

Poema à Mãe

*No mais fundo de ti,
eu sei que traí, mãe*

*Tudo porque já não sou
o retrato adormecido
no fundo dos teus olhos.*

*Tudo porque tu ignoras
que há leitões onde o frio não se demora
e noites rumorosas de águas matinais.*

*Por isso, às vezes, as palavras que te digo
são duras, mãe,
e o nosso amor é infeliz.*

*Tudo porque perdi as rosas brancas
que apertava junto ao coração
no retrato da moldura.*

*Se soubesses como ainda amo as rosas,
talvez não enchesses as horas de pesadelos.*

*Mas tu esqueceste muita coisa;
esqueceste que as minhas pernas cresceram,
que todo o meu corpo cresceu,
e até o meu coração
ficou enorme, mãe!*

*Olha — queres ouvir-me? —
às vezes ainda sou o menino
que adormeceu nos teus olhos;*

*ainda aperto contra o coração
rosas tão brancas
como as que tens na moldura;*

*ainda oiço a tua voz:
Era uma vez uma princesa
no meio de um laranjal...*

*Mas — tu sabes — a noite é enorme,
e todo o meu corpo cresceu.
Eu saí da moldura,
dei às aves os meus olhos a beber,*

*Não me esqueci de nada, mãe.
Guardo a tua voz dentro de mim.
E deixo-te as rosas.*

Boa noite. Eu vou com as aves.

Eugénio de Andrade

Agradecimentos

Gostaria de dedicar este espaço a todas as pessoas que de algum modo me acompanharam e ajudaram ao longo da minha vida académica e pessoal. Que me proporcionaram todo o apoio moral, força e condições para a execução deste trabalho e escrita desta teste. Um muito obrigado.

À Professora Doutora Sónia Santos, docente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientadora desta tese de mestrado. Por todos os conhecimentos transmitidos, pela paciência e pelos bons momentos partilhados durante três anos. Por me ter ajudado a crescer enquanto pessoa e aluna, por sempre ter acreditado em mim e por toda a sua amizade.

Ao Professor Doutor Frederico Pereira, docente da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, co-orientador desta tese de mestrado. O meu Obrigada pela oportunidade de participar neste projecto de investigação, pela orientação, pela disponibilidade e pela compreensão demonstradas.

Ao Professor Doutor Carlos Fontes Ribeiro, Director do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, o meu obrigada pela oportunidade de participar neste projecto de investigação e por proporcionado todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Ângelo Tomé, docente da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e orientador interno desta dissertação de mestrado, agradeço a orientação prestada, a consideração e a ajuda demonstradas durante todo o meu percurso académico.

À Professora Doutora Lina Carvalho, Directora do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e suas colaboradoras pela disponibilidade demonstrada.

À Alda Henriques, por toda a ajuda que me deu no laboratório e pela paciência em me ensinar, pelos bons momentos passados no laboratório e também na minha vida académica.

À Marta Castanheira e à Ana Lúcia Silva pelos bons momentos passados no laboratório.

À Sandra Amaral e à Mafalda Chicória com quem pude sempre contar, apesar da distância. Por todos os bons e maus momentos passados juntas ao longo destes últimos dez anos e sobre tudo pela amizade e confiança.

Ao Pedro Gonçalves, ao Luís Mendes, à Cátia Melo, à Sónia Costa, ao Pedro Curto, à Ana Pratas, colegas de curso e também amigos, com quem passei a minha vida académica, cresci, chorei, sorri e aprendi.

Não poderia deixar de agradecer ao Tiago, que conheço desde sempre e que nunca disse que não a um jantar no chinês e às arepas.

Ao Henrique Pires e ao Rafael Fernando por terem aturado o meu mau feitio em dias mais complicados e pela amizade.

Ao André Carvalho que nunca deixou de acreditar em mim, que me deu todo o apoio e sempre me incentivou a fazer mais e melhor. Obrigada pela tua paciência, pelo teu amor e dedicação.

Queria também agradecer ao João Rodrigues, um amigo muito especial que contagiava toda a gente com o seu sorriso e optimismo. Nunca te esquecerei.

A toda a minha família, especialmente às minhas Avós, à minha Tia Glória e ao meu Primo Hugo. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

Um obrigada muito especial aos meus Pais que sempre se esforçaram para me dar a melhor educação possível e com quem pude sempre contar. Obrigada por-me terem proporcionado a melhor vida possível, por todo o vosso amor e dedicação.

E por último, gostaria de agradecer do fundo do coração ao meu Avô Emídio. Nunca esquecerei o teu sorriso. Foste e sempre serás, para mim, um exemplo de bondade, integridade, generosidade e honestidade.

Um grande obrigada a todos.

Dedico esta tese aos meus Pais, a quem tudo devo.

ÍNDICE

Índice de Figuras	IV
Índice de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas	XI
Resumo	XV
Abstract	XVIII
Capítulo 1 – Introdução	1
1. Aminas Biogénicas e Aminas Vestigiais	2
1.1 Síntese, Metabolismo e Armazenamento das Aminas Vestigiais	4
1.2 Acções Biológicas das Aminas Vestigiais	5
1.3 <i>Trace Amine Associated Receptors</i> (TAAR)	8
1.3.1 Caracterização Bioquímica e Farmacológica do <i>Trace Amine-Associated Receptor 1</i>	8
2. Anfetamina	10
2.1 Caracterização Geral	10
2.2 Metabolismo da Anfetamina	12
2.3 Consumo: Recreativo <i>Versus</i> Terapêutico	14
2.3.1 Efeitos Associados à Toma de Anfetamina	15
2.4 Farmacodinamia da Anfetamina: Mecanismos de Acção	16
2.4.1 A Anfetamina e o Sistema Nervoso Central	16
2.4.2 O Sistema Nervoso Periférico e a Anfetamina	19
2.4.3 Factores que Afectam os Efeitos Estimulantes/Tóxicos da Anfetamina	19
2.5 <i>Trace Amine-Associated Receptor 1</i> e a Anfetamina	20
3. Sistema Gastrointestinal	21
3.1 Estrutura da Parede Intestinal	22
3.2 Contração do Músculo Liso Intestinal	23
3.2.1 Mecanismo Subjacente à Contração do Músculo Liso Intestinal	25
3.2.2 Mecanismo Subjacente ao Relaxamento do Músculo Liso Intestinal	26
3.2.3 Contração Tónica <i>versus</i> Contração Fásica	27
3.3 Regulação da Motilidade Intestinal	28
3.3.1 A Acetilcolina e o Sistema Gastrointestinal	29
3.3.2 A Histamina no Sistema Gastrointestinal	31

3.4 A Serotonina no Sistema Gastrointestinal	33
3.4.1 As Células Enterocromafins	38
3.5 A Anfetamina e as <i>Trace Amines</i> no Sistema Gastrointestinal	39
Capítulo 2 – Objectivos	42
Capítulo 3 – Material e Métodos	44
1. Modelo Animal	45
2. Isolamento e Montagem do Órgão	45
3. Protocolo Experimental – Estudos Funcionais	46
4. Análise Estatística dos Resultados dos Estudos Funcionais	48
5. Fármacos e Reagentes Utilizados nos Estudos Funcionais	48
6. Protocolo Experimental – Estudos <i>In Vivo</i>	48
6.1 Grupos de Estudo	49
6.2 Protocolo Experimental – Estudo Comportamental e Estudo Funcional	49
7. Protocolo Experimental – Técnicas de Histologia e Imunohistoquímica	50
7.1 Micro-anatomia dos Segmentos de Íleo de Rato Wistar	50
7.2 Localização Celular dos Receptores 5-HT _{2A} e 5-HT _{2B} em Segmentos de Íleo de Rato Wistar	50
8. Materiais e Reagentes Utilizados nos Estudos Histológicos e Imunohistoquímicos	51
9. Protocolo Experimental – Determinação dos Níveis de Catecolaminas no Estriado de Rato Wistar por HPLC de Fase Reversa com Detecção Electroquímica	51
9.1 Preparação das Amostras de Efluxo para a Determinação de Catecolaminas por HPLC	52
9.2 Condições Cromatográficas	53
9.3 Quantificação da Proteína através do Método BCA	54
Capítulo 4 – Resultados	55
1. Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à Anfetamina e à Tiramina	56
2. Efeito da Atropina e da Mepiramina na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à Anfetamina	56
3. Efeito da Reserpina na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à Anfetamina	57
4. Efeito da Fluoxetina na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à Anfetamina	58

5. Contributo dos Receptores de 5-HT na Resposta Contráctil do Íleo de Rato à Anfetamina	59
5.1 Efeitos da Ritanserina e da Prazosina na Resposta Contráctil do Íleo de Rato à Anfetamina	59
5.2 Efeitos da Cetanserina e do RS 127445 na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à Anfetamina	61
6. Efeito do EPPTB na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à Anfetamina e à Tiramina	64
7. Efeito da Ritanserina na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à 5-HT	67
8. Efeito do RS 127455 na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à 5-HT	67
9. Efeito da Cetanserina e do RS 127445 na Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à 5-HT	69
10. Estudos Histológicos e Imunohistoquímicos dos Segmentos de Íleo de Rato Wistar	70
10.1 Micro-Anatomia dos Segmentos de Íleo de Rato	72
10.2 Localização Celular dos Receptores 5-HT _{2A} e 5-HT _{2B} em Segmentos de Íleo de Rato Wistar	72
11. Estudos <i>In Vivo</i> – a Influência da Anfetamina no Comportamento Animal e na Fisiologia Gastrointestinal	73
11.1 Influência da Anfetamina no Comportamento de Ratos Wistar	73
11.2 Monitorização da Temperatura	74
11.3 Alterações Macroscópicas Observadas na Anatomia do Tracto Gastrointestinal de Rato 24 Horas após Administração <i>In Vivo</i> de 15 mg/Kg de Anfetamina	75
11.4 Resposta Contráctil do Íleo Isolado de Rato à Anfetamina e à 5-HT 24 Horas após Administração <i>In Vivo</i> de 15 mg/Kg de Anfetamina	77
11.5 Níveis Estriatais Totais de DA e dos seus Metabolitos (DOPAC e HVA)	80
11.5.1 <i>Turnover</i> Total da DA (DOPAC+HVA/DA), Intracelular (DOPAC/DA) e Extracelular (HVA/DA)	82
11.6 Níveis Estriatais Totais de 5-HT e do seu Metabolito 5-HIAA	83
Capítulo 5 – Discussão	84
Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas Futuras	93
Capítulo 7 – Bibliografia	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Estrutura química das aminas biogénicas clássicas (adaptado de Zucchi <i>et al.</i> , 2006)	2
Figura 2	Estrutura química dos compostos conhecidos como aminas vestigiais (adaptado de Zucchi <i>et al.</i> , 2006)	3
Figura 3	Via sintética e metabólica de aminas vestigiais endógenas e exógenas (retirado de Broadley, 2010)	5
Figura 4	Estrutura química do antagonista selectivo do TAAR1, EPPTB (retirado de Bradaia <i>et al.</i> , 2009)	10
Figura 5	Estrutura química da anfetamina e seus análogos mais comuns (adaptado de Broadley, 2010)	11
Figura 6	Via metabólica da anfetamina. II desaminação oxidativa; III hidroxilação aromática; IV hidroxilação alifática; V O-metilação; VI conjugação da glicina (retirado de Carvalho <i>et al.</i> , 2012)	13
Figura 7	Mecanismo clássico da anfetamina no SNC (adaptado de Katzung, 2007)	18
Figura 8	Estrutura da secção longitudinal da parede gastrointestinal (retirado de Vander <i>et al.</i> , 2003)	23
Figura 9	Organização dos filamentos de actina e miosina nas células do músculo liso em estado de relaxamento (a) e de contracção (b) (retirado de Sherwood, 2008)	24
Figura 10	Regulação da contracção do músculo liso (adaptado de Webb, 2003)	26
Figura 11	Regulação do relaxamento do músculo liso (retirado de Webb, 2003)	27
Figura 12	Modelo do receptor acoplado à proteína G, activado por TA, substâncias odorantes e gustantes que medeia a secreção das células EC (retirado de Kidd <i>et al.</i> , 2008)	41

