesmo número de elementos (24 ratinhos cada), e foram expostos a duas condições térmicas ambientais distintas (20°C e 37°C), no meio aquoso.

Cada um destes grupos foi igualmente dividido em dois subgrupos de iguais dimensões (12 ratinhos cada), os quais foram sujeitos a duas situações particulares; um subgrupo foi colocado em situação de exercício físico (subgrupo Exercício), o outro subgrupo foi colocado em situação de repouso (subgrupo Repouso). Os ratinhos dos subgrupos Exercício foram colocados em situação de exercício físico, em meio líquido (os ratinhos tinham que se movimentar para evitarem a submersão); os ratinhos integrados nos subgrupos Repouso foram igualmente colocados em meio líquido, mas em situação de ausência de exercício físico (neste caso particular o nível da água apenas permitia a imersão dos ratinhos, pelo que não necessitavam de se movimentar para evitar a submersão). Finalmente cada um destes subgrupos sofreu uma última subdivisão, originando dois subgrupos de pequena dimensão (6 ratinhos cada) sujeitos a dois procedimentos distintos; a um deles foi administrado, intraperitonealmente, solvente (0,2 ml de soro fisiológico) (subgrupo controlo), ao outro foi administrado intraperitonealmente, sulfato de d-anfetamina dissolvida em soro fisiológico (0,2 ml, com a concentração de 20mg/kg de peso) (subgrupo anfetamina).

Estas diversas subdivisões permitiram a formação final de oito grupos distintos, com características próprias, de acordo com os procedimentos de que foram alvo, os quais se discriminam de seguida: Grupo 20°C, em repouso, controlo (G20RC), Grupo 20°C, em repouso, anfetamina (G20RAnf), Grupo 20°C, em exercício, controlo (G20ExC), Grupo 20°C, em exercício, anfetamina (G20ExAnf), Grupo 37°C, em repouso, controlo (G37RC), Grupo 37°C, em repouso, Anfetamina (G37RAnf), Grupo 37°C, em exercício, controlo (G37ExC), Grupo 37°C, em exercício, Anfetamina (G37ExAnf).

O protocolo experimental, para cada ratinho, teve a duração de 60 minutos e, ao longo destes, realizaram-se medições da temperatura corporal, aos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. Ao momento 0 (zero) minutos correspondeu a administração intra-peritoneal da respectiva substância, de acordo com o grupo em questão (soro fisiológico ou sulfato de d-anfetamina). No fim do protocolo experimental procedeu-se ao sacrifício dos ratinhos, por deslocamento cervical,

e após toracotomia a recolha de tecido muscular cardíaco para posterior análise bioquímica e morfológica (Figura 1).



A – injeção i.p. de soro fisiológico/ d-anfetamina

B – Sacrifício de cada ratinho e recolha de tecido muscular cardíaco

T – Medições da temperatura corporal

Figura 3 – Representação esquemática do protocolo experimental

3.3. Análise Bioquímica

Parte da parede do ventrículo esquerdo foi excisada e homogeneizada em solução tampão (pH 7.6) de tris (0,05 M)- L - serina (0,03 M)- borato (0,06 M), num homogeneizador de vidro com motor, à temperatura de 0-4°C e a baixa velocidade (440 rpm). As amostras homogeneizadas foram separadas para diferentes alíquotas e rapidamente congeladas à temperatura de - 80°C, para posterior análise bioquímica de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), como indicadores de stress oxidativo, de TBARS, como indicador de peroxidação lipídica, de grupos carbonilo, como indicador de oxidação proteica e de conteúdo total de proteínas, para relativização dos parâmetros anteriores. As alíquotas para a análise da glutathiona foram previamente extraídas num meio contendo ácido perclórico a 5% (w/v).

As medições de GSH e GSSG foram determinadas, da forma previamente descrita por Tietze (1969), segundo técnicas de espectrofotometria a 414 nm. A peroxidação lipídica foi determinada através da espectrofotometria, de acordo com o método descrito por Bertholf et al. (1987), e medida pela formação de TBARS. Para semi-quantificar os grupos carbonilo, um determinado volume do

homogeneizado cardíaco (V) contendo 20 μ g de proteína foi derivatizado com dinitro-fenil-hidrazina (DNPH). A amostra foi misturada com 1 V de 12% SDS mais 2 V de 20mM DNPH 10% TFA, e ficou a incubar 30 minutos no escuro. Após este passo, foram adicionados 1.5 V de 2M Tris/18,3% de beta-mercapto-etanol. Um controlo negativo foi preparado simultaneamente para cada amostra. Após terem sido diluídas as proteínas derivatizadas em TBS para uma concentração final de 0.001 μ g/ μ L, um volume de 100ml foi espalhado numa membrana de Hybond-PVDF. A imunodeteccção dos grupos carbonilo foi efectuada com o anti-DNP do coelho (DAKO) como primeiro anticorpo (diluição de 1:2000), e o IgG-IgG-peroxidase anti-coelho (Amersham Pharmacia) como o segundo anticorpo (diluição de 1:2000). As faixas foram visualizadas tratando os "immunoblotts" com os reagentes ECL de quimioluminiscência (Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido), de acordo com as instruções dos fabricantes, seguida pela exposição às películas de raio X (sigma, película de Kodak Biomax, St. Louis, EUA claros). As películas foram analisadas com o software QuantityOne (Rad bio). Os resultados da densidade óptica foram expressos em percentagem de variação relativa aos valores controlo. O conteúdo proteico foi determinado espectrofotometricamente, de acordo com Lowry et al., (1951), usando albumina de soro bovino como medida padrão.

3.4. Análise Morfológica

Parte da parede do ventrículo esquerdo foi preparada para observação à microscópica óptica e electrónica segundo as técnicas descritas por Azevedo (1979).

Após ser extraído, as peças foram seccionadas em cubos de 1 mm de aresta e fixadas durante 2 horas em gluteraldeído (2,5% de gluteraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio a 0,2 M, pH 7.2-7.4, a 4°C). Foram posteriormente lavadas em solução tampão, durante 1 hora, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% durante 2 horas e lavadas novamente em solução tampão durante 30 minutos. Em seguida, as amostras sofreram desidratação

progressiva, sob a acção de concentrações crescentes de álcool etílico durante 3 horas e impregnação com epon durante 2 horas. O óxido de propileno foi o composto utilizado na transição desidratação/impregnação. O corte das amostras foi realizado após a fase de inclusão que durou 2 dias. Todos os procedimentos foram realizados a uma temperatura de 4° C, com excepção da fase de inclusão, que foi executada em estufa a uma temperatura de 60°C. Foram realizados dois tipos de corte (1) os semi-finos, com uma espessura de 1 µm, destinados à observação em microscopia óptica e (2) os ultra finos, com uma espessura de 500Å, destinados à observação em microscopia electrónica. Os cortes ultra-finos foram contrastados com uma solução aquosa saturada de acetato de uranilo (durante 30 minutos) e com uma solução de citrato de chumbo (durante 15 minutos), tendo-se procedido a lavagens no início e no final de cada um destes procedimentos. Os cortes semi-finos foram colados por aquecimento (2 a 3 minutos) e corados com azul de toluidina até fumegar.

Para o estudo em microscopia de luz foi utilizado um fotomicroscópio óptico Zeiss, modelo Phomi III. Para o estudo em microscopia electrónica foi utilizado o microscópio electrónico Zeiss EM 10A, a 60 Kvolts. O estudo em microscopia de luz e em microscopia electrónica permitiu apenas a análise qualitativa dos tecidos.

3.5. Análise Estatística

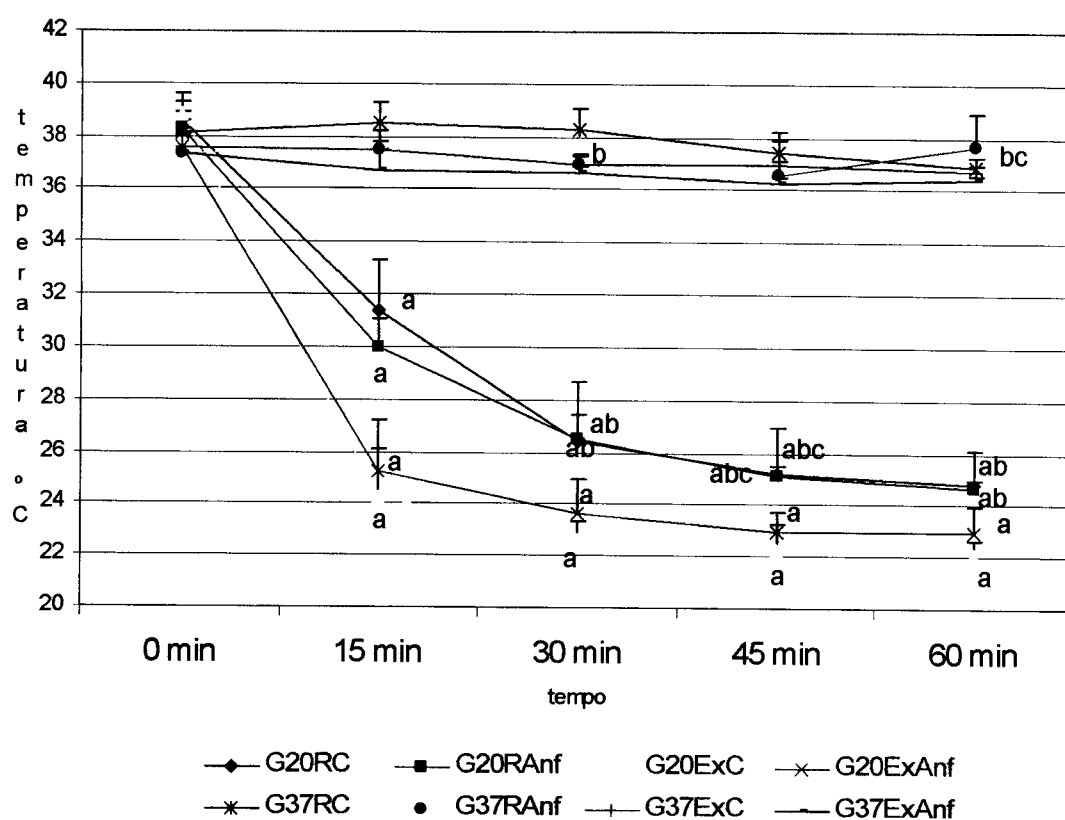
Os dados foram tratados estatisticamente pela média e desvio padrão. As diferenças de médias foram testadas a partir da ANOVA de Medições Repetidas e da one-way ANOVA com a comparação post hoc de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em 5% (alfa igual a 0,05). Foi utilizado o programa informático Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, versão 11.0 para o Windows) em toda a análise estatística.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Alterações Metabólicas – Temperatura Subcutânea

Apresentam-se na figura 4 os valores médios e respectivos desvios-padrão das temperaturas subcutâneas, registadas pelos diversos subgrupos, ao longo do protocolo experimental e assinalam-se, no âmbito da análise comparativa realizada longitudinalmente, as diferenças com significado estatístico que resultaram da comparação intra-subgrupos.



a - $p < 0,05$ vs. 0 min; b - $p < 0,05$ vs. 15 min ; c - $p < 0,05$ vs. 30 min

Figura 4 – Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios-padrão da temperatura subcutânea, registada pelos diferentes subgrupos, ao longo do protocolo experimental, nos vários momentos de avaliação.

Pela observação desta figura, verifica-se que os subgrupos G20RC, G20RAnf, G20ExC e G20ExAnf apresentaram uma diminuição gradual das temperaturas médias ao longo do tempo, sendo a taxa de diminuição mais acentuada nos primeiros 15 minutos do protocolo experimental. A diminuição da temperatura persistiu ao longo do tempo, atingindo os valores mais baixos no final do

referido protocolo, com excepção para o subgrupo G20ExAnf que registou a menor temperatura no penúltimo momento do protocolo experimental. De salientar que os subgrupos G20ExC e G20ExAnf foram os que apresentaram uma diminuição da temperatura corporal mais marcada.

No seio do G20RC e do G20RAnf, as várias leituras da temperatura subcutânea, efectuadas ao longo do tempo, foram, na quase generalidade, significativamente diferentes entre si. De forma mais particular constata-se que as temperaturas subcutâneas médias apresentadas por estes subgrupos aos 15, 30, 45 e 60 minutos foram significativamente inferiores à temperatura apresentada no momento inicial do protocolo experimental; as temperaturas apresentadas aos 30, 45 e 60 minutos foram significativamente menores que a temperatura apresentada aos 15 minutos do protocolo; finalmente também se verifica que a temperatura exibida aos 45 minutos do protocolo experimental foi significativamente mais baixa daquela que surge aos 30 minutos.

No que concerne aos subgrupos G20ExC e G20ExAnf, no seio destes, os valores médios da temperatura subcutânea, apresentados aos 15, 30, 45 e 60 minutos, foram significativamente menores dos valores da temperatura apresentada no momento inicial do protocolo experimental, mas não divergiram mais, de forma significativa, entre si.

No que diz respeito aos subgrupos G37RC, G37RAnf, G37ExC e G37ExAnf, não se registaram grandes oscilações da temperatura subcutânea ao longo do tempo, havendo a registar uma ligeira tendência para a descida da temperatura ao longo do protocolo experimental, na generalidade dos subgrupos referidos.