Capítulo 3

Figura 13	Segmentos de íleo montados em banho de órgãos de 15 mL	45
------------------	--	----

Figura 14	Registos de uma curva não cumulativa concentração-resposta à anfetamina em íleo isolado de rato. Escala: 10 mm = 3,9 mN; 40 segundos	47
Figura 15	Sistema de HPLC utilizado na quantificação de monoaminas	52
Figura 16	Cromatograma representativo da amostra do padrão total 50 ng/mL contendo DA, DOPAC, 5-HIAA, HVA e 5-HT	53
 Capítulo 4		
Figura 17	Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 1 μM de atropina (▼) e na presença de mepiramina 1 μM (○); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.	57
Figura 18	Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 μM de reserpina (□); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste <i>t</i> de <i>Student</i> . * $p < 0,05$ vs controlo.	58
Figura 19	Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μM de fluoxetina (△); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste <i>t</i> de <i>Student</i> . * $p < 0,05$ vs controlo.	59
Figura 20	Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 1 μM de ritanserina (■), de 10 μM de prazosina (×) e na presença em simultâneo de 1 μM de ritanserina e 10 μM de prazosina (▽); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de <i>Tukey</i> . * $p < 0,05$, prazosina vs controlo; ** $p < 0,05$, ritanserina + prazosina vs controlo ou prazosina; # $p < 0,05$ ritanserina vs controlo ou prazosina.	61
Figura 21	Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 0,25 μM de RS 127445 (◇) ou na presença de 0,05 μM de RS 127445 (◇); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.	62
Figura 22	Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 0,05 μM de RS127445 (◇) ou na presença de 1 μM de cetanserina (▲); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.	63

- Figura 23** Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 1 μ M de EPPTB (◆) ou na presença de 5 μ M de EPPTB (◆); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*. * $p < 0,05$ vs controlo. 65
- Figura 24** Resposta contráctil do íleo isolado de rato à tiramina na ausência (●, controlo) e na presença de 5 μ M de EPPTB (◆); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 66
- Figura 25** Resposta contráctil do íleo isolado de rato à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de ritanserina (■); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 67
- Figura 26** Resposta contráctil do íleo isolado de rato à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 0,05 μ M de RS 127445 (◇) ou na presença de 0,25 μ M RS 127445 (◇); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$ vs controlo. 68
- Figura 27** Resposta contráctil do íleo isolado de rato à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 0,05 μ M de RS 127445 (◇) ou na presença de 1 μ M de cetanserina (▲); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$ vs controlo. 70
- Figura 28** Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 8-10 semanas. H/E X400. Visualização das camadas e músculo liso longitudinal (1) e circular (2) e dos plexos mientérico (3) e submucoso (4). 72
- Figura 29** Fundo de estômago de rato Wistar macho 8-10 semanas (A) e artéria uterina humana (B). Técnica de imunohistoquímica: imunoreactividade ao receptor 5-HT_{2B} X400 (A) e 5-HT_{2A} X200 (B), na camada basal e em células musculares lisas vasculares, respectivamente. 72

- Figura 30** Íleo de rato Wistar macho de 8-10 semanas. (A) H/E X400; (B) Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{2B} X400 presente nas células ganglionares situadas no plexo mientérico e submucoso da parede intestinal. 73
- Figura 31** Íleo de rato Wistar macho de 8-10 semanas. (A) H/E X400; (B) Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{2A} X400 presente nas células ganglionares situadas no plexo mientérico e submucoso da parede intestinal. 73
- Figura 32** Diferença de temperatura (relativamente à temperatura antes da injeção t=0) em relação ao tempo em minutos dos ratos controlo (●) e dos ratos sujeitos a 15 mg/Kg com anfetamina (●); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo. 75
- Figura 33** Alterações macroscópicas observadas entre os diferentes grupos de ratos em estudo. Diferenças relativamente ao rato anfetamina (A) e ao rato controlo (B) no cego; mesentério do rato anfetamina (C) vs mesentério do rato controlo (D); íleo do rato anfetamina (E) com pormenor da vasoconstrição (E*) e íleo do rato controlo (F); estômago do rato anfetamina (G). 76
- Figura 34** Respostas contráteis à anfetamina dos íleos isolados de ratos controlo (●, n=23) e de ratos submetidos a anfetamina (●, n=24); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo 78
- Figura 35** Respostas contráteis à anfetamina dos íleos isolados de ratos controlo (●, n=23) e de ratos submetidos a anfetamina (●, n=24) à anfetamina; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M. 78
- Figura 36** Respostas contráteis à 5-HT dos íleos isolados de ratos controlo (●, n=23) e de ratos submetidos a anfetamina (●, n=24); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.. 79
- Figura 37** Respostas contráteis à 5-HT dos íleos isolados de ratos controlo (●, n=23) e de ratos submetidos à anfetamina (●, n=24); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo 80

Figura 38 Efeito da administração de anfetamina (n=5) (15 mg/Kg) nos níveis estriatais, totais de DA (A) e dos seus metabolitos, DOPAC (B) e HVA (C); os animais controlo (n=5) foram injectados com NaCl 0,9%; os animais foram sacrificados 24 horas após a administração; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ vs controlo 81

Figura 39 Efeito da administração de anfetamina (n=5) (15 mg/Kg) no *turnover* da dopamina (DOPAC+HVA/DA) (A), no *turnover* da dopamina intracelular (DOPAC/DA) (B) e no *turnover* da dopamina extracelular (HVA/DA) (C); os animais controlo (n=5) foram injectados com NaCl 0,9%; os animais foram sacrificados 24 horas após a administração; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M. 82

Figura 40 Efeito da administração de anfetamina (n=5) (15 mg/Kg) nos níveis estriatais, totais de 5-HT (A) e do seu metabolito 5-HIAA (B); os animais controlo (n=5) foram injectados com NaCl 0,9%; os animais foram sacrificados 24 horas após a administração; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M. 83

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela I	Classificação e caracterização dos receptores muscarínicos	31
Tabela II	Classificação e caracterização dos receptores de histamina	32
Tabela III	Classificação e caracterização dos receptores de 5-hidroxitriptamina	34

Capítulo 3

Tabela IV	Tempos de retenção, em minutos	53
------------------	--------------------------------	----

Capítulo 4

Tabela V	Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina e à tiramina.	56
Tabela VI	Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina na ausência, na presença de 0,05 μM de RS 127445 e na presença de 0,25 μM de RS 127445.	62
Tabela VII	Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina na ausência e na presença de 0,05 μM de RS127445 ou na presença de 1 μM de cetanserina.	64
Tabela VIII	Resposta contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina na ausência e na presença de 1 μM de EPPTB ou na presença de 5 μM de EPPTB.	65
Tabela IX	Resposta contrácteis de segmentos de íleo de rato à tiramina na ausência e na presença de 5 μM de EPPTB.	66
Tabela X	Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à 5-HT na ausência e na presença de 0,05 μM de RS 127445 ou na presença de 0,25 μM de RS 127445.	69
Tabela XI	Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à 5-HT na ausência e na presença de 0,05 μM de RS127445 ou na presença de 1 μM de cetanserina.	70

Tabela XII Respostas contrácteis à anfetamina de segmentos de íleo de ratos controlo e de ratos injectados com anfetamina. 79

Tabela XIII Respostas contrácteis à 5-HT de segmentos de íleo de ratos controlo e de ratos injectados com anfetamina. 80

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina
AADC	<i>aromatic L-amino acid decarboxylase</i>
ACh	acetilcolina
ADHD	<i>Attention Deficit and Hyperactivity Disorder</i>
AMPc	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
APUD	<i>Amine Precursor Uptake and Decarboxylation</i>
ATP	adenosina trifosfato
BCA	ácido bicinconínico
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca ²⁺	ião cálcio
CIC	células intersticiais de Cajal
CoA	acetil-co-enzima A
CR	concentração-resposta
DA	dopamina
DAB	diaminobenzidina

DAG	diacilglicerol
DAT	transportador de dopamina
DBH	<i>dopamine-β-hydroxylase</i>
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxiifenilacético
EC	enterocromafins
EC-like	enterocromafins-like
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
E _{máx}	efeito máximo
EPPTB	<i>N-(3-ethoxy-phenyl)-4-pyrrolidin-1-yl-3-trifluoromethyl-benzamide</i>
GI	gastrointestinal
GPCRs	<i>G Protein-Coupled Receptors</i>
HE	hematoxilina/eosina
HVA	ácido homovanílico
i.p.	intraperitoneal
IP3	inositol trifosfato
IPANs	<i>intrinsic primary afferent neurons</i>
IUPHAR	<i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>
K ⁺	ião potássio

Log	logarítmo
MAO	monoamina oxidase
MDMA	metilenedioximetanfetamina
Mg ²⁺	ião magnésio
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i>
mN	miliNewton
n	número de experiências
NA	noradrenalina
Na ⁺	ião sódio
NET	transportador de noradrenalina
NO	óxido nítrico
PBS	tampão salino de fosfato
pEC ₅₀	logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da resposta máxima
PIP2	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>

pKi	logarítmo negativo da concentração molar de um ligando num ensaio de competição que ocuparia 50% dos receptores na ausência do ligando
REM	<i>rapid eye movement</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNA	mRNA mensageiro
ROS	espécies reactivas de oxigénio
S.E.M.	<i>Standard Error of the Mean</i>
SERT	transportador de 5-HT
SNC	sistema nervoso central
SNE	sistema nervoso entérico
SNP	sistema nervoso periférico
TA	<i>trace amines</i>
TAAR	<i>trace amine-associated receptor</i>
VIP	<i>vasoactive intestinal polipeptide</i>
VMAT	<i>vesicular monoamine transporter</i>
β-PEA	<i>β-phenylethylamine</i>

RESUMO

O abuso da anfetamina está associado a graves efeitos neurológicos, psiquiátricos e cardiovasculares. No entanto, os efeitos no altamente inervado tracto gastrointestinal são imprevisíveis. A anfetamina está estrutural e funcionalmente relacionada com as aminas vestigiais *para*-tiramina. As aminas vestigiais e as anfetaminas têm a habilidade de inibir a libertação extracelular de transmissores e/ou estimular o efluxo de transmissores a partir de reservas intracelulares, incluindo a 5-hidroxitriptamina (5-HT). Foi recentemente descrito que as anfetaminas e as aminas vestigiais são agonistas potentes de um novo receptor acoplado à proteína G, que estimula a produção de AMPc, o *trace amine-associated receptor 1* (TAAR1). Foi também sugerido que alguns dos efeitos da anfetamina possam ser mediados, em parte, por esse receptor. De forma a entender o mecanismo envolvido nos efeitos adversos da anfetamina a nível gastrointestinal, o objectivo deste trabalho foi caracterizar farmacologicamente o receptor que medeia a resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina.

Ratos Wistar machos foram sacrificados e o íleo removido e preparado para contracções isométricas de curvas concentração-resposta (CR) de adições independentes à 5-HT (0,1 μ M – 60 μ M), à tiramina e à anfetamina (1 μ M – 6000 μ M). Após a adição de 100 μ M de acetilcolina (de forma a comparar os resultados), antagonistas de diferentes receptores foram adicionados ao banho de órgãos 15 minutos antes de cada dose da curva CR. Em todas as experiências foram utilizados segmentos controlo, aos quais se adicionou apenas o solvente apropriado para cada composto. Os segmentos de íleo foram também utilizados para cortes histológicos e técnicas de imunohistoquímica de forma a estudar a imunoreactividade de subtipos de receptores 5-HT. Foram ainda realizados estudos *in vivo* com o intuito de estudar o comportamento do rato após a administração de anfetamina e a sua neurotoxicidade e as possíveis consequências de tal administração na função intestinal, isto é, na resposta contráctil do íleo isolado de rato. Para tal, foi administrado 15 mg/Kg de solução salina de anfetamina aos animais ensaio e solução salina aos animais controlo. A administração foi via intraperitoneal. O comportamento assim como a temperatura foram registadas. Os animais foram sacrificados 24 horas após a administração e recolheu-se estriado, para quantificação dos níveis de monoaminas, e íleo, para estudos funcionais e imunohistoquímicos. Os estudos funcionais consistiram

na realização de curvas CR de adições independentes à anfetamina e à 5-HT na ausência de qualquer antagonista. As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste *t* de *Student* e ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnnett* ou *Tukey*.

Tanto a anfetamina como a tiramina induziram contracções dependentes da concentração no íleo de rato com idêntica actividade intrínseca e potência (anfetamina: $E_{m\acute{a}x}$ de $10,51 \pm 1,35$ mN; pEC_{50} de $4,64 \pm 0,19$, $n=25$; tiramina: $E_{m\acute{a}x}$ de $11,54 \pm 1,65$ mN; pEC_{50} de $4,09 \pm 0,32$, $n=13$). As curvas CR à anfetamina não foram significativamente alteradas pela atropina ($1 \mu\text{M}$) ou mepiramina ($1 \mu\text{M}$), excluindo o envolvimento de receptores muscarínicos e da histamina H_1 . No entanto, a cetanserina ($1 \mu\text{M}$), um antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C} e o RS 127445 ($0,05 \mu\text{M}$), um antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2B}, alteraram de forma significativa a curva CR à anfetamina. De facto, a ritanserina ($1 \mu\text{M}$), um antagonista não selectivo dos receptores 5-HT_{2A/2B/2C}, aboliu completamente a contracção intestinal induzida pela anfetamina, apontando para o envolvimento da 5-HT₂ no efeito provocado pela anfetamina. Alterações semelhantes e significativas foram, igualmente, observadas nas curvas CR à 5-HT na presença de cetanserina, RS 127445 e ritanserina. Além disso, os estudos imunohistoquímicos revelaram imunoreactividade para os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B} nas células ganglionares do plexo mientérico e submucoso, mas não nas células musculares lisas das camadas longitudinal e circular. Além disso, o recentemente descrito antagonista selectivo do TAAR1, N-(3-etoxi-fenil)-4-pirrolidin-1-il-3-trifluorometil-benzamida (EPPTB), $5 \mu\text{M}$, alterou significativamente (com redução do $E_{m\acute{a}x}$) as curvas CR à anfetamina e à tiramina, sugerindo igualmente o recrutamento do TAAR1. Uma vez que a reserpina ($100 \mu\text{M}$) aboliu completamente a contracção intestinal induzida pela anfetamina, e que cerca de 90% da 5-HT é sintetizada, armazenada e libertada essencialmente por células enterocromafins no intestino, propomos que a anfetamina possa desencadear a libertação de monoaminas a partir das células enterocromafins, embora mais estudos serão necessário para provar, definitivamente o envolvimento do TAAR1 através da sua localização celular. Relativamente aos estudos funcionais realizados com os íleos dos ratos controlo e sujeitos a 15 mg/Kg de anfetamina, não foram observadas alterações estatisticamente significativas nas curvas CR à anfetamina e à 5-HT, demonstrando não haver alterações relevantes na função intestinal. Os ratos que foram administrados com anfetamina ficaram hipertérmicos durante cerca de 90 minutos e mostraram

comportamentos estereotipados. Relativamente à quantificação dos níveis de monoaminas, só a dopamina diminui de forma significativa, demonstrando alguma neurotoxicidade nos ratos sujeito ao fármaco após 24 horas.

Em conclusão, este estudo demonstra, pela primeira vez, que tanto a 5-HT como os *trace amine-associated receptors* contribuem para a resposta contráctil do íleo de rato à anfetamina.

Palavras-chave: anfetamina; íleo isolado de rato; contracção; 5-HT; TAAR1.

ABSTRACT

Amphetamine (AMPH) misuse is associated with serious neurologic, psychiatric and cardiovascular adverse effects. However, its effects on the highly innervated gastrointestinal tract are unpredictable. AMPH is structurally and functionally related to the trace amine para-tyramine. Trace amines and amphetamines have the ability to inhibit the clearance of extracellular transmitter and/or stimulate the efflux of transmitter from intracellular stores, including 5-hydroxytryptamine (5-HT). It was recently reported that amphetamines and trace amines are potent agonists of a novel G protein-coupled receptor that stimulates the production of cAMP, the trace-amine-associated receptor 1 (TAAR1). It was also suggested that some effects of amphetamines may be mediated in part by this receptor. In order to further understand the mechanism involved in the gastrointestinal adverse effects of AMPH, the aim of this study was to characterize pharmacologically the receptor mediating the contractile response of the rat isolated ileum to AMPH.

Male Wistar rats were sacrificed and the ileum was removed and prepared for isometric contractile concentration-response (CR) curves (not cumulative) for AMPH, tyramine (1 μM – 6000 μM) and 5-HT (0.1 μM – 60 μM). After 100 μM acetylcholine (in order to compare the results), antagonists of different receptors were added to the organ bath 15 min before each dose of the CR curve. In each assay, control segments were used with the appropriate solvent of each drug. Ileum segments were also used for histological section and immunohistochemical techniques to study the immunoreactivities of 5-HT receptors subtypes. Studies have been conducted *in vivo* in order to study the behavior of rats and AMPH neurotoxicity after administration of AMPH, and also the possible consequences of such administration in the intestinal function (contractile response of rat ileum). A group of rats were injected intraperitoneally with 15 mg/Kg of AMPH and the control group of rats were injected with a saline solution. The behavior and the temperature were recorded. The animals were sacrificed 24 hours after the administration and the striatum was collected to quantify monoamines levels. The ileum was also collected for functional and immunohistochemical studies. The ileum was prepared for isometric contractile CR curves (not cumulative) for AMPH and 5-HT in the absence of antagonists. Statistical differences were evaluated by *Student's t* test and ANOVA with *Dunnett's* or *Tukey's* multiple comparison test.

Both AMPH and tyramine caused concentration-dependent ileum contractions with similar intrinsic activity and potency (AMPH: E_{max} of 10.51 ± 1.35 mN; pEC_{50} of 4.64 ± 0.19 , $n=25$; tyramine: E_{max} of 11.54 ± 1.65 mN; pEC_{50} of 4.09 ± 0.32 , $n=13$). AMPH CR curves were not significantly altered by atropine ($1 \mu\text{M}$), or mepyramine ($1 \mu\text{M}$) excluding the involvement of muscarinic and H_1 histamine receptors on AMPH effect. However, ketanserin ($1 \mu\text{M}$) a $5\text{-HT}_{2A/2C}$ antagonist and RS 127445 ($0.05 \mu\text{M}$), a selective 5-HT_{2B} antagonist, changed the AMPH CR curve. In fact, ritanserin ($1 \mu\text{M}$), a non-selective $5\text{-HT}_{2A/2B/2C}$ antagonist abolished completely the AMPH-induced intestinal contraction which points to the involvement of 5-HT_2 on the AMPH effect. Significant and similar changes on the 5-HT CR curve were also observed in the presence of ketanserin, RS 127445 and ritanserin. Furthermore, the immunohistochemical studies revealed immunoreactivity for the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor on ganglionic cells of the mienteric and submucous plexus but not in the smooth muscle cells of the longitudinal and circular layers. Moreover, the recently described TAAR1 selective antagonist, N-(3-ethoxy-phenyl)-4-pyrrolidin-1-yl-3-trifluoromethyl-benzamide (EPPTB), at $5 \mu\text{M}$, significantly changed (with a reduction of the E_{max}) the CR curves for both tyramine and AMPH, suggesting also the recruitment of TAAR1. Since reserpin ($100 \mu\text{M}$) abolished completely the AMPH-induced intestinal contraction, and about 90% of serotonin is synthesized, stored and released mainly by enterochromaffin cells in the gut, we propose that AMPH may trigger the release of the monoamine from enterochromaffin cells, though further studies are needed to definitely prove the involvement of the TAAR1 through its cellular location. For the functional studies performed with the ileums from control rats and rats subject to 15 mg/Kg AMPH, there were no statistically significant changes in the AMPH and 5-HT CR curves, showing no relevant changes in intestinal function. The rats which were subjected to AMPH became hyperthermic for about 90 minutes and stereotyped behaviours were shown. Regarding the results of quantification of monoamines levels, only dopamine levels decreased significantly, showing some neurotoxicity in rats subjected to the drug after 24 hours.

In conclusion, this study shows for the first time that both 5-HT and trace amine-associated receptors contribute to the contractile response of the rat isolated ileum to AMPH.

Key-words: amphetamine; rat ileum; contraction; 5-HT ; TAAR1.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. AMINAS BIOGÉNICAS E AMINAS VESTIGIAIS

O termo “aminas biogénicas” foi introduzido para designar um grupo de aminas que possuem um papel biológico importante como mensageiros químicos, como hormonas, neuromoduladores ou neurotransmissores (Figura 1) (Zucchi *et al.*, 2006). Estas substâncias são produzidas a partir dos seus aminoácidos aromáticos respectivos e a sua síntese inclui passos de descarboxilação. As primeiras aminas biogénicas descobertas foram as catecolaminas, isto é, a adrenalina, noradrenalina (NA) e dopamina (DA), que derivam da tirosina. Outras aminas biogénicas muito conhecidas são a histamina e a serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT), que derivam da histidina e triptofano, respectivamente (Zucchi *et al.*, 2006).