Pela observação da figura 4 reconhece-se que apenas surgem diferenças com significado estatístico no seio dos subgrupos G37RC e G37ExC. Assim constata-se que, no que diz respeito ao G37RC, a temperatura média exibida aos 60 minutos do protocolo experimental foi significativamente menor que a temperatura média apresentada aos 15 e 30 minutos do referido protocolo. No que concerne ao grupo G37ExC apenas surgiram diferenças com significado estatístico entre a temperatura média subcutânea apresentada aos 30 minutos

e a apresentada ao 15 minutos do referido protocolo, tendo sido esta última significativamente superior.

Apresentam-se no quadro 1, os valores médios e desvios-padrão da temperatura subcutânea, apresentados pelos diferentes subgrupos do G20 e G37 e salientam-se, particularmente, entre estes diversos subgrupos, para cada leitura da variável dependente (temperatura), as diferenças estatisticamente relevantes.

Quadro 1 – Resultados médios (x) e respectivos desvios-padrão (sd) das temperaturas médias subcutâneas exibidas pelos diferentes subgrupos, para cada momento de avaliação.

	0 min x ± sd	15 min x ± sd	30 min x ± sd	45 min x ± sd	60 min x ± sd
G20RC	38,60±0,68	31,35±1,98 ^c	26,43±2,22 ^c	25,17±1,83 ^c	24,77±1,36 ^c
G20RAnf	38,28±0,31	29,98±1,07 ^d	26,51±0,96 ^d	25,15±0,36 ^d	24,61±0,31 ^d
G20ExC	38,82±0,76	24,26±1,83 ^{abe}	22,60±0,70 ^{abe}	22,26±1,00 ^{abe}	22,10±0,55 ^{abe}
G20ExAnf	37,58±0,70	25,30±1,90 ^{abf}	23,67±1,28 ^{abf}	22,93±0,76 ^{abf}	22,97±0,95 ^{abf}
G37RC	38,13±0,77	38,52±0,76	38,25±0,78	37,43±0,81	36,90±0,39
G37RAnf	37,33±0,81	37,50±0,72	36,97±0,36	36,57±1,30	37,63±1,24
G37ExC	37,60±0,46	37,52±0,33	37,00±0,28	37,00±0,11	36,73±0,23
G37ExAnf	37,38±0,71	36,74±0,79	36,62±0,29	36,26±0,24	36,40±0,21

^a p < 0,05 vs. G20RC; ^b p < 0,05 vs. G20RAnf; ^c p < 0,05 vs. G37RC; ^d p < 0,05 vs. G37RAnf; ^e p < 0,05 vs. G37ExC; ^f p < 0,05 vs. G37ExAnf

No seio do grupo G20, salienta-se a existência de diferenças, com significado estatístico, entre o subgrupo G20ExC e os subgrupos G20RC e G20RAnf e entre o subgrupo G20ExAnf e os subgrupos G20RC e G20RAnf, aos 15, 30, 45 e 60 minutos do protocolo.

Pela observação deste quadro confirma-se a inexistência de diferenças com significado estatístico entre os diversos subgrupos que constituem o G37.

Para a comparação efectuada entre os diversos subgrupos que constituem os grupos G20 e G37 constata-se que aos 15, 30, 45 e 60 minutos do protocolo experimental, os valores médios da temperatura subcutânea apresentados

pelos subgrupos G20RC, G20RAnf, G20ExC, G20ExAnf, foram significativamente inferiores aos valores médios apresentados pelos subgrupos G37RC, G37RAnf, G37ExC e G37ExAnf, para as comparações efectuadas.

4.2. Alterações Bioquímicas

Estão expostos no quadro 2 os resultados médios, respectivos desvios-padrão e salientadas as diferenças encontradas, com significado estatístico, para a comparação múltipla de médias realizada no seio dos diversos subgrupos que constituem o G20 e o G37 (intra-grupo) para os indicadores bioquímicos de stress oxidativo (GSSG, GSH e GSSG/GSH).

Quadro 2 – Resultados médios (x) e respectivos desvios-padrão (sd) dos indicadores bioquímicos de stress oxidativo, avaliados nos diferentes subgrupos, no final do protocolo experimental.

	Glutaciona Oxidada (GSSG) x ± sd	Glutaciona Reduzida (GSH) x ± sd	GSSG/GSH (%) X ± sd
G20RC	1,24±0,36	4,14±1,73	36±24
G20RAnf	1,25±0,16	4,37±1,35	32±15
G20ExC	2,02±0,94	5,42±1,87	44±28
G20ExAnf	2,00±0,62	5,92±1,03	36±18
G37RC	0,98±0,31	7,35±2,12 ^a	14±5
G37RAnf	1,20±0,38	7,00±0,96 ^a	17±5
G37ExC	1,28±0,77	15,70±8,00	8±3
G37ExAnf	1,80±1,30	17,45±11,29	10±3

^a p < 0,05 vs. G37ExAnf

Como se pode constatar pelos resultados obtidos, os valores da glutaciona oxidada, apresentados pelos diferentes subgrupos, foram algo diversos, tendo variado entre os 0,98 nmol/mg de proteínas, atribuídos ao G37RC, e os 2,02 nmol/mg de proteínas apresentado pelo G20ExC; no entanto, como se pode verificar pela leitura do quadro, não se registam diferenças com significado estatístico entre os resultados obtidos no seio de cada grupo (G20 e G37).

No que diz respeito à glutathiona reduzida, os resultados apresentados pelos subgrupos em estudo sofreram alterações assinaláveis; assim constata-se que os diversos subgrupos do G20 registaram os menores valores, e os diferentes subgrupos do G37, os valores mais elevados, sendo que estes valores dispararam de forma marcada nos subgrupos G37ExC e G37ExAnf. No que diz respeito às comparações efectuadas intra-grupo, verifica-se que no seio do grupo G20 não se registaram diferenças com significado estatístico entre os diversos subgrupos analisados. Já no que se refere ao G37, constata-se que o G37ExAnf apresentou resultados médios significativamente superiores aos subgrupos G37RC e G37RAnf.

No que se refere à relação entre GSSG e GSH constata-se, pelos valores registados no quadro 2, que os valores relativos deste indicador de stress oxidativo sofreram algumas modificações; assim atesta-se que os diferentes subgrupos do G20 apresentaram os maiores valores relativos deste indicador, tendo o maior valor sido registado pelo G20ExC e o menor pelo G20RAnf; já no que diz respeito aos diversos subgrupos do G37, estes apresentaram os menores valores de GSSG/GSH, tendo o menor valor sido registado pelo G37ExC e o valor mais elevado registado pelo G37RAnf; no entanto as diferenças ocorridas no seio de cada grupo particular não surgem como estatisticamente significativas.

Na figura 5 expressam-se graficamente os valores médios e respectivos desvios-padrão da relação GSSG/GSH e realçam-se as diferenças estatisticamente significativas que resultam das comparações efectuadas inter-subgrupos.

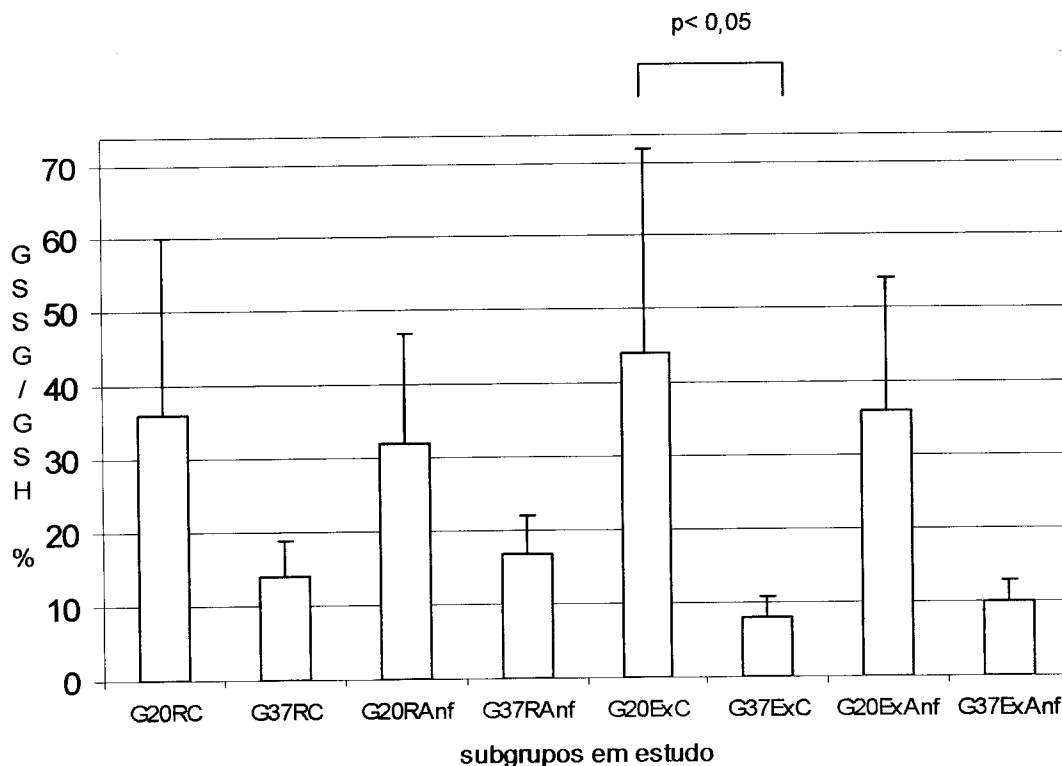


Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios-padrão, do indicador bioquímico GSSG/GSH, avaliado nos diferentes subgrupos em estudo, no final do protocolo experimental.

Pela observação desta figura confirmam-se diferenças com significado estatístico entre os subgrupos G20ExC e G37ExC. No seio destes subgrupos a percentagem relativa de GSSG desceu de 44% (G20ExC) para 8% (G37ExC). As restantes diferenças encontradas, nas comparações efectuadas entre os grupos em estudo, não revelaram significado estatístico, no entanto constata-se que os valores percentuais de GSSG foram sucessivamente superiores nos diversos subgrupos do G20 em comparação com os diversos subgrupos do G37.

No quadro 3 apresentam-se os resultados médios e respectivos desvios-padrão, e realçam-se as diferenças intra-grupo e inter-subgrupos, com significado estatístico, para os marcadores de lesão tecidual por peroxidação lipídica (TBARS) e por oxidação proteica (grupos carbonilo).

Quadro 3 – Resultados médios (\bar{x}) e respectivos desvios-padrão (sd) dos indicadores bioquímicos de peroxidação lipídica (TBARS) e de oxidação proteica (grupos carbonilo), avaliados nos diferentes subgrupos, no final do protocolo experimental.

	TBARS $\bar{x} \pm \text{sd}$	Grupos Carbonilo (%) $\bar{x} \pm \text{sd}$
G20RC	152,4 \pm 31,9	113 \pm 9 ^a
G20RAnf	131,0 \pm 27,0	131 \pm 12 ^c
G20ExC	140,8 \pm 52,5	139 \pm 5
G20ExAnf	172,4 \pm 64,3	131 \pm 4
G37RC	170,9 \pm 80,1	100 \pm 9
G37RAnf	186,0 \pm 81,7	106 \pm 9
G37ExC	154,8 \pm 37,2	121 \pm 11 ^b
G37ExAnf	146,7 \pm 55,6	115 \pm 11

^a $p < 0,05$ vs. G20ExC; ^b $p < 0,05$ vs. G37RC; ^c $p < 0,05$ vs. G37RAnf

No que concerne ao comportamento exibido pelos diferentes grupos no âmbito do indicador bioquímico de peroxidação lipídica, TBARS, constata-se que os valores foram algo discrepantes, sem revelarem nenhuma tendência particular e sem registarem diferenças estatisticamente significativas nas comparações realizadas entre médias, para os diferentes grupos em estudo (G20 e G37).

Quanto aos valores relativos dos grupos carbonilo, pela observação do quadro 3 e da figura 6, verifica-se que no grupo G20 eles são superiores aos valores relativos que surgem no seio do G37. Por outro lado confirma-se a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados médios, para as comparações realizadas intra-grupo, para este indicador bioquímico de lesão tecidual por oxidação proteica. De referir que os resultados expostos no quadro 3 para este indicador, estão relativizados ao valor apresentado pelo G37RC, tido como valor referência. Constata-se assim que o subgrupo G20RC registou resultados médios significativamente inferiores ao subgrupo G20ExC e que o subgrupo G37ExC apresentou valores médios superiores ao subgrupo G37RC, com significado estatístico. Para as comparações efectuadas inter-subgrupos constata-se a ocorrência de diferenças com significado estatístico entre os subgrupos G20RAnf e G37RAnf, sendo que o subgrupo G20RAnf apresentou valores médios significativamente superiores ao subgrupo

G37RAnf. Todas as restantes comparações realizadas inter-subgrupos não surgem como relevantes.

Na figura 6 estão representados graficamente os valores médios e respectivos desvios-padrão dos grupos carbonilo, avaliados nos diferentes subgrupos em estudo.