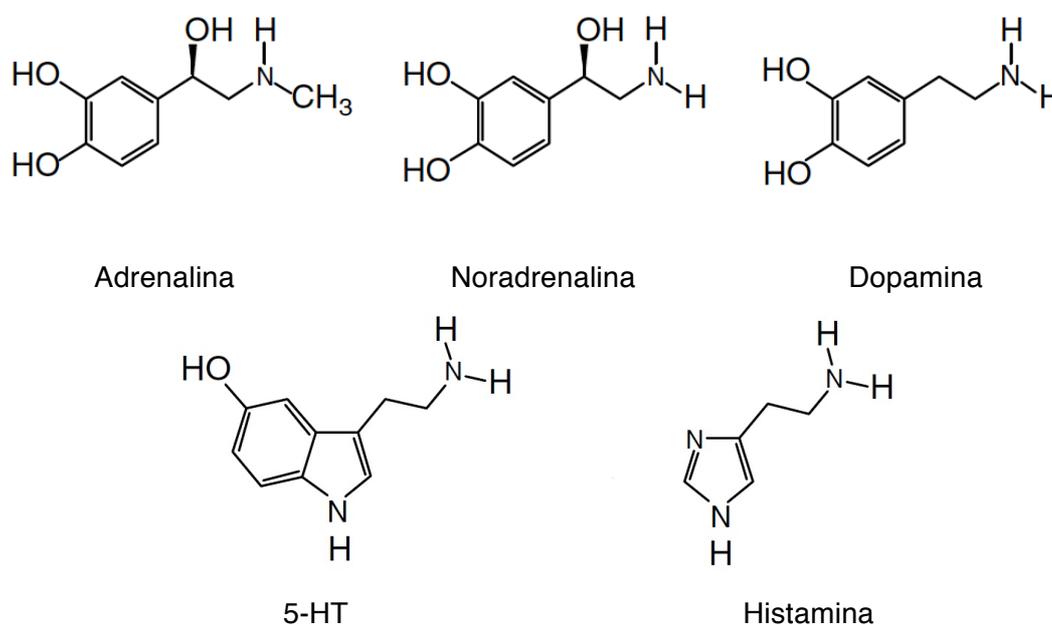


Figura 1– Estrutura química das aminas biogénicas clássicas (adaptado de Zucchi *et al.*, 2006)

Outras aminas biogénicas estão presentes no SNC em concentrações muito baixas, na ordem de 0,1-10 nM. Para estes compostos surgiu o termo “aminas vestigiais” (*trace amines* – TA). As moléculas geralmente consideradas aminas vestigiais são *para*-tiramina, *meta*-tiramina, triptamina, β -feniletilamina (β -phenylethylamine – β -PEA), *para*-octopamina e *meta*-octopamina (Figura 2) (Berry, 2004; Broadley, 2010; Bunzow *et al.*, 2001; Borowsky *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005).

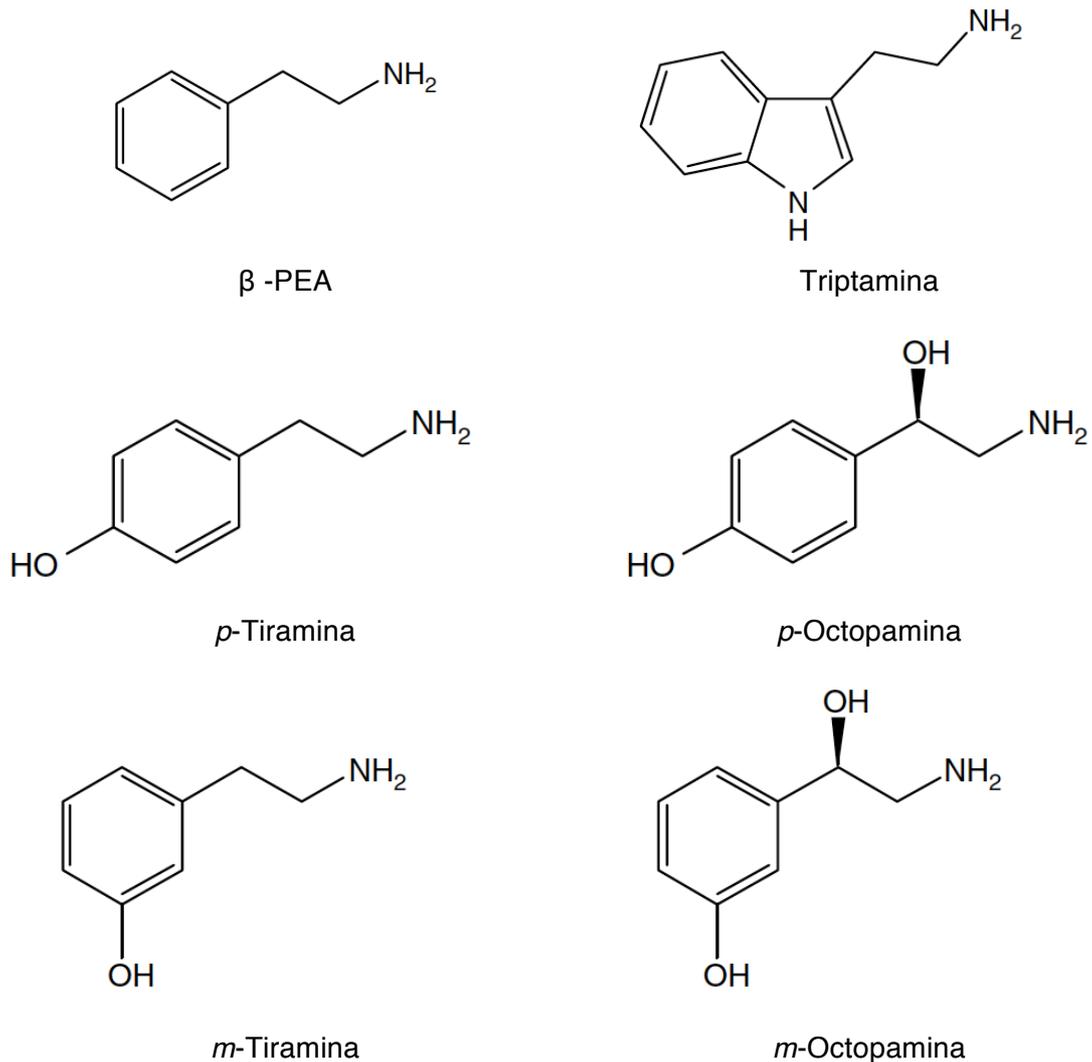


Figura 2 – Estrutura química dos compostos conhecidos como aminas vestigiais (adaptado de Zucchi *et al.*, 2006)

Contrariamente à situação dos vertebrados, algumas aminas vestigiais são as aminas mais abundantes encontradas em muitas espécies de invertebrados (Zucchi *et al.*, 2006). As aminas vestigiais são ainda produzidas por bactérias, fungos, células de plantas e podem igualmente ser encontradas em alguns alimentos como é o caso do chocolate, queijo, iogurtes probióticos e vinho tinto (Zucchi *et al.*, 2006; Fehler *et al.*, 2010; Broadley *et al.*, 2008).

As TA estão estrutural e funcionalmente relacionadas com as catecolaminas, existindo diversos análogos sintéticos como é o caso das anfetaminas (Bunzow *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005;).

1.1 SÍNTESE, METABOLISMO E ARMAZENAMENTO DAS AMINAS VESTIGIAIS

As TA partilham com as catecolaminas DA, adrenalina e NA vias enzimática metabólicas (Grandy, 2007). Por exemplo, as TA endógenas são sintetizadas no organismo através da descarboxilação dos seus respectivos aminoácidos precursores utilizando a enzima descarboxilase dos L-aminoácido aromático (*aromatic L-amino acid decarboxylase* – AADC) (ver Figura 3) (Burchett *et al.*, 2006). A β -PEA é sintetizada a partir da L-fenilalanina enquanto que a *p*-tiramina é sintetizada a partir da L-tirosina. A *p*-octopamina deriva da *p*-tiramina através da dopamina- β -hidroxilase (*dopamine- β -hydroxylase* – DBH). Já a triptamina é sintetizada a partir do L-triptofano através da acção da AADC (Broadley, 2010; Berry, 2004). Adicionalmente, a MAO também é responsável pela degradação das TA (Figura 3). A MAO é uma enzima intracelular encontrada ligada à membrana exterior da mitocôndria. Esta enzima desamina aminas primárias e secundárias que estão livres no citoplasma neuronal mas não aquelas que se encontram ligadas às vesículas armazenadoras dos neurónios simpáticos (Berry, 2004; Broadley, 2010).

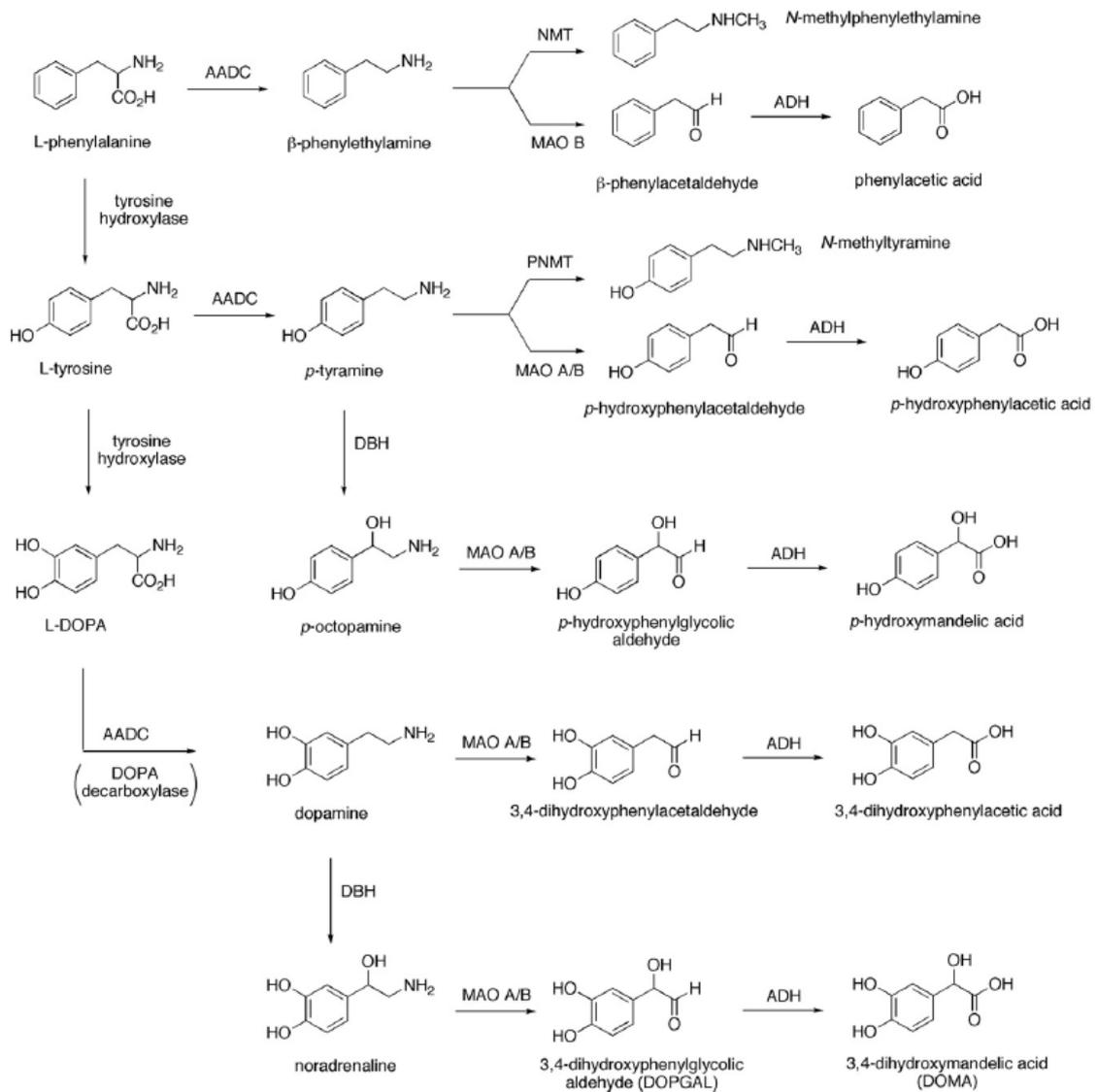


Figura 3 – Via sintética e metabólica de aminas vestigiais endógenas e exógenas (retirado de Broadley, 2010)

Apesar das TA terem sido detectadas em sinaptossomas, o seu local de síntese e armazenamento permanece por esclarecer (Grandy, 2007).

1.2 ACÇÕES BIOLÓGICAS DAS AMINAS VESTIGIAIS

Tradicionalmente, a literatura científica (Kopin *et al.*, 1964; Baldessarini & Fischer, 1977; Baldessarini, 1978; Maguire *et al.*, 2009) e os textos de medicina e farmacologia (Goodman and Gillman's, 2005; Katzung, 2007) referem-se às TA como “falsos” transmissores, ou, alternativamente, como neuromoduladores com acção simpaticomimética indirecta, visto que podem promover o efluxo de NA das vesículas

sinápticas dos neurónios simpáticos para o terminal nervoso adrenérgico (Berry, 2004; Brunton *et al.*, 2005; Borowsky *et al.*, 2001; Bunzow *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005; Fehler *et al.*, 2010). A literatura sugere que estas moléculas não preenchem os critérios estabelecidos para poderem ser consideradas neurotransmissores (Grandy, 2007).

Apesar do mecanismo de acção dos TA estar melhor estudada nos invertebrados, tem aumentado a informação sobre estas substâncias nos vertebrados (Grandy, 2007). A primeira demonstração em vertebrados do efeito fisiológico da β -PEA e da tiramina foi realizado por Barger e Walpole em 1909. Durante 40 anos, a atenção dada às TA continuou a ser grande, no entanto o foco começou gradualmente a dirigir-se para as catecolaminas e para as enzimas que as sintetizam. A identificação e caracterização da AADC e da MAO-A e MAO-B levaram ao desenvolvimento de inibidores altamente selectivos que provaram ser benéficos em alguns tratamentos clínicos. Fármacos como o iproniazida, um inibidor irreversível da MAO, forneceram novos meios para alterar a fisiologia das catecolaminas, assim como forneceram meios para demonstrar a fisiologia das TA (Grandy, 2007). A evidência que as acções das TA no SNC são distintas daquelas das catecolaminas foi relatada por Sabelli e colaboradores em 1976. De facto, este investigador demonstrou que a β -PEA tinha um efeito oposto na estimulação de neurónios corticais em comparação com os efeitos inibitórios da DA e NA nas mesmas concentrações. Curiosamente, estes autores compararam os efeitos comportamentais de uma injeção intraperitoneal (i.p.) de β -PEA (10 mg/Kg) aos de adrenalina (1-5 mg/Kg), de NA (1-5 mg/Kg) e de DA (10-50 mg/Kg) em pintos recém-nascidos. Enquanto que as catecolaminas induziram sono, a β -PEA induziu uma excitação *amphetamine-like* prolongada caracterizada pelo aumento da actividade locomotora, do chilrear e do comportamento agressivo de luta.

Por outro lado, foi sugerido que as acções fisiológicas das TA são relativamente fracas comparativamente à acção das catecolaminas. No entanto, em condições em que a actividade da MAO está inibida, os níveis das TA podem tornar-se significativamente elevados, deslocando mais eficazmente os neurotransmissores das suas vesículas armazenadoras (Ibrahim *et al.*, 1985). Numa concentração ainda mais elevada, as TA aumentam a libertação de DA, e numa menor extensão a libertação de NA e 5-HT nas sinapses (Berry, 2004; Burchett *et al.*, 2006).

Classicamente foi considerado que as TA, em particular a octopamina e a tiramina, são neurotransmissores e não neuromoduladores (compostos presentes no SNC que podem alterar a sensibilidade dos neurónios para outros neurotransmissores, mas que não têm qualquer efeito por si só) nos vertebrados (Saavedra *et al.*, 1974; Saavedra *et al.*, 1976; Axelrod *et al.*, 1977; Evans *et al.*, 1977; Roeder, 1999). Por outro lado, Nagaya e colaboradores, em 2002, demonstrou que a tiramina funciona como neuromodulador na *Drosophila melanogaster*, e Donini e Laange (2004) relataram evidências que a tiramina funciona tanto como neuromodulador, como neurotransmissor no gafanhoto. Já em mamíferos, tem sido sugerido que a octopamina possa ser um neuromodulador envolvido em alguns dos efeitos fisiológicos atribuídos aos inibidores da MAO (Kakimoto *et al.*, 1962). Em 1975, Boulton propôs que as TA têm um efeito directo e indirecto na transmissão sináptica envolvendo a DA, NA e 5-HT. Os efeitos directos são o resultado da libertação ou difusão das TA para o local de acção. Já os efeitos indirectos referem-se às consequências a jusante da TA interferir com a captação e/ou libertação de catecolaminas (Boulton, 1976). Em 1985, Baud e colaboradores evidenciaram de forma convincente que a tiramina e a β -PEA podem actuar independentemente da DA para inibir a libertação de acetilcolina (*acetylcholine* – ACh) em fatias do estriado. Estudos adicionais sugeriram que elevadas concentrações de TA interagem e interferem com a função dos transportadores de aminas biogénicas de forma semelhante à anfetamina e à metanfetamina, mas diferente da DA, da adrenalina e do metilfenidato (Hirano *et al.*, 1989; Janssen *et al.*, 1999; Mundorf *et al.*, 1999; Berry, 2004; Sulzer *et al.*, 2005). Tem sido demonstrado que as TA inibem a recaptação de DA e, numa menor extensão, a recaptação de NA e 5-HT, assim como exercem um efeito *amphetamine-like* no transportador pré-sináptico de monoaminas, causando a reversão da direcção normal do transporte e condicionando o aumento da concentração citoplasmática de neurotransmissores na fenda sináptica. Recentemente foram descobertos receptores activados pelas TA nos vertebrados. Em conclusão, as evidências sugerem quatro tipos de actividade para as TA no SNC: co-transmissores libertados com a DA, NA e 5-HT; “falsos” transmissores nos receptores selectivos da DA e NA; neuromoduladores e finalmente transmissores com os seus próprios receptores.

1.3 TRACE AMINE ASSOCIATED RECEPTORS (TAAR)

Nos últimos anos foram feitas importantes descobertas no campo da sinalização aminérgica. Em 2001, foi identificada uma nova família de receptores acoplados à proteína G (*G Protein-Coupled Receptors* – GPCRs) (Borowsky *et al.*, 2001; Bunzow *et al.*, 2001) e posteriormente caracterizada pela *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR) (Maguire *et al.*, 2009). Os membros desta família de GPCRs são agora referidos como os *trace amine-associated receptors* (TAARs) baseado no perfil farmacológico do seu membro prototípico, TAAR1 (Lindemann *et al.*, 2005). A descoberta do primeiro TAAR1 foi realizada independentemente por dois grupos de investigadores, Borowsky *et al.*, (2001) e Bunzow *et al.*, (2001), utilizando abordagens semelhantes (Zucchi *et al.*, 2006). Estes receptores estão localizados tanto nas células pré-sinápticas como nas células pós-sinápticas (Sotnikova *et al.*, 2009).

Apesar de já se conhecerem sítios de ligação para a triptamina, tiramina e β -PEA no cérebro de rato (Berry, 2004), a identificação de uma família de GPCRs que podia ser activada pelas aminas vestigiais originou fortes evidências para um papel independente destas aminas na neurotransmissão (Borowsky *et al.*, 2001; Bunzow *et al.*, 2001; Sotnikova *et al.*, 2009). Apenas dois membros desta família de receptores, o receptor trace amine 1 (TA1, agora TAAR1) e o receptor trace amine 2 (TA2, agora TAAR4) foram identificados como sendo sensíveis às aminas vestigiais (Borowsky *et al.*, 2001; Bunzow *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005). Alguns TAARs são ainda sensíveis a algumas aminas voláteis (Liberles *et al.*, 2006).

1.3.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DO *TRACE AMINE-ASSOCIATED RECEPTOR 1*

O TAAR1 é o receptor que melhor está caracterizado dentro da família dos TAAR (Grandy, 2007). O TAAR1 acopla à G_s e quando activado pelas TA origina AMPc (Borowsky *et al.*, 2001; Bunzow *et al.*, 2001). Curiosamente, a d- e l-anfetamina, a metanfetamina, o metilenedioximetanfetamina (MDMA) e outros análogos da anfetamina são capazes de activar o receptor TAAR1 *in vitro* como evidenciado pela estimulação da adenil ciclase e produção de AMPc nas células embrionários de rim humano (Borowsky *et al.*, 2001). No SNC de ratinho, o RNAm para o TAAR1 está distribuído ao longo do sistema límbico e nas regiões que contêm corpos celulares

catecolaminérgicos, como o corpo estriado, a substância nigra ou a área tegmental ventral do mesencéfalo (Borowsky *et al.*, 2001). Já no rato, o RNAm para o TAAR1 foi encontrado no cérebro, com uma maior expressão no bulbo olfatório, regiões corticais, substância nigra, área tegmental ventral, entre outros. Periféricamente, o RNAm foi ainda encontrado no fígado, nos rins, no tracto gastrointestinal (GI), baço, pâncreas e coração (Bunzow *et al.*, 2001). É de notar que a região da amígdala no SNC do rato, ratinho e humano contém o nível mais elevado de RNAm para o TAAR1 (Borowsky *et al.*, 2001). Estes dados demonstram de forma convincente que o TAAR1 é amplamente expresso nas áreas primárias monoaminérgicas do cérebro e está bem posicionado como modulador locomotor, emocional e comportamentos motivacionais que estão, tradicionalmente, associados com a actividade monoaminérgica (Sotnikova *et al.*, 2009).

O estudo da farmacologia do TAAR1 num sistema celular heterogéneo *in vitro* tem sido desafiante, muito por causa do facto do TAAR1 permanecer, em grande parte, dentro da célula quando expresso heterologicamente em linhas celulares (Bunzow *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2005; Grandy, 2007; Reese *et al.*, 2007; Wainscott *et al.*, 2007). Geralmente, com tão baixo nível de expressão nos sistemas celulares heterólogos, o TAAR1 exhibe uma capacidade reduzida na sinalização que pode ser restaurada por substituição de partes da sequência do receptor ou pelo estímulo da proteína G com o correspondente homólogo de rato (Bunzow *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005; Reese *et al.*, Wainscott *et al.*, 2007). A utilização de um método que seja altamente sensível ao AMPc pode também contornar este problema (Miller *et al.*, 2005; Xie e Miller, 2007; Xie *et al.*, 2007). Isto é particularmente relevante para o TAAR1 humano, que provou ser notoriamente difícil de expressar num sistema heterólogo celular; são necessárias modificações adicionais para expressá-lo de modo fiável em células. Mesmo com essas modificações, a expressão na membrana foi relativamente pequena, mas o padrão predominante de expressão intracelular foi alcançado (Bunzow *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2005; Reese *et al.*, 2007; Wainscott *et al.*, 2007). Apesar das dificuldades, muitos grupos confirmaram as observações iniciais demonstrando um agonismo total e potente das TA, β -PEA e tiramina no TAAR1, com um EC_{50} à volta dos 40-900 nM para a β -PEA e 70-1100 nM para a tiramina (Borowsky *et al.*, 2001; Bunzow *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Grandy, 2007; Reese *et al.*, 2007; Wainscott *et al.*, 2007). Uma actividade relativamente mais fraca foi descrita para a octopamina e triptamina no TAAR1 de ratos e humanos (Borowsky *et al.*, 2001;

Bunzow *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Reese *et al.*, 2007; Wainscott *et al.*, 2007). Contudo, é de notar, que existem diferenças substanciais nas potências dos agonistas entre receptores TAAR1 de diferentes espécies. Em geral, foi demonstrado que a β -PEA é um agonista mais potente que a tiramina no TAAR1 humano e de ratinho, enquanto que no TAAR1 de rato, a tiramina é mais potente que a β -PEA (Grandy, 2007, Wainscott *et al.*, 2007). Em 2009, foi dado um passo importante para o futuro da investigação do TAAR1. O grupo de investigação liderado por Bradaia identificou um antagonista selectivo para o TAAR1 (Figura 4), o N-(3-etoxi-fenil)-4-pirrolidino-1-il-3-trifluorometil-benzamida (N-(3-ethoxy-phenyl)-4-pyrrolidin-1-yl-3-trifluoromethyl-benzamide – EPPTB).