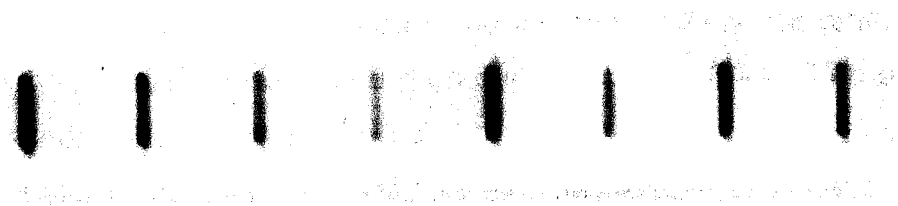
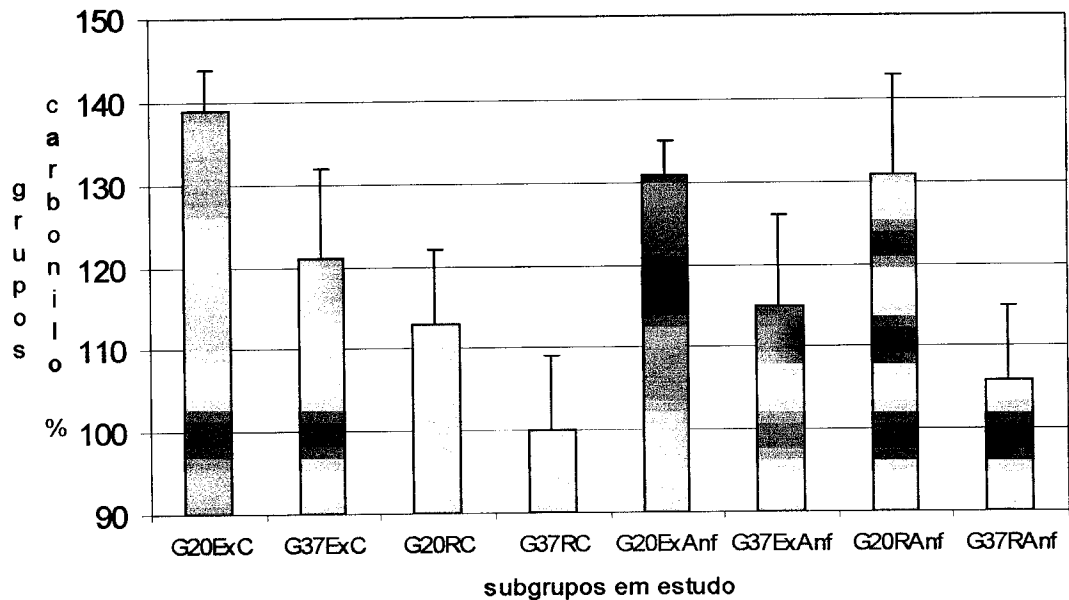


Figura 6 – Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios-padrão, das concentrações cardíacas de grupos carbonilo em função da temperatura ambiente, da realização de exercício físico e da administração de d-anfetamina com base nas marcações de anti-dinitro-fenil-hidrazina (anti-DNPH) para cada grupo.

4.3. Alterações Morfológicas

A análise morfológica dos animais controlo, expostos a diferentes temperaturas (G20RC e G37RC) revelou, à microscopia óptica, uma estrutura normal sem qualquer alteração morfológica a registar. À microscopia electrónica (figura 7), a estrutura apresentava-se preservada nos dois subgrupos em estudo, existindo apenas nos animais do G20RC um ligeiro “swelling” mitocondrial em alguns cardiomiócitos, apresentando os restantes uma estrutura mitocondrial normal.

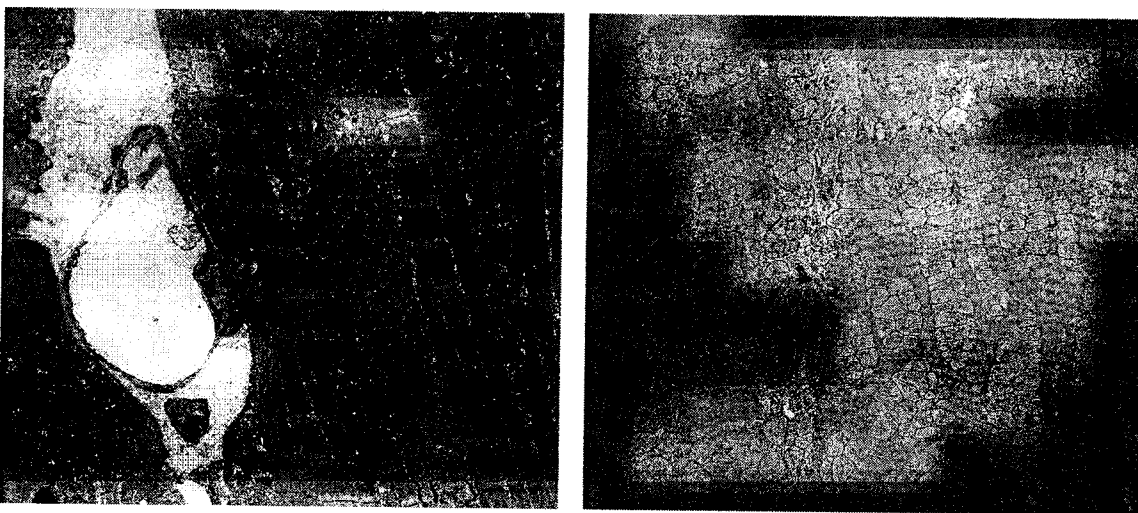


Figura 7 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20RC (A) e de um animal do grupo G37RC (B). A ultra-estrutura dos cardiomiócitos encontra-se preservada, sendo visíveis em A alguns sinais sugestivos de dilatação do retículo sarcoplasmático e um ligeiro “swelling” mitocondrial (ampliação original de A e de B - 3.150x).

Os subgrupos exercitados apresentavam, à microscopia óptica, uma estrutura normal havendo, no entanto, a salientar no G20ExC uma ligeira vacuolização citoplasmática que, à microscopia electrónica (figura 8), parece corresponder a uma ligeira dilatação do retículo sarcoplasmático assim como a algum (ligeiro) “swelling” mitocondrial. Nem todas as células foram atingidas por esta alteração. Comparativamente aos grupos anteriores, este G20ExC foi o que apresentou maiores alterações estruturais em termos mitocondriais e de retículo sarcoplasmático. Nos subgrupos exercitados a 37°C não foram encontradas alterações estruturais.

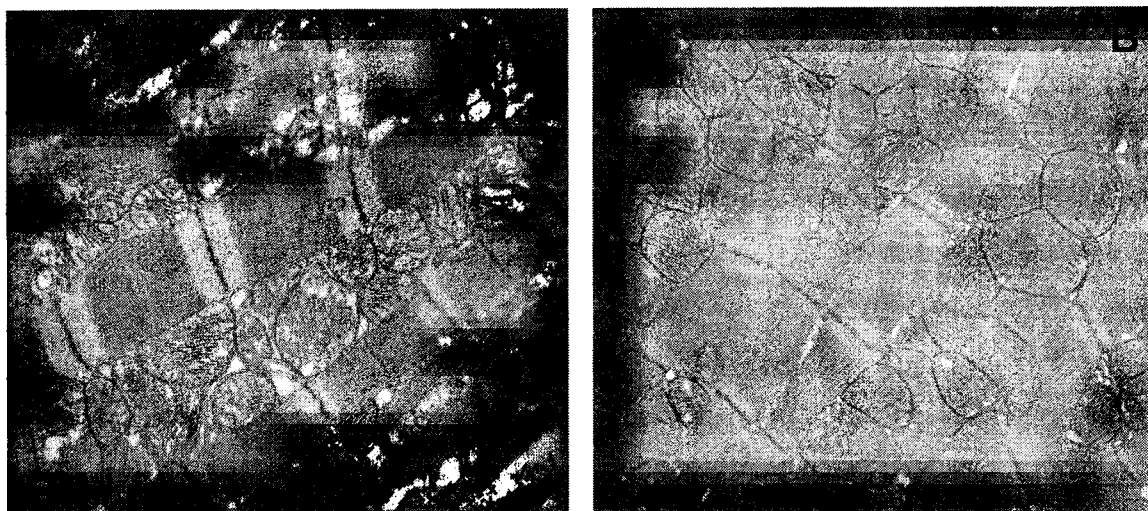


Figura 8 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20ExC (A) e de um animal do grupo G37ExC (B). Na fotografia A são observados evidentes sinais de dilatação do retículo sarcoplasmático e de “swelling” mitocondrial que contrastam com a normalidade estrutural observada em B (ampliação original de A e de B -12.500x).

Nos subgrupos tratados com d-anfetamina, à microscopia óptica, a vacuolização sarcoplasmática foi bastante acentuada em alguns cardiomiócitos, não afectando, contudo, a totalidade das células observadas. À microscopia electrónica (figuras 9 e 10) esta vacuolização traduz um evidente “swelling” mitocondrial com dilatação do retículo sarcoplasmático e alguns sinais sugestivos de edema intracelular. Estes animais foram os que apresentaram maiores alterações estruturais face aos anteriores, e os animais tratados a 20°C (G20RAnf) foram os mais afectados.

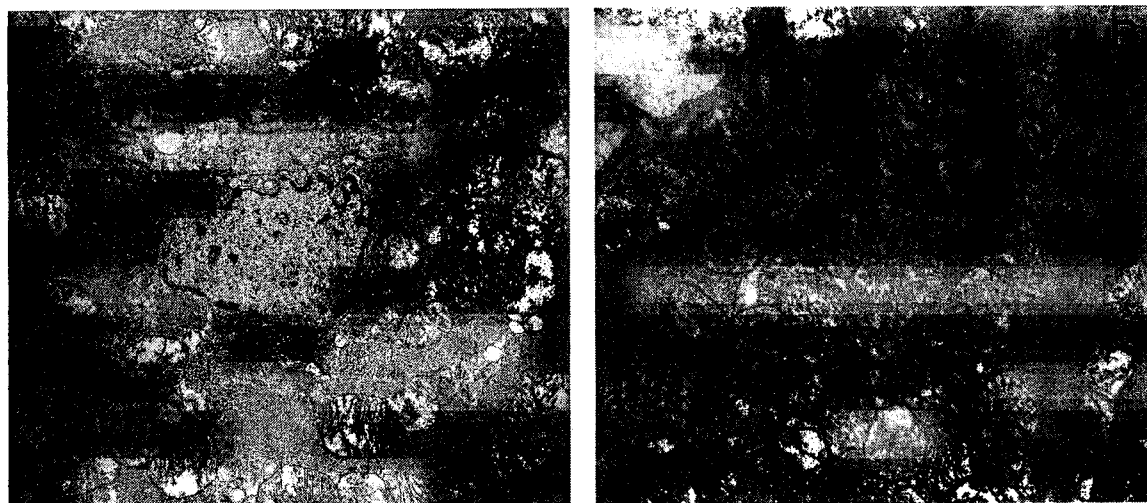


Figura 9 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20RAnf (A) e de um animal do grupo G37RAnf (B), onde são observados sinais de intenso “swelling” mitocondrial (ampliação original de A – 10.000x e de B -12.500x).

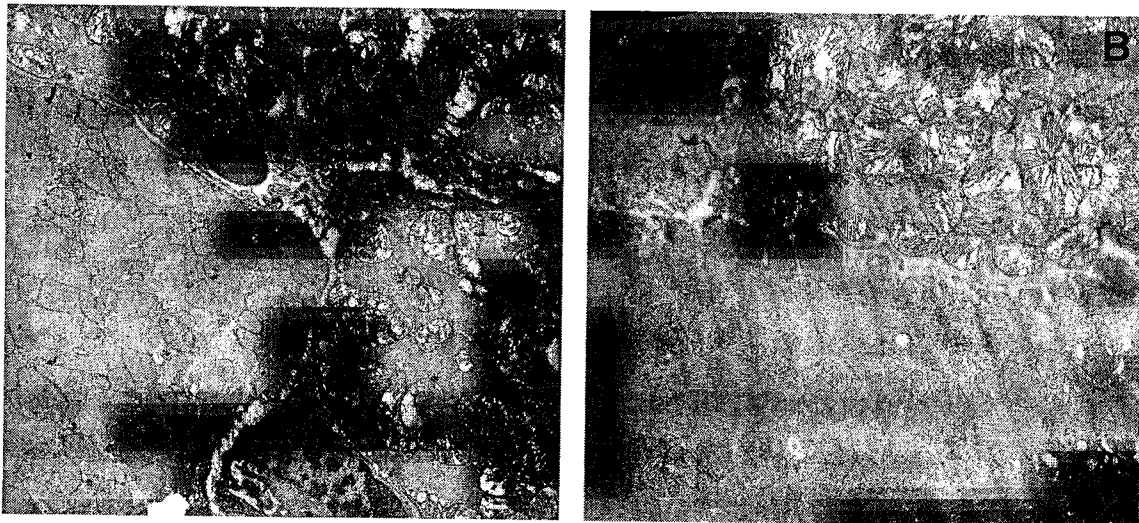


Figura 10 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20RAnf (A) e de um animal do grupo G37RAnf (B). De realçar o “swelling” mitocondrial afectando apenas alguns cardiomiócitos em A e em B, notando-se uma normalidade estrutural nas restantes fibras (ampliação original de A - 6.300x e de B - 8.000x).

Nos animais tratados com d-anfetamina e sujeitos a exercício físico foi também evidente alguma vacuolização sarcoplasmática, à microscopia óptica, mas mais suave que nos animais tratados apenas com anfetamina e afectando, aparentemente, um menor número de fibras. Nestes dois subgrupos (G20ExAnf e G37ExAnf) foram também observados, à microscopia electrónica (figura 11), sinais sugestivos de dilatação do retículo sarcoplasmático e de “swelling” mitocondrial.

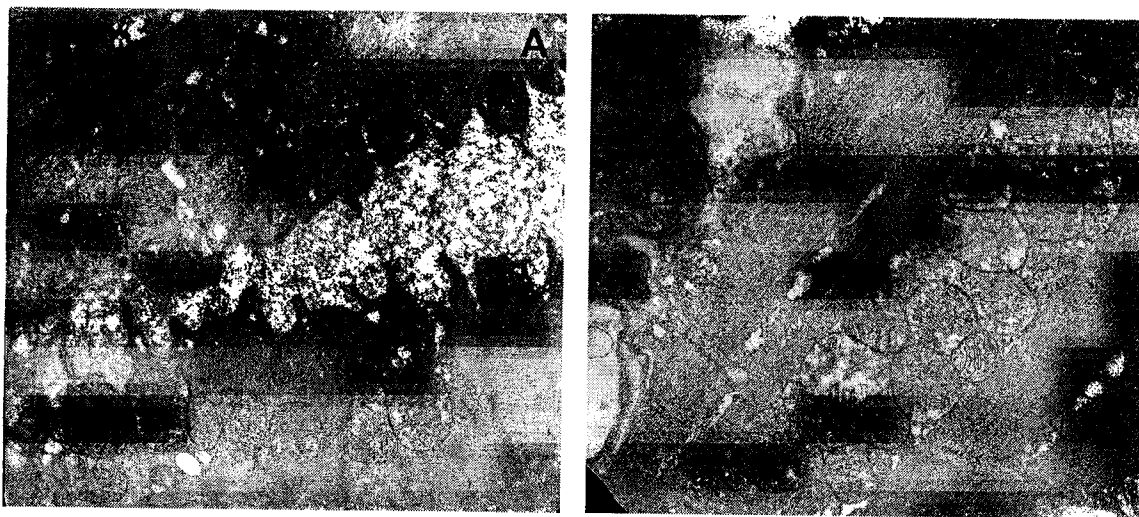


Figura 11 – Fotografias de microscopia electrónica da parede ventricular esquerda de um animal do grupo G20ExAnf (A) e de um animal do grupo G37ExAnf (B). Nas duas fotografias são observados sinais de “swelling” mitocondrial e sinais ténues de dilatação do retículo sarcoplasmático (ampliação original de A - 6.300x e de B - 12.500x).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Discussão da Metodologia

5.1. 1. Procedimentos experimentais

Foram utilizados animais de laboratório (ratinhos) para a realização de todo o estudo experimental; esta opção foi fundamentalmente tomada por questões éticas, já que a administração de d-anfetamina, sem fins terapêuticos, a humanos, do ponto de vista ético, é seriamente questionável e reprovável, sendo o estudo em animais (ratinhos) a alternativa mais viável, apesar das limitações que poderão ocorrer na extrapolação das conclusões para o universo humano. Questões logísticas também determinaram a escolha do modelo animal, para a concretização deste estudo, na medida em que a realização de biopsia do músculo cardíaco em humanos é impraticável (apenas possível em cadáveres). Porque as diferenças inter-sexuais, particularmente a nível hormonal (nomeadamente as que se relacionam com os diferentes níveis de estrogénio) poderão determinar diferentes respostas orgânicas, locais e sistêmicas (para refs. ver Pereira, 1994) utilizaram-se exclusivamente ratinhos machos.

A “natação” foi a situação encontrada para responder à necessidade protocolar de colocar os ratinhos em situação de exercício físico. Foi escolhida por questões logísticas e por se considerar a alternativa mais viável. Certamente se rodeou de algumas limitações, as quais se relacionaram com a ocorrência de alguns momentos de inactividade (os ratinhos por vezes limitavam-se a flutuar) e falta de intensidade ou frequência nos gestos. A utilização do meio líquido, em termos logísticos, também se justificou pela necessidade de manipular a temperatura ambiente para que se despoletassem diferentes respostas metabólicas (alterações da temperatura corporal dos ratinhos).

A utilização de sensores para medição da temperatura (colocados na zona subcutânea dorsal) é justificada, em termos de exequibilidade, pela necessidade de realizar, ao longo do protocolo experimental, medições

repetidas da temperatura; foi igualmente utilizado este sistema por ser considerado prático e preciso na medição da temperatura corporal (Kort et al., 1998). Em oposição à medição rectal da temperatura, um dos locais mais comuns de mensuração da temperatura central (para refs. ver Powers e Howley, 2000), foi realizada a medição subcutânea da temperatura por se considerar ser um bom indicador da temperatura corporal, por ser menos invasivo a médio prazo (foi utilizado o período de uma semana para promover a adaptação tecidual e orgânica aos sensores de temperatura) e por permitir evitar situações adicionais de stress para os animais, as quais poderiam acarretar algumas repercussões nos resultados finais (Kort et al., 1998).

As administrações intraperitoneal e intravenosa de d-anfetamina em ratinhos originam tempos de semi-vida deste composto, ao nível de diversos órgãos, muito semelhantes (cerca de uma hora) assim como a ocorrência de picos máximos de concentração plasmática em tempos idênticos (cerca de 15 minutos) (Jonsson e Lewander, 1974; Riffée et al., 1978; Cho et al., 1973); no entanto, foi realizada a administração intraperitoneal da referida substância por questões fundamentalmente práticas e logísticas, já que se rodeia de menor dificuldade e inflige menor stress aos animais, esta forma de administração. A duração total do protocolo experimental (uma hora) esteve directamente relacionada com o tempo de semi-vida que é atribuído à d-anfetamina ao nível dos diversos órgãos, onde se inclui o coração. A utilização de d-anfetamina deveu-se, de igual forma, ao facto de que esta, administrada intraperitonealmente, atinge concentrações no plasma e cérebro, duas vezes superiores à l-anfetamina, o que contribuirá para a maior potência estimulante do isómero dextro (Riffée et al., 1978).

5.1.2. Procedimentos Estatísticos

A realização da análise descritiva e comparativa de resultados, no âmbito das alterações metabólicas (alterações da temperatura subcutânea), originou a utilização de dois procedimentos estatísticos específicos; assim, pelas características da amostra e dos procedimentos de medida, foi aplicada a

Anova de Medições Repetidas para a comparação múltipla das temperaturas subcutâneas médias no seio de cada subgrupo, ao longo do tempo (comparações intra-subgrupo); este procedimento estatístico é utilizado em situações caracterizadas, pelo acompanhamento ao longo do tempo das amostras (amostras emparelhadas), as quais são alvo de várias medições experimentais (para refs. ver Maroco, 2003). Para a realização de comparações múltiplas de médias entre os diversos subgrupos, para cada momento particular do protocolo experimental (comparações intra-grupo e inter-subgrupos) utilizou-se a one-way Anova.

A análise descritiva e comparativa realizada no âmbito das alterações bioquímicas originou a utilização da one-way Anova para a análise comparativa de médias inter-subgrupos e intra-grupo, no âmbito dos diferentes indicadores bioquímicos avaliados. Este procedimento estatístico deve ser utilizado em situações caracterizadas, pela existência de um factor de medição independente (grupo de ratinhos) e de diversas variáveis dependentes (parâmetros bioquímicos avaliados), sendo este o teste mais potente para comparação de médias populacionais a partir deste tipo de amostras (para refs. ver Maroco, 2003).

Os testes utilizados, para comparação de médias, possuem algumas exigências de aplicação, para que os mesmos sejam considerados mais válidos e potentes, a saber a exigência da Normalidade da Distribuição Amostral e a exigência da Homogeneidade das Variâncias, pressupostos de aplicação da Anova (Análise de Variância). Para verificação do pressuposto da normalidade da distribuição amostral foi aplicado o Teste de Shapiro-Wilk o qual é mais aconselhado no caso de estudos com utilização de amostras de pequena dimensão; procedeu-se igualmente à verificação do pressuposto da Homogeneidade de Variâncias, pela utilização do teste de Levene, baseado na média, sendo este considerado um teste potente e particularmente robusto a desvios de normalidade (para refs. ver Maroco, 2003).

Pelo facto destes procedimentos estatísticos (Anova de Medições Repetidas e one-way Anova) apenas confirmarem a existência ou não de diferenças

estatisticamente significativas, na comparação realizada entre médias, não nos permitindo identificar quais são efectivamente as diferenças, nomeadamente entre qual ou quais pares de médias estas acontecem, surge a necessidade de testar à posteriori estas diferenças, pela utilização dos testes Post Hoc. Neste âmbito, foi escolhido o ajustamento Bonferroni para posterior comparação múltipla de médias, por ser considerado o procedimento mais potente quando estamos perante amostras de reduzida dimensão (para refs. ver Maroco, 2003).

5.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O tecido muscular cardíaco, dos diversos subgrupos em estudo, foi analisado morfológicamente, no final do protocolo experimental; esta análise teve um carácter qualitativo, motivando, por isso, alguma subjectividade nas comparações realizadas entre os diversos subgrupos tendo, contudo, permitido confirmar claramente a existência ou ausência de alterações morfológicas não possibilitando, todavia, a quantificação precisa das mesmas.

À temperatura ambiente de 20°C, os animais do subgrupo controlo apresentaram ligeiras alterações estruturais, apenas visíveis à microscopia electrónica, as quais não foram observadas nos animais controlo, expostos à temperatura de 37°C; esta análise sugeriu que a exposição dos animais à situação protocolar de 20°C foi responsável pelas lesões estruturais observadas, contrariamente à situação protocolar de 37°C que pareceu, por seu lado, não ter causado danos celulares e teciduais aparentes.

Já no que concerne aos animais sujeitos a exercício físico, nas condições ambientais de 20°C, foram novamente visíveis alterações estruturais e ultra-estruturais, mais exuberantes do que as do subgrupo controlo a esta temperatura; à temperatura de 37°C, no subgrupo exposto a exercício físico, as alterações morfológicas parecem ter sido inexistentes. Esta avaliação levou-nos a reforçar o papel da temperatura ambiente de 20°C nos superiores níveis de lesão tecidual, e pareceu também denunciar que o exercício físico contribuiu para as mais marcadas alterações morfológicas evidenciadas a esta temperatura particular.

Os subgrupos tratados com d-anfetamina foram os que apresentaram alterações morfológicas mais extensas e evidentes, comparativamente aos restantes subgrupos estudados; tanto a 20°C como a 37°C, a d-anfetamina foi responsável pela ocorrência de marcadas alterações morfológicas, as quais foram mais pronunciadas à temperatura ambiente de 20°C. Nos animais tratados com d-anfetamina e sujeitos a exercício físico também se observaram evidentes alterações estruturais, todavia, estas foram, aparentemente, mais

ténues, comparativamente aos animais tratados exclusivamente com d-anfetamina.

As alterações morfológicas sofridas pelos cardiomiócitos nos subgrupos expostos à temperatura ambiente de 20°C e em alguns dos subgrupos expostos à temperatura ambiente de 37°C, mais concretamente nos subgrupos G37RAnf e G37ExAnf, são sugestivas da hiperactividade do sistema nervoso simpático e que se traduzem por vacuolização sarcoplasmática à microscopia óptica e por swelling mitocondrial e edema ligeiro do retículo à microscopia electrónica. Esta hiperactividade simpática terá sido, assim, responsável pelo aumento do trabalho e metabolismo celular, os quais, naturalmente, ocasionaram a exacerbação do stress metabólico, mecânico e oxidativo, com consequências locais nefastas, ao nível da estrutura e ultra-estrutura celular (para refs. ver Duarte, 1993).

A influência mais marcada da d-anfetamina na agressão celular e tecidual observada é compreendida, também, pela acção desta sobre o sistema nervoso simpático; neste âmbito, é conhecido que a d-anfetamina actua, fundamentalmente, por mecanismos indirectos, sendo um dos mais referidos a estimulação alfa-adrenérgica, por exagerada libertação de catecolaminas, as quais têm efeitos particulares sobre a respiração mitocondrial e sobre os níveis intracelulares de cálcio livre, entre outros, levando à elevação destes factores (para refs. ver Carvalho, 1998). Uma das consequências directas da elevação dos factores atrás referenciados é a produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio, a qual é responsável pela elevação dos níveis de stress oxidativo, situação que pode ocasionar alterações estruturais prejudiciais (para refs. ver Ascensão, 2003); a elevação dos níveis intracelulares de cálcio livre, induzida pela estimulação alfa-adrenérgica e pelo exercício físico sustentado, pode provocar, por sua vez, a activação de enzimas degradativas como as fosfolipases e proteases, as quais originam disfunções membranares, peroxidação lipídica e degradação proteica, podendo ser afectadas as proteínas responsáveis pela estrutura celular (para refs. ver Ascensão, 2003).

O papel do exercício físico, nas mais marcadas alterações estruturais e ultra-estruturais ocorridas apenas, aparentemente, na situação protocolar de 20°C, poderá ser explicado pelo exagero das alterações homeostáticas acima referidas. As causas desta desregulação homeostática são várias (nas quais se inclui o exercício físico), mas todas parecem levar a um aumento crítico do cálcio sarcoplasmático e dano intracelular pela activação das proteases e fosfolipases dependentes do cálcio (Lane e Phillips, 2003; Tan e Herzlich, 1995; Blanco et al., 2002; Çelik et al., 2002; para refs. ver Criddle, 2003). Os mecanismos potencialmente envolvidos são a depleção de metabolitos essenciais, a destabilização da membrana celular e a depleção de ATP mitocondrial (para refs. ver Evans e Rees, 2002). A depleção de ATP, factor inicial despoletador, ocorre por contracção muscular ou por bloqueio dos patamares metabólicos necessários à sua produção, o que leva a graves alterações no equilíbrio dos electrólitos intracelulares (Backer e McCutchan, 2003). O primeiro distúrbio ocorre ao nível do ião cálcio, com elevação dos seus níveis intracelulares os quais actuam de forma tóxica activando proteases, fosfolipases e outras enzimas que danificam a membrana celular e a mitocôndria, resultando em dano oxidativo por ERO e libertação de compostos intracelulares para a circulação (Backer e McCutchan, 2003). Outros autores defendem que a exacerbação do stress oxidativo, com oxidação dos grupos tiol das proteínas funcionais e/ou por peroxidação lipídica pode alterar, quer a morfologia, quer a funcionalidade do sarcolema e das restantes membranas celulares, contribuindo para as alterações funcionais e estruturais das fibras musculares (para refs. ver Duarte, 1993).