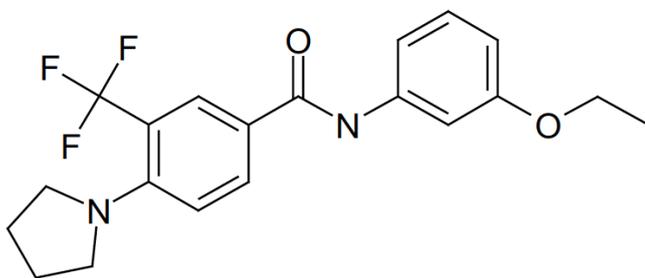


Figura 4 – Estrutura química do antagonista selectivo do TAAR1, EPPTB (retirado de Bradaia *et al.*, 2009)

2. ANFETAMINA

2.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL

A anfetamina foi sintetizada pela primeira vez em Berlim no ano de 1887 com o nome químico de 1-metil-2-feniletilamina pelo químico Romeno Lazar Edeleano (Fleckenstein *et al.*, 2007). Durante mais de 100 anos, pensou-se que a anfetamina tivesse exclusivamente uma origem sintética, no entanto, em 1997, este composto, juntamente com a metanfetamina, nicotina e mescalina, foram encontrados em duas espécies de acácias no Texas (Berman *et al.*, 2009). A estrutura química base da anfetamina e dos seus análogos é a β -PEA. Os análogos mais conhecidos da anfetamina são o metilfenidato, a metanfetamina e o MDMA (mais conhecida como *ecstasy*). Na Figura 5 é possível visualizar a estrutura química dos compostos acima referidos.

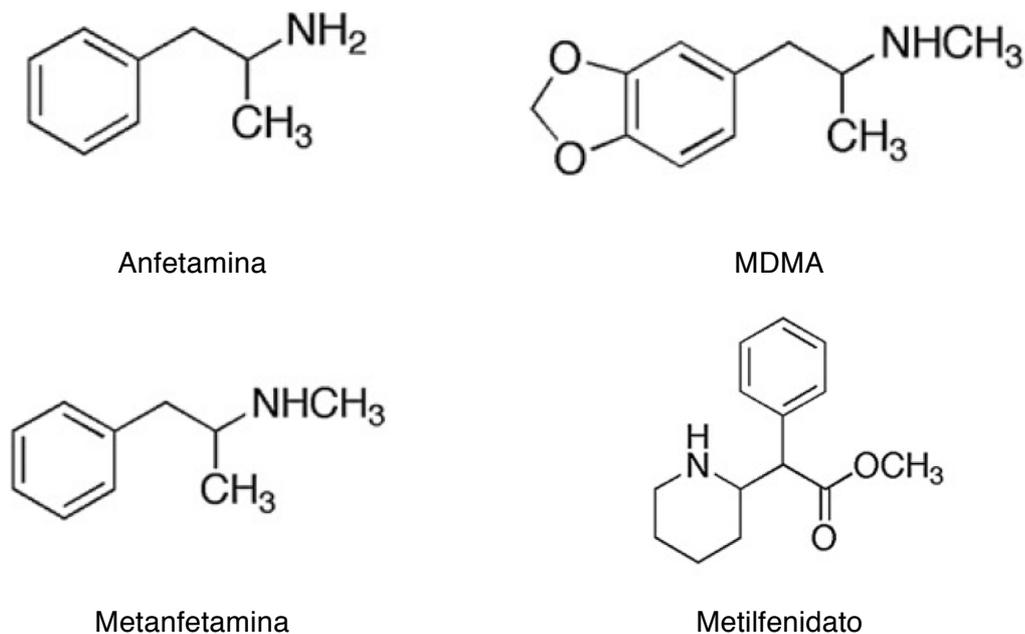


Figura 5 – Estrutura química da anfetamina e seus análogos mais comuns (adaptado de Broadley, 2010)

A anfetamina foi, geralmente, considerada como uma amina simpaticomimética desde que as suas acções foram descritas por Piness, Miller & Alles (1930) e por Hartung & Munch (1931) e comparadas com as acções da adrenalina. No entanto, em 1960, o investigador Vane demonstrou que apesar de a adrenalina relaxar o estômago de rato e o duodeno de coelho, a anfetamina causava contracções actuando nos receptores da 5-HT. Innes, em 1963, concluiu que a d-anfetamina actuava directamente nos receptores 5-HT do músculo liso e por isso, a anfetamina não podia ser vista como uma verdadeira amina simpaticomimética, mas sim como uma amina com efeito simpaticomimético indirecto.

A anfetamina é ainda caracterizada pela capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, de resistir à biotransformação e de aumentar os teores de neurotransmissores na fenda sináptica, incluindo as aminas biogénicas NA, DA e 5-HT. Estas propriedades são um reflexo na sua estrutura química. De facto, a presença do grupo α -metil previne a oxidação do grupo amina pelas isoformas da MAO, aumentando a sua capacidade para atravessar as membranas pela sua natureza anfipática (Carvalho *et al.*, 2012). Adicionalmente, devido à semelhança estrutural com neurotransmissores monoamínicos, a anfetamina actua como um substracto competitivo nos transportadores membranares de NA, DA e 5-HT, reduzindo a

recaptação de neurotransmissores endógenos (Capela *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012). Para além desta inibição na recaptação das monoaminas, a anfetamina estimula ainda a libertação destes neurotransmissores.

2.2 METABOLISMO DA ANFETAMINA

A anfetamina pode ser metabolizada sequencialmente por N-desaminação e oxidação, derivado originando o ácido benzoico que é excretado como glucuronido ou conjugado com a glicina (ácido hipúrico) (Figura 6). A segunda forma de metabolização consiste na hidroxilação na posição 4 do anel aromático, gerando 4-hidroxianfetamina, seguida da conjugação com um grupo fenol com sulfato ou com ácido glucurónico (Kraemer *et al.*, 2002). Durante o passo de hidroxilação pode formar-se ainda um intermediário reactivo que poderá reagir com glutathiona originando o (glutathiona-S-il)-p-hidroxianfetamina (Carvalho *et al.*, 1996). A via metabólica menor que compreende a oxidação no carbono β da cadeia lateral conduz à formação de norefedrina que é posteriormente oxidada no anel aromático em hidroxinorefedrina (Caldwell, 1980; Kraemer *et al.*, 2002).

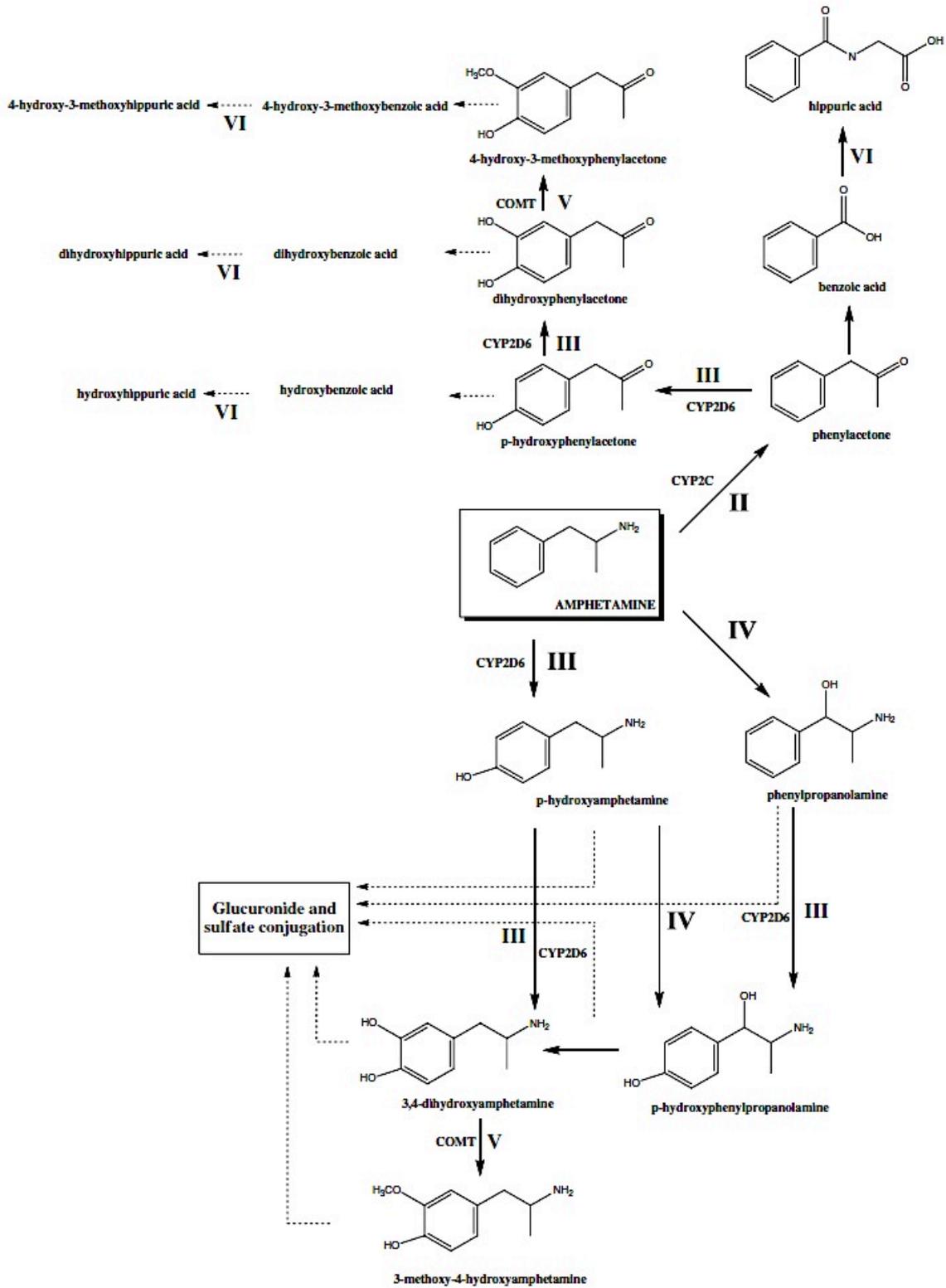


Figura 6 – Via metabólica da anfetamina. II desaminação oxidativa; III hidroxilação aromática; IV hidroxilação alifática; V O-metilação; VI conjugação da glicina (retirado de Carvalho *et al.*, 2012)

2.3 CONSUMO: RECREATIVO *VERSUS* TERAPÊUTICO

A anfetamina e os seus análogos sintéticos metanfetamina e MDMA são substâncias psicoestimulantes com elevado potencial de abuso e dependência (Anglin *et al*, 2000). A metanfetamina é a droga ilegal mais utilizada em todo o mundo de acordo com as Nações Unidas (Anglin *et al.*, 2000). Com efeito, em alguns continentes, nomeadamente no continente Asiático e no Norte-americano, o abuso de metanfetaminas é um dos principais problemas de saúde pública. Já no caso do Reino Unido, a droga mais consumida a seguir à cannabis é o MDMA (Condon & Smith, 2003). É de notar o aumento acentuado e generalizado em todo o mundo do consumo de MDMA, que é geralmente atribuído aos seus efeitos positivos sobre o humor e bem-estar.