De forma mais evidente, a exposição à temperatura ambiente de 20°C parece ter sido determinante para as alterações morfológicas observadas, já que todos os subgrupos sujeitos a esta condição protocolar exibiram sinais de destruição celular mais pronunciados, comparativamente aos subgrupos sujeitos à situação protocolar de 37°C. Neste âmbito, face aos sinais que apontam para a possível influência do sistema nervoso simpático nas alterações estruturais e ultra estruturais observadas, será pertinente debruçarmo-nos sobre as alterações metabólicas (alterações da temperatura subcutânea) sofridas, pelos diversos subgrupos em estudo.

No que concerne aos subgrupos expostos à temperatura ambiente de 20°C, registaram-se significativas alterações da temperatura subcutânea, ao longo do tempo. Ocorreu, assim, em todos os subgrupos uma resposta hipotérmica, a qual nos parece ter sido determinada, fundamentalmente, pela temperatura ambiente, já que também o subgrupo controlo, para esta temperatura, respondeu de forma idêntica aos restantes. De salientar que, no entanto, a resposta hipotérmica foi mais acentuada nos subgrupos expostos ao exercício físico e à acção conjugada de exercício físico e d-anfetamina.

Já no que se refere aos subgrupos expostos à temperatura ambiente de 37°C, não se registaram significativas oscilações da temperatura subcutânea ao longo do protocolo experimental implementado. A exposição à d-anfetamina, ao exercício físico e à acção conjugada destes factores, nas condições ambientais de 37°C, não resultou, ao contrário do que seria esperado, numa resposta hipertérmica (Martinez et al., 2002; Saadat et al., 2003; Mechan et al., 2002; Dafters e Lynch, 1998; Carvalho et al., 2002).

Estes resultados poderão ser explicados com base nos mecanismos de regulação térmica e nas trocas de calor, por condução, na água. A manutenção de uma temperatura corporal constante exige que a perda de calor esteja em equilíbrio com a produção de calor (para refs. ver Powers e Howley, 2000). O centro hipotalâmico de controlo da temperatura é responsável pela activação de mecanismos nervosos e hormonais os quais regulam as taxas de produção e de perda de calor, imprescindíveis à homotermia (para refs. ver Powers e Howley, 2000). Por exemplo, face à elevação da temperatura corporal, são despoletadas respostas neuro-endócrinas que induzem vasodilatação cutânea e elevação do débito cardíaco, aumentando o fluxo sanguíneo à periferia e a perda de calor, assim como respostas comportamentais que incluem hidratação e procura de locais frescos (Martinez et al., 2002). Caso haja diminuição da temperatura corporal, o hipotálamo reduz a perda de calor pela vasoconstrição dos vasos sanguíneos cutâneos, pelo aumento da produção e libertação de catecolaminas, as quais, por sua vez, aumentam a taxa metabólica e a produção de calor (para refs. ver Powers e Howley, 2000). Um

organismo encontra-se em situação de hipertermia quando existe um desequilíbrio no sentido de uma mais elevada taxa de produção de calor ou incorre em situação de hipotermia quando o desequilíbrio ocorre no sentido de uma exagerada perda de calor.

À temperatura ambiente de 20°C parece ter ocorrido um desequilíbrio entre a taxa de produção de calor e a taxa de perda de calor, o qual ocasionou uma maior sobrecarga sobre os mecanismos de regulação térmica, a esta temperatura, que se mostraram ineficazes na manutenção da temperatura corporal nos valores pré-experimentais. Uma vez que, em meio líquido, o calor produzido pelo corpo é perdido, fundamentalmente, por mecanismos de condução e convecção (para refs. ver Powers e Howley, 2000), parece-nos que, na água, à temperatura de 20°C, a perda de calor por fenómenos de condução e convecção, terá sido, possivelmente, demasiado eficaz, ocasionando o visível desequilíbrio nos mecanismos de regulação térmica.

A exposição à temperatura de 20°C, em meio aquático terá, assim, acarretado, inicialmente, um aumento da perda de calor por condução e convecção, tendo o centro hipotalâmico de regulação da temperatura sido chamado a actuar, no sentido de restabelecer o equilíbrio térmico perdido. Este terá actuado a nível periférico, procurando aumentar a taxa de produção de calor pela hiperactividade simpática, tendo induzido, com esse objectivo, o aumento do metabolismo mitocondrial e do trabalho cardíaco, a vasoconstrição cutânea e a hiperactividade muscular, factores que, por sua vez, contribuíram para a exacerbação do stress metabólico, mecânico e oxidativo, o qual terá tido consequências nefastas ao nível da estrutura e ultra-estrutura celular (Duarte, 1993). O equilíbrio térmico parece ter sido, enfim, atingido no final do protocolo experimental, para temperaturas subcutâneas mais baixas, com a estabilização da temperatura corporal no tempo, consequência das idênticas taxas de perda e de produção de calor.

Estes mecanismos periféricos de regulação da temperatura corporal, em ambientes hipotérmicos, poderão explicar os resultados de alguns estudos que referem que temperaturas baixas e doses baixas de compostos análogos à MDMA produzem hipotermia (Dafters e Lynch, 1998). No estudo levado a cabo

por estes autores foram administradas doses de 10 e 15 mg/Kg de peso de MDMA, e os animais (ratos) foram expostos à temperatura ambiente de 17°C.

À temperatura de 20°C, a acção do factor exercício físico revelou-se influente na resposta hipotérmica, a qual não foi potenciada a níveis superiores pela acção da d-anfetamina. O exercício físico, ocasionando um aumento das exigências metabólicas e um exagero das alterações homeostáticas, representará uma maior sobrecarga para os mecanismos de regulação térmica, os quais já se encontram limitados pelas condições ambientais extremas (para refs. ver Powers e Howley, 2000); estes factos poderão explicar a resposta hipotérmica mais acentuada neste caso particular.

A exposição dos diversos subgrupos à temperatura ambiente de 37°C não potenciou a elevação da temperatura subcutânea, já que, como os resultados demonstraram, esta não sofreu assinaláveis oscilações. Neste sentido, e face aos resultados obtidos a esta temperatura, parece-nos plausível concluir que existiu um equilíbrio entre a taxa de produção de calor e a taxa de perda de calor. Neste caso, parece-nos provável que no meio aquático, os mecanismos responsáveis pela perda de calor corporal, à temperatura de 37°C, não tenham sido tão exagerados quanto a 20°C, permitindo o equilíbrio com os mecanismos de produção de calor. Também nos parece claro que a exposição à temperatura ambiente de 37°C, à administração de d-anfetamina e à realização de exercício físico a esta temperatura, não teve consequências centrais, sobre o centro hipotalâmico de controlo da temperatura.

No que diz respeito ao papel da d-anfetamina na indução de alterações na temperatura corporal, é referido que o seu consumo resulta, frequentemente, em hipertermia no homem e em animais de experiência (Carvalho et al., 1997). De facto, a maior parte dos casos relatados de toxicidade induzida pela d-anfetamina relaciona-se com a ocorrência de hipertermia e é provável que as complicações que lhe seguem (rabdomiólise, coagulação intravascular disseminada, insuficiência renal aguda) se relacionem com o grau e duração da hipertermia (Mecham et al., 2002; Bodenham e Mallick, 1996). Esta situação hipertérmica, tem sido também apresentada como elemento chave na indução

de toxicidade da MDMA (Miller e O'Callaghan, 1995). A anfetamina, sendo um composto simpaticomimético de acção indirecta, conduz a um estado semelhante ao que se verifica durante a hiperactividade simpática, motivada pelas causas mais diversas (Carvalho et al., 1997; Carvalho et al., 1999; para refs. ver Kalant, 2001). Como resultado da hiper-estimulação dos receptores alfa e beta adrenérgicos, ocorre o aumento do metabolismo mitocondrial com a consequente produção de calor; o aumento da actividade motora, acompanhada por um estado hipermetabólico do músculo esquelético, também contribui para o aumento da temperatura corporal; de forma idêntica, a actividade física sustentada, a temperatura ambiente elevada e a inapropriada reposição de líquidos, podem potenciar o efeito da anfetamina sobre os mecanismos termorregulatórios (Carvalho et al., 1997; Walubo e Seger, 1999; Martinez et al., 2002; Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2002; para refs. ver Kalant, 2001). A resposta termogénica à MDMA parece ser também muito sensível à temperatura ambiente, sendo a direcção e duração da resposta complexa e determinada, parcialmente, por esta (Dafters e Lynch, 1998); estes autores acrescentam que, geralmente, doses elevadas e temperaturas ambiente elevadas produzem hipertermia, doses baixas e temperaturas ambiente reduzidas produzem hipotermia.

A ausência de resposta hipertérmica, nas condições ambientais de 37°C, como consequência da administração de d-anfetamina e da exposição à situação de exercício físico, apesar de não esperada, poderá permitir a compreensão isolada dos mecanismos de acção da d-anfetamina e do exercício físico na cardiotoxicidade. Poderemos assim perceber, mais claramente, se a hipertermia, a qual é apontada, frequentemente, como resultado da toxicidade induzida pela d-anfetamina, é factor imprescindível para a ocorrência de outras manifestações tóxicas induzidas pela d-anfetamina.

Neste contexto, várias pesquisas têm defendido que a produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio, com o consequente aumento do stress oxidativo, poderá ser um dos mecanismos envolvidos na toxicidade cardíaca induzida pela d-anfetamina (Zhou et al., 2003; Wolf et al., 2000; Carvalho et al., 2002; Zhang et al., 2003). Este mecanismo de toxicidade tem sido igualmente

associado ao exercício físico (Bejma et al., 2000; Poulsen et al., 1996; Palazzetti et al., 2003; Schippinger et al., 2002; Viña et al., 2000; para refs. ver Ascensão et al., 2003; Packer, 1997; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001).

Pela crescente importância atribuída ao mecanismo oxidativo de toxicidade, analisaremos o comportamento de indicadores bioquímicos de stress oxidativo e de lesão tecidual por stress oxidativo, evidenciado pelos diversos subgrupos em estudo.

No que se refere aos indicadores bioquímicos de lesão tecidual por peroxidação lipídica, foi observada, em todos os subgrupos, a presença de TBARS, embora não se tenham registado diferenças com significado estatístico nas comparações realizadas (intra-grupo e inter-subgrupos); este marcador de lesão tecidual por stress oxidativo parece não ter mostrado sensibilidade suficiente para diferenciar os subgrupos em estudo, pelo que os resultados no âmbito da peroxidação lipídica não são claros nem oferecem grandes evidências acerca do papel da administração da d-anfetamina, do exercício físico e da temperatura ambiente na ocorrência de peroxidação lipídica tecidual.

Analisando agora os resultados obtidos, no que diz respeito aos indicadores bioquímicos de stress oxidativo, e atendendo de forma particular aos níveis de GSH, no seio do grupo G20, não surgiram diferenças com significado estatístico nos valores apresentados pelos diferentes subgrupos, no entanto, foi no G20 que surgiram os menores valores de GSH, comparativamente aos diferentes subgrupos do G37. De facto, foi à temperatura ambiente de 37°C que surgiram os valores mais elevados desta substância endógena antioxidante, tendo estes aumentado de forma notória nos subgrupos G37ExC e G37ExAnf; neste último subgrupo o valor de GSH elevou-se de forma significativa, comparativamente aos subgrupos G37RC e G37RAnf. A esta temperatura ambiente, os factores exercício físico e d-anfetamina, actuando de forma combinada, parecem ter sido determinantes nos níveis de GSH apresentados; todavia, o exercício físico, por si só, parece ter sido o factor mais preponderante nesta resposta. Nas comparações realizadas inter-subgrupos,

os subgrupos G20ExC e G20ExAnf apresentaram valores de GSH significativamente inferiores aos subgrupos G37ExC e G37ExAnf. Estes resultados parecem indicar que a temperatura ambiente de 20°C terá causado superiores níveis de toxicidade, manifestos no maior consumo de GSH (Magalhães et al., 2004).

Analisando os valores percentuais de GSSG/GSH, verificámos que os diferentes subgrupos do G37 registaram menores índices de stress oxidativo, comparativamente aos diferentes subgrupos do G20. Sendo que os valores de GSSG/GSH considerados normais variam entre os 5 e 15% (para refs. ver Duarte, 1993), poderemos afirmar que todos os subgrupos expostos a 37°C apresentaram níveis de stress oxidativo considerados fisiológicos. À temperatura ambiente de 37°C, não se verificaram diferenças com significado estatístico, nas comparações realizadas intra-grupo, pelo que a influência da d-anfetamina e do exercício físico no comportamento deste indicador, a esta temperatura, não parece ter sido determinante. Ressalva-se, no entanto, o resultado apresentado pelo subgrupo G37RAnf, que parece indicar que a administração de d-anfetamina poderá ter sido responsável pelos níveis ligeiramente mais elevados de stress oxidativo, neste subgrupo.

Pelo contrário, os diversos subgrupos do G20 estiveram expostos a níveis superiores de stress oxidativo tendo o subgrupo G20ExC registado o valor mais elevado de GSSG/GSH, o qual foi significativamente superior ao valor apresentado pelo subgrupo G37ExC. A temperatura ambiente de 20°C parece, pois, ter sido determinante nos níveis percentuais de GSSG/GSH. Os resultados apresentados pelo subgrupo G20ExC levaram-nos ainda a considerar que, apesar de não terem sido encontradas diferenças com significado estatístico nas comparações realizadas intra-grupo, o factor exercício físico parece ter contribuído para níveis mais elevados de stress oxidativo. Também seria esperado que a administração de d-anfetamina ocasionasse uma exacerbação do stress oxidativo; todavia, a 20°C, tal não se verificou já que este factor, por si só, ocasionou valores percentuais de GSSG/GSH inferiores ao subgrupo G20RC e, em combinação com o exercício físico parece ter promovido algum tipo de protecção à influência do exercício

físico, nos níveis de stress oxidativo. Estas diferenças sem significado estatístico devem ser, no entanto, interpretadas com reservas.

No que diz respeito ao indicador de lesão tecidual por oxidação proteica, os grupos carbonilo, estes foram, na generalidade, mais elevados no seio dos diversos subgrupos do G20 comparativamente aos subgrupos que constituem o G37.

À temperatura ambiente de 37°C, o factor exercício físico parece ter sido o mais determinante na ocorrência de oxidação proteica, com valores significativamente superiores à situação controlo. O factor d-anfetamina, à temperatura de 37°C, parece ter sido responsável por algum tipo de protecção face à influência do exercício físico nos índices de oxidação proteica, todavia, esta influência terá de ser compreendida com precaução, pela falta de significado estatístico.

À temperatura de 20°C, o factor exercício físico também parece ter sido o mais influente na ocorrência de oxidação proteica, tendo o subgrupo G20ExC apresentado valores percentuais deste índice significativamente superiores ao subgrupo G20RC. Também neste caso o factor d-anfetamina parece ter operado de forma protectora face à acção do factor exercício físico, ocasionando uma menor percentagem de grupos carbonilo, embora, mais uma vez, esta conclusão tenha que ser interpretada com cautela, pela ausência de significado estatístico nas diferenças encontradas. Pelo resultado da comparação realizada entre os subgrupos G20RAnf e G37RAnf, a situação protocolar a 20°C parece ter sido determinante na ocorrência de oxidação proteica. A situação de hipotermia, vivenciada pelos diversos subgrupos do G20, parece ter tornado estes subgrupos mais vulneráveis à oxidação proteica, induzida também pelo exercício físico e de forma, não tão evidente, pela acção da d-anfetamina.

Face a estes resultados, de referir que diversos estudos têm demonstrado que a administração aguda de d-anfetamina provoca alterações na homeostasia dos grupos sulfidrilo não proteicos, nomeadamente no fígado e rim, de forma

dependente da dose (Carvalho et al., 1993), surgindo o mecanismo oxidativo, como um dos intervenientes na toxicidade induzida pela d-anfetamina. A anfetamina tem sido considerada responsável pela ocorrência de níveis superiores de stress oxidativo pelo mecanismo de hipertermia que frequentemente origina, sendo esta uma condição pró-oxidante (Carvalho et al., 1997; Carvalho et al., 1993). As catecolaminas endógenas, cuja libertação a d-anfetamina induz, também parecem ser responsáveis pela depleção de GSNP (Carvalho et al., 1993); o metabolismo das catecolaminas, que motiva a síntese de peróxido de hidrogénio como produto resultante, parece intervir no fenómeno oxidativo de toxicidade (Carvalho et al., 1999); também a auto-oxidação das catecolaminas, que pode ocorrer quando as enzimas que as metabolizam ficam saturadas, origina compostos altamente reactivos onde também se incluem as ERO (para refs. ver Paker, 1997; Givertz e Colucci, 1998; Cadet e Brannock, 1998). O metabolismo da d-anfetamina parece ser, de forma idêntica, responsável pela depleção de GSH devido à conversão metabólica da d-anfetamina, pelo citocromo P450 2D, num intermediário reactivo (muito provavelmente um epóxido reactivo) que reage com a glutathiona para formar o aducto (glutathiona-S-yl)-p-hidroxianfetamina, originando assim a depleção de GSH (Carvalho et al., 1996).

No estudo por nós conduzido, a 37°C, os resultados que se referem ao papel da d-anfetamina no fenómeno oxidativo de toxicidade, não são sempre claros e evidentes.

A não ocorrência de hipertermia no G37, e a ocorrência de valores relativamente baixos de GSSG/GSH, leva-nos a considerar que a hipertermia poderá hipoteticamente constituir-se como um mecanismo determinante no fenómeno oxidativo e ser, desta forma, principal responsável pela ocorrência de stress oxidativo induzido pela acção da d-anfetamina.

No nosso estudo, à temperatura ambiente de 37°C, apesar de se esperarem menores níveis de GSH, devido ao relativo aumento da oxidação de GSH (manifestado na elevação dos níveis de GSSG), a ocorrência de níveis de stress oxidativo relativamente baixos, nomeadamente nos subgrupos G37ExC

e G37ExAnf, pareceu dever-se, fundamentalmente, à elevação tecidual dos níveis de GSH, a qual ocorre em condições de produção adicional de GSSG (Magalhães et al., 2004); nestas circunstâncias, o fígado é capaz de exportar quantidades superiores de GSH para o sangue, a partir do qual o músculo cardíaco importa GSH, via ciclo gama-glutamil, para assim combater a produção adicional de radicais livres (Magalhães et al., 2004; para refs. ver Ascensão et al., 2003). Estes resultados parecem indicar que estes dois subgrupos foram capazes de responder à produção adicional de espécies reactivas com mais eficácia, resultando em níveis inferiores de stress oxidativo tecidual.

O papel do exercício físico, à temperatura ambiente de 37°C, na elevação significativa dos níveis de oxidação proteica, face à situação controlo, pode ser compreendido pelo facto de este se constituir como uma agressão orgânica favorável à produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio e ao incremento do stress oxidativo a nível celular, tecidual e orgânico devido, fundamentalmente, ao aumento das exigências metabólicas que origina, nomeadamente sobre o músculo cardíaco (Bejma et al., 2000; Viña et al., 2000; Palazzetti et al., 2003; para refs. ver Ascensão et al., 2003; Packer, 1997; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001). Os níveis relativamente baixos de oxidação proteica, apresentados pelo subgrupo G37RAnf, e a menor percentagem de grupos carbonilo, verificada no subgrupo G37ExAnf, não são, no entanto, compreendidos à luz dos conhecimentos actuais, que atribuem também à d-anfetamina um papel determinante na ocorrência de stress oxidativo no músculo cardíaco (Zhou et al., 2003; Wolf et al., 2000; Carvalho et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Face aos resultados obtidos na situação protocolar de 20°C, os superiores níveis de stress oxidativo parecem estar relacionados com a situação de hipotermia, vivenciada por estes subgrupos, na qual ocorre uma sobrecarga sobre os mecanismos de regulação da temperatura corporal, os quais são solicitados no sentido de restabelecerem o equilíbrio térmico perdido. Nestas condições o factor exercício físico, apesar da ausência de significado estatístico, parece resultar numa exacerbação do desequilíbrio térmico e em

níveis mais elevados de stress oxidativo, os quais não parecem ter sido aumentados pela acção da d-anfetamina, como seria esperado. O contexto hipotérmico parece ser o factor mais importante na ocorrência de stress oxidativo, seguido da influência do exercício físico, nestas circunstâncias.

O papel do exercício físico na relativa elevação dos níveis de stress oxidativo e de lesão tecidual por oxidação proteica, à temperatura ambiente de 20°C, parece relacionar-se também, como já foi referido, pelas consequências directas deste ao nível de um incremento da produção de ERO; durante o exercício físico, o fluxo sanguíneo coronário pode aumentar até 4X e a elevação da taxa metabólica oxidativa cardíaca decorrente do exercício físico constitui-se como factor predisponente para a produção acrescida de ERO (para refs. ver Ascensão et al., 2003). Alterações nas concentrações intracelulares de ATP, com aumento das concentrações de AMP e ADP, diminuição das reservas de glicogénio, modificações na temperatura e pH, perda da homeostasia do ião Ca^{2+} e respiração mitocondrial não acoplada, consequências directas do exercício físico, podem ser estímulos para a formação adicional de ERO (para refs. ver Ascensão et al., 2003), provocando assim, de forma particular, a oxidação de proteínas, tornando-as susceptíveis a ataques proteolíticos (para refs. ver Bejma et al., 2000; Palazzetti et al., 2003; Fabiani et al., 2003; Lim et al., 2002; Cadet e Brannock, 1998).

Face à influência da administração de d-anfetamina, seriam esperados níveis superiores de stress oxidativo e de lesão tecidual por oxidação proteica, o que não sucede claramente. Neste âmbito seriam esperados diferentes resultados já que diversos estudos têm atribuído também à d-anfetamina um papel determinante na ocorrência de stress oxidativo, de forma particular, do músculo cardíaco (Zhou et al., 2003; Wolf et al., 2000; Carvalho et al., 2002; Zhang et al., 2003); no entanto, não deixam de ser claros e evidentes os danos teciduais e celulares provocados pela acção da d-anfetamina. Serão, todavia, necessários mais estudos para a clarificação do papel da d-anfetamina nos mecanismos oxidativos de toxicidade, no caso particular do músculo cardíaco.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O estudo realizado permitiu a obtenção de novos conhecimentos acerca da influência do exercício físico e da temperatura corporal, em marcadores de cardiotoxicidade aguda, induzida pela administração de d-anfetamina. Com base nos resultados obtidos é possível tirar as seguintes conclusões gerais:

- ✓ As alterações estruturais e ultra estruturais exibidas, de forma mais pronunciada, pelos subgrupos expostos à d-anfetamina não poderão ser explicados, neste estudo particular, pelo stress oxidativo; todavia, a acção da d-anfetamina sobre o sistema nervoso simpático, poderá ser uma explicação credível para as lesões teciduais salientadas.

- ✓ Já no que diz respeito à influência do exercício físico, por si só, nas alterações celulares e teciduais observadas, estas parecem ter ocorrido devido ao aumento das exigências metabólicas, mecânicas e oxidativas, que à temperatura ambiente de 20°C se exacerbaram pela ocorrência paralela de uma situação de hipotermia nos subgrupos estudados.

- ✓ O confronto com um meio ambiente de características hipotérmicas, e a particularidade dos mecanismos de regulação térmica e das trocas de calor, por condução, na água parecem ter tornado este contexto protocolar propício à ocorrência de superiores níveis de stress oxidativo e de lesão tecidual por stress oxidativo, provavelmente pela activação do sistema nervoso simpático, chamado a intervir, para que se recuperasse o equilíbrio térmico perdido.

Estas conclusões gerais são suportadas pelas seguintes conclusões específicas:

→ A d-anfetamina foi responsável pela mais marcada e exuberante destruição celular e tecidual observada, comparativamente aos restantes subgrupos estudados, e de forma mais pronunciada a 20°C.

→ O exercício físico foi responsável, à temperatura ambiente de 20°C, por mais marcadas lesões estruturais e ultra estruturais, comparativamente ao subgrupo controlo, a esta temperatura.

→ A temperatura ambiente de 20°C parece ter sido o factor mais preponderante nas alterações morfológicas observadas, na medida em que todos os subgrupos sujeitos a esta situação protocolar exibiram sinais de lesão celular mais pronunciados, comparativamente a todos os subgrupos expostos a 37°C.

→ As alterações morfológicas ocorridas, nomeadamente a vacuolização sarcoplasmática, observada à microscopia óptica, o swelling mitocondrial e o ligeiro edema do retículo, observados à microscopia electrónica, são sugestivas da hiperactividade do sistema nervoso simpático.

→ A exposição à temperatura ambiente de 20°C induziu uma significativa diminuição da temperatura subcutânea, a qual foi significativamente exacerbada, no decorrer do protocolo experimental, pela realização de exercício físico e pela acção conjugada de exercício físico e d-anfetamina.

→ A exposição à temperatura ambiente de 37°C não induziu significativas oscilações da temperatura subcutânea. A realização de exercício físico, a administração de d-anfetamina e a acção conjugada de ambos não resultou numa resposta hipertérmica.

→ Os mecanismos periféricos de regulação da temperatura corporal e as trocas de calor, por condução, na água parecem explicar as alterações térmicas testemunhadas.

→ À temperatura ambiente de 20°C, na água, parece ter ocorrido um desequilíbrio entre a taxa de produção de calor e a taxa de perda de calor, com uma mais elevada perda de calor por condução, o que resultou na observada hipotermia; já à temperatura ambiente de 37°C, os mecanismos responsáveis

pela perda de calor corporal não foram tão exagerados quanto a 20°C, permitindo o equilíbrio com os mecanismos de produção de calor.