A anfetamina e alguns dos seus análogos, para além de serem utilizados como drogas de abuso, são também utilizadas no tratamento da síndrome de défice de atenção e hiperactividade (*Attention Deficit and Hyperactivity Disorder – ADHD*), da narcolepsia e podem igualmente ser utilizados como anorexiantes (Berman *et al*, 2009). A ADHD é um transtorno neurocomportamental caracterizado por falta de concentração, impulsividade e hiperactividade. Esta síndrome responde a psicoestimulantes tais como o metilfenidato e a anfetamina. Ambos os compostos são agonistas indirectos que aumentam a concentração extracelular de monoaminas (Fan *et al*, 2007). Já a narcolepsia é uma doença caracterizada pela vontade incontrolada de dormir e uma transição inadequada entre o estado de alerta e o sono REM (*rapid eye movement*). Muitas das características da narcolepsia, como alucinações e cataplexia são devido a fenómenos de uma regulação anormal e a uma dissociação de sono REM (Wise *et al*, 2007).

Em Portugal, apenas o metilfenidato (Ritalina®) é permitido, sendo utilizado como fármaco no tratamento da ADHD ou da narcolepsia. A sua acção simpaticomimética indirecta reflecte a libertação de NA e o bloqueio da recaptação neuronal de NA e DA. No entanto, a toma inadequada de Ritalina®, sobretudo quando utilizada pela mucosa nasal ou injectada, pode resultar em abuso e viciação.

2.3.1 EFEITOS ASSOCIADOS À TOMA DE ANFETAMINA

A anfetamina é uma das aminas simpaticomiméticas mais potentes, estimulando o SNC. O efeito psíquico produzido por esta substância depende da dose bem como do estado mental e personalidade do indivíduo que a toma. No entanto, os efeitos mais habituais são: maior estado de alerta, aumento do estado de vigília, diminuição da sensação de fadiga, aumento da auto-confiança, euforia, excitação, depressão do apetite, maior concentração, estimulação locomotora e comportamentos estereotipados (comportamento repetitivo e padronizado) (Goodman e Gilman, 2007).

Estudos de comportamento em roedores mostraram um aumento da locomoção, movimentação mais vertical (o animal está mais tempo sobre as patas traseiras) e comportamentos estereotipados como cheirar (*sniffing*), lamber (*licking*), roer (*gnawing*) e balançar a cabeça (*head bobbing*). Acredita-se que estes comportamentos tenham uma componente dopaminérgica porque o pré-tratamento com 6-hidroxitriptamina e consequente perda de neurónios dopaminérgicos nigrostriatais contraria estes efeitos (Rang & Dale, 2007). Doses mais elevadas de anfetamina, produzem um comportamento ligeiramente diferente: os roedores andam para trás e aos círculos (*backward walking* e *cicling*, respectivamente), tendo sido sugerido o envolvimento de uma componente serotoninérgica (Curzon *et al.*, 1979).

No Homem, se a anfetamina for tomada ao longo de alguns dias com o intuito de procurar a manutenção do estado de euforia que uma única dose provoca, desenvolve-se um estado psicótico (*“amphetamine psychosis”*) que se assemelha a um ataque agudo de esquizofrenia, com alucinações acompanhadas de sintomas de paranóia e comportamento agressivo. Paralelamente desenvolve-se um comportamento repetitivo estereotipado (por exemplo, fazer camas, engraxar sapatos). A semelhança desta condição com a esquizofrenia e a eficácia de fármacos antipsicóticos no seu controlo é consistente com a teoria dopaminérgica da esquizofrenia (Rang & Dale, 2007).

Relativamente ao sistema cardiovascular, a anfetamina quando administrada oralmente, eleva a pressão arterial, quer a sistólica quer a diastólica, resultando na diminuição da frequência cardíaca de modo reflexo. Com doses terapêuticas não se observam alterações do débito cardíaco, enquanto que com doses mais elevadas

podem ocorrer arritmias. Relativamente ao fluxo sanguíneo cerebral, não se observam mudanças significativas (Goodman e Gilman, 2007).

A anfetamina estimula ainda o centro respiratório medular, aumentando a frequência e a profundidade de respiração (Goodman e Gilman, 2007).

Em geral, o músculo liso, responde à anfetamina da mesma maneira que responde a outras aminas simpaticomiméticas; por exemplo o efeito contráctil da anfetamina no esfíncter vesical é muito marcado. Quanto aos efeitos gastrointestinais, estes são imprevisíveis: se a actividade entérica for pronunciada, a anfetamina pode causar obstipação; caso contrário pode-se observar o efeito oposto, ou seja, diarreia (Goodman e Gilman, 2007).

2.4 FARMACODINAMIA DA ANFETAMINA: MECANISMOS DE ACÇÃO

2.4.1 A ANFETAMINA E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Um dos riscos de saúde mais temidos e mais debatidos relativamente ao consumo da anfetamina está relacionado com os seus potenciais efeitos neurotóxicos. De facto, este assunto tem sido extensivamente estudado nas últimas quatro décadas (Carvalho *et al.*, 2012).

A anfetamina induz a libertação dos neurotransmissores DA, NA e 5-HT através de dois mecanismos: 1) as concentrações dos neurotransmissores no citoplasma são maiores devido à disrupção das vesículas armazenadoras induzida pela anfetamina e 2) os neurotransmissores saem da célula de acordo com o respectivo gradiente de concentração, levando o transportador membranar a funcionar de modo reverso (Azmitia *et al.* 1990; Berger *et al.* 1992; Crespi *et al.* 1997; Gudelsky and Nash 1996; Partilla *et al.* 2006; Wichems *et al.* 1995). Em primeiro lugar, a anfetamina é reconhecida pelos transportadores de DA (*Dopamine transporter* – DAT), transportador de NA (*Norepinephrine transporter* – NET) e/ou transportador de 5-HT (*Serotonin transporter* – SERT), entrando nos neurónios monoaminérgicos. É interessante constatar que a anfetamina apresenta diferentes afinidades para com os transportadores DAT, NET e SERT. Contudo, a interacção com estes transportadores

é essencial para desencadear a libertação de monoaminas, uma vez que na sua ausência, ou inibição, a anfetamina não provocará os seus efeitos biológicos (Sitte and Freissmuth, 2010). Sendo a anfetamina uma base fraca lipofílica de pKa de 9,9, dentro dos terminais nervosos, a molécula de estará preferencialmente sob a forma protonada porque o pH intracelular é menor que o pH extracelular (Fleckenstein et al., 2007). As moléculas de anfetamina desprotonadas podem difundir de novo para a fenda sináptica e ficarem novamente disponíveis para uma nova captação (Sitte and Freissmuth, 2010). Uma vez no citoplasma, a anfetamina funciona como um substrato do transportador vesicular de monoaminas (*vesicular monoamine transporter – VMAT*), entrando nas vesículas através do VMAT e esgotando o armazenamento vesicular de neurotransmissores pela reversão da actividade do transportador (Partilla *et al.* 2006). A anfetamina pode, igualmente, esgotar o conteúdo vesicular pela disrupção do gradiente electroquímico de prótons necessário para o sequestro vesicular de monoaminas. Com efeito, à semelhança dos grânulos de células cromafins (pH \approx 5,5), o pH das vesículas catecolaminérgicas é ácido e sendo a anfetamina uma base fraca, esta alcalinizará o interior ácido das vesículas (Fleckenstein and Hanson 2003, Fleckenstein *et al.*, 2007). Outro aspecto importante da acção da anfetamina é a sua capacidade para regular a actividade dos transportadores membranares de monoaminas. É conhecida a capacidade por parte da anfetamina para regular o estado de fosforilação dos transportadores, regulando assim a sua função (Cervinski *et al.* 2005; Ramamoorthy and Blakely 1999). Com o aumento dos níveis citoplasmáticos de monoaminas no interior dos terminais nervosos, vai ocorrer a reversão da actividade dos transportadores membranares que passarão a transportar para a fenda sináptica os neurotransmissores. As moléculas de anfetamina desprotonadas podem difundir-se de novo para a fenda sináptica, estando novamente disponíveis para uma nova recaptação (Sitte e Freissmuth, 2010). Na Figura 7 está representado o mecanismo de acção clássico da anfetamina a nível do SNC.

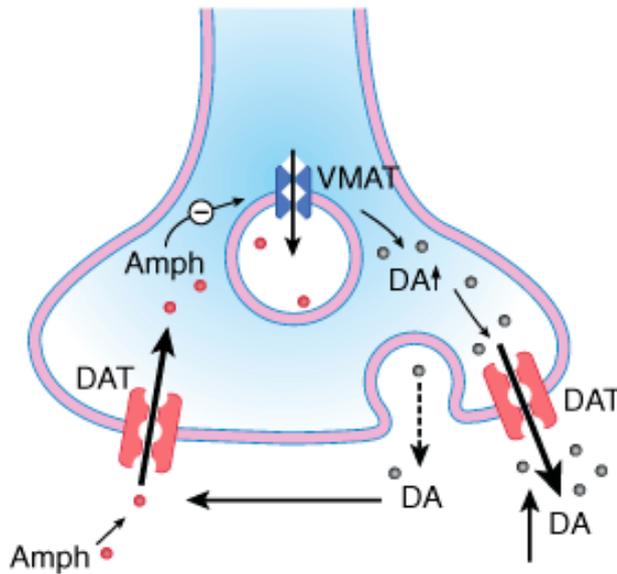


Figura 7 – Mecanismo clássico da anfetamina no SNC (adaptado de Katzung, 2007)

Adicionalmente, a anfetamina é também conhecida pelas suas propriedades inibidoras da MAO (enzima envolvida na metabolização pré-sináptica das monoaminas), aumentando desse modo o conteúdo citoplasmático de monoaminas (Mantle *et al.* 1976). Finalmente, foi também demonstrado que a anfetamina induz o aumento da actividade da tirosina hidroxilase, que por sua vez, aumenta a disponibilidade de catecolaminas na fenda sináptica e assim a estimulação dos receptores adrenérgicos no SNC (Mandell e Morgan, 1970). É interessante referir que a reserpina, um inibidor do VMAT-2 e do armazenamento vesicular de catecolaminas, não contraria os efeitos comportamentais da anfetamina referidos anteriormente. Provavelmente porque a anfetamina liberta preferencialmente a *pool* citoplasmático de catecolaminas do que o vesicular (Rang & Dale, 2007).

Estes mecanismos contribuem para a neurotoxicidade induzida pela anfetamina. De facto, o aumento na *pool* citoplasmática de monoaminas pode desencadear *stress* oxidativo dentro do terminal nervoso através de dois mecanismos: 1) as catecolaminas, DA e NA, podem sofrer auto-oxidação, produzindo espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species* – ROS); 2) o metabolismo das monoaminas por parte das isoformas activas da MAO pode também condicionar a produção de ROS. Deste *stress* oxidativo pode resultar a perda ou a disfunção do terminal nervoso (Capela *et al.*, 2009).

Os marcadores bioquímicos da neurotoxicidade incluem a diminuição dos níveis de monoaminas assim como dos seus maiores metabolitos, a diminuição dos sítios de ligação dos transportadores de monoaminas assim como a diminuição na expressão e/ou actividade das enzimas envolvidas na síntese e no metabolismo de neurotransmissores monoamínicos (Carvalho *et al.*, 2012).