→ A não ocorrência de hipertermia, na situação protocolar de 37°C, pela acção da d-anfetamina e pela realização de exercício físico parece indicar que a acção da d-anfetamina não resultou, aparentemente, na desregulação do centro hipotalâmico de controlo da temperatura.

→ Os diferentes subgrupos do G20 apresentaram os menores valores relativos de GSH, comparativamente aos diferentes subgrupos do G37, o que parece indicar que a temperatura ambiente de 20°C causou superiores níveis de toxicidade, manifestos no maior consumo de GSH.

→ Nos diversos subgrupos do G20 ocorreram superiores níveis de stress oxidativo, comparativamente aos diferentes subgrupos do G37, que registaram níveis de stress oxidativo considerados fisiológicos; tal parece indicar que a temperatura ambiente de 20°C foi determinante na elevação dos níveis de stress oxidativo.

→ A realização de exercício físico, à temperatura ambiente de 20°C, contribuiu para a significativa exacerbação dos níveis de stress oxidativo.

→ A administração de d-anfetamina, a 20°C, não resultou num agravamento do stress oxidativo; paralelamente parece ter promovido algum tipo de protecção face à influência do exercício físico nos níveis de stress oxidativo observados.

→ Os níveis de oxidação proteica foram sucessivamente mais elevados nos subgrupos do G20, comparativamente aos subgrupos do G37 o que parece indicar que a temperatura ambiente de 20°C foi responsável pela ocorrência de superiores níveis de oxidação proteica.

→ O exercício físico, tanto a 20°C como a 37°C, foi responsável pela elevação significativa dos níveis de lesão tecidual por oxidação proteica, relativamente aos subgrupos controlo.

→ Os níveis fisiológicos de stress oxidativo, evidenciados pelos diversos subgrupos expostos a 37°C, parecem resultar da mais eficaz resposta dada à produção adicional de ERO, através da elevação tecidual dos níveis de GSH, a qual ocorre em situações de produção adicional de GSSG.

→ O exercício físico, constituindo-se como uma agressão orgânica favorável à produção acrescida de ERO e ao incremento do stress oxidativo a nível celular, tecidual e orgânico devido, fundamentalmente, ao aumento das exigências metabólicas que origina, foi responsável pela elevação dos níveis de stress oxidativo e oxidação proteica a 20°C e de oxidação proteica a 37°C.

→ Os superiores níveis de stress oxidativo evidenciados a 20°C parecem relacionar-se com a situação de hipotermia criada, a qual representou uma sobrecarga para os mecanismos de regulação térmica e acarretou a intervenção do sistema nervoso simpático, para que se restabelecesse o equilíbrio térmico perdido.

→ Foram evidentes os danos estruturais e ultra estruturais sofridos pelos cardiomiócitos por acção da d-anfetamina, todavia, também seriam esperados superiores níveis de stress oxidativo e de lesão tecidual por oxidação proteica, por acção da d-anfetamina e pela realização de exercício físico, o que não se verificou, claramente, neste estudo.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Angrist, B.; Corwin, J.; Bartlik, B.; Cooper, T. (1987). Early pharmacokinetics and clinical effects of oral d-amphetamine in normal subjects. Biological Psychiatry, 22:1357-1368.

Ascensão, A.; Magalhães, J.; Soares, J.; Duarte, J.A. (2003). Exercício e Stress Oxidativo Cardíaco. Revista Portuguesa de Cardiologia, 22(5):651-678.

Asghar, S.; Tanay, V.; Baker, G.; Greenshaw, A.; Silverstone, P. (2003). Relationship of plasma amphetamine levels to physiological, subjective, cognitive and biochemical measures in healthy volunteers. Human Psychopharmacology Clinical and Experimental, 18:291-299.

Azevedo, C. (1979). Microscopia Electrónica. Curso Teórico-prático de Técnicas. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto (circulação interna).

Backer, S.; McCutchan, H. (2003). Rhabdomyolysis: case report and discussion. Internet Journal of Emergency & Intensive Care Medicine, 7(1):1-13.

Bejma, J.; Ramires, P.; Ji, L.L. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. Acta Physiologica Scandinavica, 169(4):343-351.

Bertholf, R.L.; Nicholson, J.R.; Wills, M.R.; Savory, J. (1987). Measurements of lipid peroxidation products in rabbit brain and organs (response to aluminum exposure). Annals of Clinical and Laboratorial Sciences. 17:418-423.

Blanco, J.; Zabalza, M.; (2002). Rhabdomyolysis of infectious and noninfectious causes. Southern Medical Journal, 95(5):542-544.

Bodenham, A.R.; Mallick, A. (1996). New dimensions in toxicology: hyperthermic syndrome following amphetamine derivates. Intensive Care Medicine, 22:622-624.

Borst, S.; Oliver, R.; Scarpace, P. (1994). Alpha 1-adrenergic and arginine vasopressin stimulation of inositide hydrolysis in rat hepatocytes is unaltered in senescence. Journal of Gerontology, 49:B18-B21.

Bower, E.A. (2003). Use of amphetamines in the military environment. The Lancet - Extreme Medicine, 362:18-19.

Brauer, L.; Ambre, J. Witt, H. (1996). Acute tolerance to subjective but not cardiovascular effects of d-amphetamine in normal, healthy men. Journal of Clinical Pharmacology, 16:72-76.

Brody, S.; Krause, C.; Veit, R.; Rau, H. (1998). Cardiovascular autonomic dysregulation in users of MDMA ("ecstasy"). Psychopharmacology, 136:390-393.

Cadet, J.L.; Brannock, C. (1998). Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. Neurochemistry International, 32:117-131.

Carr, A.; Zhu, B.; Frei, B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E). Circulation Research, 87:349-354.

Carvalho, F. D.; Bastos, M. L.; Timbrell, J. A. (1993). Depletion of total non protein sulphhydryl groups in mouse tissue after administration of d-amphetamine. Toxicology, 83:31-40.

Carvalho, F.; Remião, F.; Amado, F.; Domingues, P.; Correia, A. J.F.; Bastos, M. L. (1996). d- Amphetamine interaction with glutathione in freshly isolated rat hepatocytes. Chemical Research in Toxicology, 9:1031-1036.

- Carvalho, F.; Remião, F.; Soares, M. E.; Catarino, R.; Queiroz, G.; Bastos, M. L. (1997). d- Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. Archives of Toxicology, 71:429-436.
- Carvalho, F. D. (1998). Estudo da Hepatotoxicidade da d-Anfetamina. Ensaios in vivo e in vitro. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto.
- Carvalho, M.; Carvalho, F.; Bastos, M.L. (2001). Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. Archives of Toxicology, 74(12):789-793.
- Carvalho, M.; Carvalho, F.; Remião, F.; Pereira, M.L.; Pires-das-Neves, R.; Bastos, M.L. (2002). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. Archives of Toxicology, 76(3):166-172.
- Carvalho, F. D.; Fernandes, E.; Remião, F.; Bastos, M. L. (1999). Effect of d-amphetamine repeated administration on rat antioxidant defenses. Archives of Toxicology, 73(2):83-89.
- Çelik, A.; Yeniçerioglu, Y.; Saklamaz, A.; Sifil, A.; Çavdar, C.; Ersoy, R.; Çamsari, T. (2002). Acute renal failure due to rhabdomyolysis secondary to severe hyperosmolality: a case report. Journal of Ankara Medical School, 24(4):207-210.
- Cho, A.; Hodshon, B.; Lindeke, B.; Miwa, G. (1973). Application of quantitative GC-mass spectrometry to study of pharmacokinetics of amphetamine and phentermine. Journal of Pharmacological Sciences, 62:1491-1494.
- Cho, A.K.; Narimatsu, S.; Kumagai, Y. (1999). Metabolism of drugs of abuse by cytochromes P450. Addiction Biology, 4:283-301.

Cohen, R. S. (2001). Ecstasy: the love drug. Gay and Lesbian review worldwide, 8(4):20-21.

Corcoran, G.; Ray, S. (1992). The role of the nucleus and other compartments in toxic cell death produced by alkylating hepatotoxicants. Toxicology and Applied Pharmacology, 113:167-183.

Criddle, L. (2003). Rhabdomyolysis: pathophysiology, recognition and management. Critical Care Nurse, 23(6):14-32.

Criner, J.A.; Appelt, M.; Coker, C.; Conrad, S.; Holliday, J. (2002). Rhabdomyolysis: the hidden killer. Medical-Surgical Nursing Journal, 11(3):138-155.

Dafters, R.; Lynch, E. (1998). Persistent loss of thermoregulation in the rat induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") but not by fenfluramine. Psychopharmacology, 138:207-212.

Darvesh, A.S; Shankaran, M.; Gudelsky, G.A. (2002). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine produces glycogenolysis and increases the extracellular concentration of glucose in the rat brain. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 300(4):138-144.

Duarte, J.A. (1993). Lesões Celulares do Músculo Esquelético Induzidas Pelo Exercício Físico. Dissertação de Doutorado. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física. Universidade do Porto.

Duarte, J.A.; Carvalho, F.; Natsis, K.; Remião, F.; Bastos, M.L.; Soares, J.; Appell, H. (1999). Structural Alterations of Skeletal Muscle Induced by Chronic Administration of D-Amphetamine and Food Restriction. Basic Applied Myology, 9(2):65-69.

Duarte, J.A.; Leão, A.; Magalhães, J.; Ascensão, A.; Bastos, M.L.; Amado, F.L.; Vilarinho, L.; Quelhas, D.; Appell, H.J.; Carvalho, F. (2004). Strenuous exercise aggravates MDMA-induced skeletal muscle in mice. Toxicology (accepted for publication).

Elster, E.; Harrison, J.; Stasiewicz, S.; Wang, D.; Golocovsky, M. (2002). Malignant Hyperthermia in an adult trauma patient. The American Surgeon, 68(10):883-885.

Evans, M.; Rees, A. (2002). Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle. Drug Safety, 25 (9):649-663.

Fabiani, R.; Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Morozzi, G. (2001). Antioxidants prevent the lymphocyte DNA damage induced by PMA-stimulated monocytes. Nutrition and Cancer, 39(2):284-291.

Fallon, J.; Shah, D.; Kicman, A.; Hutt, A.; Henry, J.; Cowan, D.; Forsling, M. (2002). Action of MDMA (Ecstasy) and Its Metabolites on Arginine Vasopressin Release. Annals of New York Academy of Sciences, 965:399-409.

Fawthrop, D.; Boobis, A.; Davies, D. (1991). Mechanisms of cell death. Archives of Toxicology, 65:437- 444.

Forsling, M.; Fallon, J.; Shah, D.; Tilbrook, G.; Cowan, D.; Kicman, A.; Hutt, A. (2002). The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, `ecstasy`) and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus. British Journal of Pharmacology, 135:649-656.

Frishman, W.H.; Del Vecchio, A.; Sanal, S.; Ismail, A. (2003). Cardiovascular manifestations of substance abuse. Part 2: alcohol, amphetamines, heroin, cannabis and caffeine. Heart Disease, 5(4):253-271.

Ghuran, A.; Wieken, L; Nolan, J. (2001). Cardiovascular complications of recreational drugs. British Medical Journal, 323:464-465.

Ginsberg, M; Hertzman, M; Schmidt-Nowara, W. (1970). Amphetamine intoxication with coagulopathy, hyperthermia and reversible renal failure: a syndrome resembling heatstroke. Annals of Internal Medicine, 73(1):81-85.

Givertz, M.; Colucci, W. (1998). New targets for heart-failure therapy: endothelin, inflammatory cytokines and oxidative stress. The Lancet, Supplement Heart Failure, 352(9129):34-38.

Gowing, L.; Henry-Edwards, S.; Irvine, R.; Ali, R. (2002). The health effects of ecstasy: a literature review. Drug and Alcohol Reviews, 21:53:63.

Groot, H. (1992). Isolated cells in the study of the molecular mechanisms of reperfusion injury. Toxicology Letters, 63:111-125

Harris, D.; Baggott, M.; Mendelson, J.H.; Mendelson, J.E.; Jones, R. (2002). Subjective and hormonal effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. Psychopharmacology, 162:396-405.

Hitzler, R. (2002). Pill Kick: The pursuit of "ecstasy" at techno-events. The Journal of Drug Issues, 459-465.

Hopkins, P.M.; Ellis, F.R. (1991). Evidence for related myopathies in exertional heat stroke and malignant hyperthermia. Lancet, 338(8781): 1491-1492.

Irvine, R. J.; Toop, N. P.; Phillis, B. D.; Lewanowitsch, T. (2001). The acute cardiovascular effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and p-methoxyamphetamine (PMA). Addiction Biology, 6:45-54.

Jaeschke, H. (1990). Glutathione disulphide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity: evidence for a glutathione-dependent mechanism. Toxicology and Applied Pharmacology, 118:159-168.

- Jatuporn, S.; Sangwatanaroj, S.; Saengsri, A.; Rattanapruks, S.; Srimahachota, S.; Uthaychalern, W.; Kuanoon, W.; Panpakdee, O.; Tangkijvanich, P.; Tosukhowong, P. (2003). Short-term effects of an intensive lifestyle modification program on lipid peroxidation and antioxidant systems in patients with coronary artery disease. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 29:429-436.
- Jonsson, J.; Lewander, T. (1974). Effects of the dopamine β -hydroxylase inhibitor FLA 63 on the kinetics of elimination of amphetamine in the rat. Journal of Pharmacology, 26: 907-909.
- Jurkat-Rott, K.; McCarthy, T.; Lehmann-Horn, F. (2000). Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. Muscle & Nerve, 23:4-17.
- Kalant, H. (2001). The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. Canadian Medical Association Journal, 165(7):917-928.
- Kendrick, W.; Hull, A.; Knochel, J. (1997). Rhabdomyolysis and shock after intravenous amphetamine administration. Annals of Internal Medicine, 86(4):381-387.
- Kort, W.J.; Hekking-Weijma, M.J.; TenKate, M.T.; Sorm, V.; VanStrik, R. (1998). A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. Laboratory Animals, 32:260-269.
- Kosack, J.K.; MacIntyre, D.L. (2001). Malignant Hyperthermia. Physical Therapy, 81(3):945-951.
- Kuczenski, R.; Segal, D. (1994). Neurochemistry of amphetamine. In: Amphetamine and its analogs. Eds.: Cho, A.; Segal, D., Academic Press, San Diego, pp. 81-113.
- Lane, R.; Phillips, M. (2003). Rhabdomyolysis. British Medical Journal, 327:115-116.

Lapierre, Y.; Hrdina, P. (1988). Noo-analeptiques. In : Pharmacologie clinique. Bases de la thérapeutique. Eds. Giroud, J. ; Mathé, G. ; Meyniel, G., Expansion Scientifique Française, Paris, pp. 1274-1281.

Leeuwenburgh, C.; Heinecke, J.W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. Current Medicinal Chemistry, 8:829-838.

Leichtweis, S.; Ji, L. (2001). Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. Acta Physiologica Scandinavica, 172(1):1-10.

Lester, S. J.; Baggott, B.; Welm, S.; Schiller, N. B.; Jones, R. T.; Foster, E.; Mendelson, J. (2000). Cardiovascular effects of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine. Annals of Internal Medicine, 133(12):969-973.

Liang, N.; Rutledge, C. (1982). Comparison of the release of [3H]dopamine from isolated corpus striatum by amphetamine, fenfluramine and unlabelled dopamine. Biochemical Pharmacology, 31:983-992.

Lim, P.; Cheng, Y.; Wei, Y. (2002). Increase in oxidative damage to lipids and proteins in skeletal muscle in uremic patients. Free Radical Research, 36(3):295-301.

Line, R.L.; Rust, G.S. (1995). Acute exertional rhabdomyolysis. American Family Physician, 52(2):502-506.

Lopez, J.; Rojas, B. (1995). Myoplasmic Ca²⁺ concentration during exertional rhabdomyolysis. The Lancet, 345(8947):424-426.

Louis, C.F.; Balog, E.M.; Fruen, B.R. (2001). Malignant hyperthermia: an inherit disorder of skeletal muscle Ca²⁺ regulation. Bioscience Reports, 21(2):155-168.

- Low, K.G.; Gendaszek, A.E. (2002). Illicit use of psychostimulants among college students: a preliminary study. Psychology, Health & Medicine, 7(3):283-287.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.; Farr, A.L.; Radall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193:265-275.
- Magalhães, J; Ascensão, A.; Soares, J.; Neuparth, M.; Ferreira, R.; Oliveira, J.; Amado, F.; Duarte, J. (2004). Acute and severe hypobaric hypoxia-induced muscle oxidative stress in mice: the role of glutathione against oxidative damage. European Journal of Applied Physiology, 91:185-191.
- Mak, S; Newton, G. (2001). The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. Chest, 120:2035-2046.
- Manning, V.; Best, D.; Rawaf, S.; Rowley, J.; Floyd, K.; Strang, J. (2001). Drug use in adolescence: the relationship between opportunity, initial use and continuation of use of four illicit drugs in a cohort of 14-16-year-olds in South London. Drugs: education, prevention and policy, 8(4):397-405.
- Maroco, J. (2003). Testes paramétricos para comparar populações a partir de amostras independentes in: Análise Estatística com utilização do SPSS, Robalo, M. (Ed), Edições Sílabo, Lisboa pp:109-158.
- Martinez, M.; Devenport, L.; Saussy, J.; Martinez, J. (2002). Drug-associated heat stroke. Southern Medical Journal, 95(8):799-802.
- McCoy, É.P.; Renfrew, C.; Johnston, J.R.; Lavery, G. (1994). Malignant hyperpyrexia in a MDMA ("ecstasy") abuser. The Ulster Medical Journal, 63(1):103-107.

Mechan, A.; O`Shea, E.; Elliot, J.; Green, R.; Esteban, B.; Colado, M. (2002). The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") to rats. British Journal of Pharmacology, 135:170-180.

Meis, L. (2001). Role of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase on Heat Production and Thermogenesis. Bioscience Reports, 21(2):113-137.

Melzer, W.; Dietze, B. (2001). Malignant Hyperthermia and excitation-contraction coupling. Acta Physiologica Scandinavica, 171(3):367-378.

Mezzetti, A.; Zuliani, G.; Romano, F.; Costantini, F.; Pierdomenico, S.; Cuccurullo, F.; Fellin, R. (2001). Vitamin E and lipid peroxide plasma levels predict the risk of cardiovascular events in a group of healthy very old people. Journal of American Geriatrics Society, 49:533-537.

Miller, D.; O`Callaghan, J. (1995). The role of temperature, stress and other factors in the neurotoxicity of the substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine and fenfluramine. Molecular Neurobiology, 11:177-192.

Moffat, A. (Ed.) (1986). Clarke`s isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. The Pharmaceutical Press, pp. 349-350.

Murray, J.B. (1998). Psychophysiological aspects of Amphetamine-Methamphetamine abuse. The Journal of Psychology, 132 (2):227-237.

Nelson, T.E. (2001). Heat production during anesthetic-induced malignant hyperthermia. Bioscience Reports, 21(2):169-179.

NG, Y-T; Johnston, HM (2000). Clinical Rhabdomyolysis. Journal Paediatric Child Health, 36:397-400.

- Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. Journal of Sport Sciences, 15:353-363.
- Palazzetti, S.; Richard, M.; Favier, A.; Margaritis, I. (2003). Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. Canadian Journal of Applied Physiology, 28 (4):588-604.
- Pedersen, W.; Wichstrøm, L. (2001). Adolescents, doping agents, and drug use: a community study. Journal of Drug Issues, 31(2):517-542.
- Pereira, J. (1994). Exercícios Físicos Inabituais e Exaustivos em Crianças: Influência do Tipo Predominante de Contrações em Indicadores Indirectos de Stress Oxidativo e de Agressão/Lesão Muscular Esquelética. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física. Universidade do Porto.
- Phillis, B.; Ong, J.; White, J; Bonielle, C. (2001). Modification of d-amphetamine-induced responses by baclofen in rats. Psychopharmacology, 153:277-284.
- Pickering, H.; Stimson, G. (1994). Prevalence and demographic factors of stimulant use. Addiction, 89:1385-1389.
- Poulsen, H.; Loft, S., Vistisen, K. (1996). Extreme exercise and oxidative DNA modification. Journal of Sports Sciences, 14:343-346.
- Powers, S.; Howley, E. (Eds) (2000). Regulação da Temperatura in: Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho (3ª edição), Editora Manole Ltda., São Paulo, pp:215-227.
- Ratliff, N.B.; Harris, K.M.; Smith, S.A.; Tankh-Johnson, M.; Gornick, C.C.; Maron, B. J. (2002). Cardiac arrest in a young marathon runner. The Lancet, 360:542.

Reuter, J.D.; Dysko, R.C.; Chrisp, C.E. (1998). Review of exertional rhabdomyolysis and a case in a rhesus monkey (macaca mulatta). Journal of Medical Primatology, 27:303-309.

Riffée, W.; Ludden, T.; Wilcox, R.; Gerald, M. (1978). Brain and plasma concentrations of amphetamine isomers in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 206:586-594.

Royo-Borbonada, M.A.; Cid-Ruzafa, J.; Martín-Moreno, J.M.; Gualtar, E. (1997). Drug and alcohol use in Spain: consumption habits, attitudes and opinions. Public Health, 111:277-284.

Rupert, S.A. (2002). Pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis. Journal of the American Academy of Nurse practitioners, 14(2):82-87.

Saadat, K.; Elliot, J.; Colado, M.; Green, A. (2003). Hyperthermic and neurotoxic effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in guinea pigs. Psychopharmacology, published online www.springerlink.com

Schippinger, G.; Wonisch, W.; Abuja, P.M.; Fankhauser, F.; Winklhofer-Roob, B.M.; Halwachs, G. (2002). Lipid peroxidation and antioxidant status in professional American football players during competition. European Journal of Clinical Investigation, 32:682-692.

Schwartz, R. H.; Miller, N. S. (1997). MDMA (Ecstasy) and the rave: a review. Pediatrics, 100(4):705-708.

Seeman, P.; Madras, B.K. (1998). Mechanisms of drug action. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. Molecular Psychiatry, 3:386-396.

Seiden, L.; Sabol, K.; Ricaurte, G. (1993). Amphetamine effects on catecholamine systems and behaviour. Annual Review of Toxicology, 32:639-677

Shankaran, M.; Yamamoto, B.; Gudelsky, G. (2001). Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) - induced hydroxyl radical formation and the behavioural and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT. SYNAPSE, 40:55-64.

Shen, W.; Kamendulis, L.; Ray, S.; Corcoran, G. (1991). Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: correlation of nuclear Ca²⁺ accumulation and early DNA fragmentation with cell death. Toxicology and Applied Pharmacology, 111: 242-254.

Shen, W.; Kamendulis, L.; Ray, S.; Corcoran, G. (1992). Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: correlation of nuclear Ca²⁺ endonuclease, DNA repair and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation cell death. Toxicology and Applied Pharmacology, 112: 32-40.

Shields, R. (1990). Amphetamines. In: Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. 2nd Ed. Eds.; Haddad, L.; Winchester, J. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 771-780.

Spielwog, C.; Biala, G.; Roubert, C.; Hamon, M.; Betancur, C.; Giros, B. (2001). Hypolocomotor effects of acute daily d-amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. Psychopharmacology, 159:2-9.

Sue, Y.; Lee, Y.; Huang, J. (2002). Acute hyponatremia, seizure and rhabdomyolysis after ecstasy use. Journal of Toxicology, Clinical Toxicology, 40(7):931-932.

Tan, W.; Herzlich, B. (1995). Rhabdomyolysis and myoglobinuric acute renal failure associated with classic heat stroke. Southern Medical Journal, 88(10):1065-1068.

Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Annals of Biochemistry, 27:502-522.

Traub, S.; Hoffman, R.; Nelson, L. (2002). The "ecstasy" hangover: hyponatremia due to 3,4-methylenedioxymetamphetamine. Journal of Urban Health, 79(4):549-555.

Urcelay, E.; Butta, N.; Manchón, C.; Ciprés, G. (1993). Role of protein kinase-C in the α 1-adrenoreceptor-mediated responses of reperfused rat liver. Endocrinology, 133: 2105-2115.

Vaziri, N.D.; Lin, C.; Farmand, F.; Sindhu, R.K. (2003). Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. Kidney International, 63:186-194.

Venditti, P.; Masullo, P.; Di Meo, S. (1999). Protection against ischaemia-reperfusion induced oxidative stress by vitamin E treatment. Archives of Physiology and Biochemistry, 107(1):27-34.

Verheyden, S. L.; Hadfield, J.; Calin, T.; Curran, H. V. (2002). Sub-acute effects of MDMA (\pm 3,4-methylenedioxymethamphetamine, "ecstasy") on mood: evidence of gender differences. Psychopharmacology, 161:23-31.

Viña, J.; Lloret, A; Sastre, J.; Marquez, R.; Pallardó, F. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production and protection by antioxidants. Life, 50:271-277.

Vree, T.; Henderson, P. (1980). Pharmokinetics of amphetamines: in vivo and in vitro studies of factors governing their elimination. In: Amphetamines and Related Stimulants: Chemical, Biological, Clinical and Sociological Aspects. Ed.: Caldwell, J. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida

Walters, S.T.; Foy, B.D.; Castro, R.J. (2002). The agony of ecstasy: responding to growing MDMA use among college students. Journal of American College Health, 51:139-141.

Walubo, A.; Seger, D. (1999). Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, 'Ecstasy': case report and review of the literature. Human & Experimental Toxicology, 18:119-125.

Wolf, M.; Xue, C.; Li, Y.; Wavak, D. (2000). Amphetamine increases glutamate efflux in the rat ventral tegmental area by a mechanism involving glutamate transporters and reactive oxygen species. Journal of Neurochemistry, 75(4):1634-1644.

Yuan, J.; Cord, B. J.; McCann, U. D.; Callahan, B. T.; Ricaurte, G. A. (2002) Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. Journal of Neurochemistry, 80:960-969.

Zaczec, R.; Culp, S.; De Souza, E. (1991). Interactions of [3H] amphetamine with rat brain synaptosomes. II. Active transport. Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics, 257: 830-835.

Zheng, Y.; Laverty, R. (1998). Role of brain nitric oxide in (\pm) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) - induced neurotoxicity in rats. Brain research, 795:257-263.

Zhang, L.; Zhou, J.; Zhou, Y.; Chen, H.; Cai, D. (2003). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) abuse markedly inhibits acetylcholinesterase activity and induces severe oxidative damage and liperoxidative damage. Biomedical and Environmental Sciences, 16:53-61.

Zhou, J.F.; Chen, P.; Zhou, Y.H.; Zhang, L.; Chen, H.H. (2003). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) abuse may cause oxidative stress and potential free radical damage. Free Radical Research, 37(5):491-497.