2.4.2 O SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO E A ANFETAMINA

No sistema nervoso periférico (SNP), a anfetamina liberta maiores teores de NA do que DA (Florin *et al.*, 1994). Adicionalmente, a D-anfetamina é um potente inibidor da recaptação de NA, que poderá ser a causa de um maior efeito relativamente ao seu isómero L-anfetamina (Sulzer *et al.*, 2005). Relativamente à interferência nos neurotransmissores ou hormonas, que podem ter uma acção directa ou indirecta na função cardíaca, a anfetamina aumenta a NA extracelular em cérebro de rato macho Sprague-Dawley (Florin *et al.*, 1994). Esta estimulação dos receptores adrenérgicos, desencadeia indirectamente alterações a nível da função cardiovascular. Por outro lado, a acção directa nos receptores presentes no coração ou a acção directa de moléculas no tecido do miocárdio pode causar cardiomiopatias de *stress*, enfartes do miocárdio e taquicardia, entre outras complicações cardiovasculares (Costa *et al.*, 2011).

2.4.3 FACTORES QUE AFECTAM OS EFEITOS ESTIMULANTES/TÓXICOS DA ANFETAMINA

O tipo e/ou gravidade dos efeitos estimulantes/tóxicos mediados pela anfetamina é extremamente imprevisível, tendo em conta que a resposta fisiológica é conseguida através da conjugação de diversos factores, incluindo a dose e via de administração (Carvalho *et al.*, 2012).

Relativamente à dose, esta não vai apenas determinar o seu potencial de adicção mas também a intensidade e persistência dos seus efeitos biológicos e tóxicos. A via de administração também é um factor crucial nos efeitos provocados pela anfetamina. A injeção intravenosa é a forma de administração mais rápida, causando o maior e mais rápido aumento na concentração plasmática da anfetamina. As mucosas

respiratória, anal e GI condicionam efeitos mais lentos. As condições ambientais que rodeiam o consumidor também têm influência. De facto, foi demonstrado que a toxicidade da anfetamina pode ser potenciada sob condições de temperaturas elevadas que potenciam a hipertermia e esta, por sua vez, a neurotoxicidade induzida por ROS (Yamada *et al.*, 2001), sons elevados e repetitivos, ambientes stressantes, lugares superlotados, excesso de actividade física. As características do consumidor também têm que ser levadas em conta, nomeadamente a idade, a etnia, o sexo e o estado fisiológico e fisiopatológico. É importante notar que a idade pode afectar a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo da anfetamina e consequentemente provocar diferentes efeitos (Carvalho *et al.*, 2012).

2.5 TRACE AMINE-ASSOCIATED RECEPTOR 1 E A ANFETAMINA

Como já foi referido anteriormente, a anfetamina partilha uma estrutura química semelhante com a TA endógena β -PEA. O facto de a β -PEA ter a melhor actividade estabelecida no TAAR1 até ao momento (Borowsky *et al.*, 2001; Bunzow *et al.*, 2001; Lindemann *et al.*, 2005) tem solicitado investigações sobre se as anfetaminas (anfetamina e seus análogos) podem ou não ter uma actividade directa no TAAR1 (Bunzow *et al.*, 2001). Os estudos iniciais indicaram que vários análogos da anfetamina, incluindo a D-anfetamina, L-anfetamina, d-metanfetamina e (\pm)-MDMA, pode induzir o aumento de AMPc em células embrionárias de rim humano, expressando de forma estável receptores TAAR1 de rato. Outros grupos confirmaram essas observações em ratinhos, ratos, macacos e em receptores TAAR1 humanos expressos em diversos sistemas celulares heterólogos (Miller *et al.*, 2005; Reese *et al.*, 2007; Wainscott *et al.*, 2007; Xie e Miller, 2007; Xie *et al.*, 2007). Todos estes estudos demonstraram convincentemente que muitos análogos da anfetamina (e ela própria) podem activar, *in vitro*, o receptor TAAR1 (Sotnikova *et al.*, 2009). É importante de notar que o intervalo de concentração da d-anfetamina (0,136 – 1,12 μ M) e do MDMA (0,370 μ M) activo para o TAAR1 humano está dentro dos níveis de concentração no plasma alcançável pela administração de anfetamina em humanos (Asghar *et al.*, 2003) ou MDMA em primatas (Bowyer *et al.*, 2003). Em consumidores crónicos quer de anfetamina quer de metanfetamina, as concentrações plasmáticas de ambos os compostos podem chegar a atingir a zona mais elevada do intervalo dos micromolar (Peters *et al.*, 2003). É de notar também que a interacção de diversas anfetaminas

com os DAT foi encontrada no intervalo 0,025 a 2,650 μM (Rothman *et al.*, 2001). Deste modo, é altamente provável que a activação do TAAR1 pelos análogos da anfetamina possa ocorrer *in vivo* e ter consequências fisiológicas significativas, podendo o TAAR1 desempenhar um papel importante nos processos neuronais envolvidos nos distúrbios relacionados com a toma de anfetamina ou nas respostas terapêuticas à anfetamina ou compostos relacionados (Sotnikova *et al.*, 2009).

No que respeita ao mecanismo de envolvimento do TAAR1 na acção da anfetamina e regulação da transmissão geral monoaminérgica, estão actualmente a ser investigadas três possibilidades (Sotnikova *et al.*, 2009). Primeiro, o TAAR1 pode interagir directamente com o DAT, afectando deste modo a neurotransmissão da DA através da modulação do funcionamento do DAT. De facto, estudos recentes demonstraram a co-expressão do TAAR1 com o DAT num sub-conjunto de neurónios dopaminérgicos da substância nigra, tanto em ratinhos como em macacos Rhesus. Mais ainda, o TAAR1 de localização intracelular, activado pela anfetamina, via AMPc, activa as proteínascinasas C e A que por sua vez irão fosforilar o DAT e levar à sua internalização; a acumulação de DA no citoplasma induzirá a reversão dos transportadores que, embora fosforilados, permanecem na membrana, aumentando o efluxo de DA do terminal nervoso e contrariando a respectiva captação (Xie e Miller, 2007; Xie *et al.*, 2007; para revisão, Miller, 2011). A segunda possibilidade sugere que o TAAR1 localizado em corpos celulares de neurónios dopaminérgicos possa modular directamente a actividade destes neurónios em resposta a vários compostos activos (Lindemann *et al.*, 2008). Finalmente, é possível que o TAAR1 interaja directamente com os receptores de DA como um heterodímero ou ao nível da sinalização intermédia, proporcionando desta forma uma importante influência modulatória sobre a neurotransmissão dopaminérgica (Sotnikova *et al.*, 2009).

3. SISTEMA GASTROINTESTINAL

O sistema GI é dividido pelo tracto GI, que é composto pela boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado e intestino grosso, e pelos órgãos acessórios que são constituídos pelas glândulas salivares, fígado, vesícula e pâncreas. Estes últimos apesar de não fazerem parte do tracto GI, secretam substâncias através dos seus ductos (Vander *et al.*, 2003).

3.1 ESTRUTURA DA PAREDE INTESTINAL

A parede intestinal contém estruturas especializadas que lhe permite aumentar a superfície de contacto do intestino e deste modo aumentar a absorção. Essas estruturas são as vilosidades e as microvilosidades. As primeiras são projecções da mucosa que se estendem para o lúmen. A superfície de cada vilosidade é coberta por uma camada de células epiteliais cuja superfície membranar forma projecções chamadas de microvilosidades. A parede intestinal é ainda dividida em quatro camadas: a mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa, como se pode ver na Figura 8. A mucosa é uma camada secretora e absorvente constituída pelo epitélio, lâmina própria e pela *muscularis mucosae*. O epitélio consiste numa camada simples de células epiteliais alternadas com células exócrinas e endócrinas que secretam muco para o lúmen e libertam hormonas para a corrente sanguínea, respectivamente. O epitélio é suportado pela lâmina própria que é uma fina camada de tecido conjuntivo. Por sua vez, a lâmina própria contém inúmeros nódulos linfáticos, pequenos vasos sanguíneos e fibras nervosas. Externo à lâmina própria encontra-se uma fina camada de músculo liso, *muscularis mucosae*, que separa a mucosa da camada seguinte. A submucosa é uma camada relativamente espessa e muito vascularizada. Contém uma rede de células nervosas, vasos linfáticos e sanguíneos que se projectam para camadas adjacentes e contém ainda o plexo submucoso (ou plexo de Meissner) que proporciona uma automática inervação à *muscularis mucosae*. A camada muscular é responsável pela actividade contráctil do tracto GI, que por sua vez, é constituída por dois tipos de camadas compostas por células musculares lisas: a camada circular e a camada longitudinal. A primeira permite o estreitamento do lúmen e a última leva ao encurtamento do tubo GI. O plexo mientérico (ou plexo de Auerbach) está localizado entre as duas camadas musculares e fornece uma grande rede nervosa ao tracto GI, incluindo neurónios e gânglios para ambos os sistemas simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autónómico. Por último, a serosa rodeia a superfície exterior do tracto GI e está anexada ao mesentério, que suporta e protege o tracto GI na cavidade abdominal (Vander *et al.*, 2003, Sherwood, 2008).

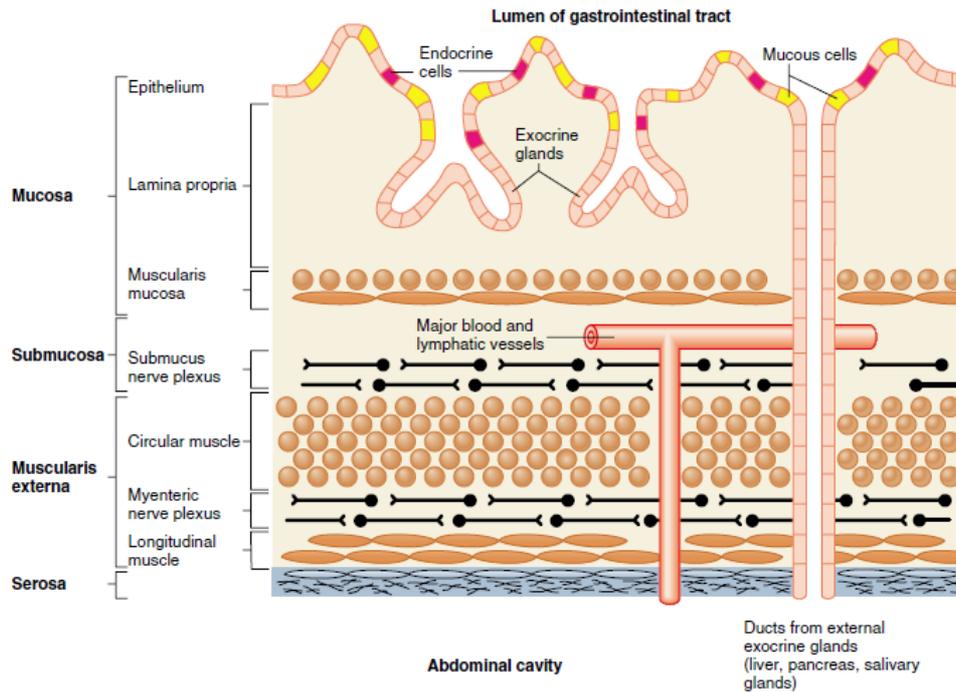


Figura 8 – Estrutura da secção longitudinal da parede gastrointestinal (retirado de Vander *et al.*, 2003)

3.2 CONTRACÇÃO DO MÚSCULO LISO INTESTINAL

A maior parte das células do músculo liso são maioritariamente encontradas nas paredes de órgãos ocos e tubos, como é o caso dos intestinos. As células musculares lisas da parede intestinal apresentam uma morfologia alongada e fusiforme, possuindo apenas um núcleo e comportando-se de forma unitária. Ao contrário das células musculares esqueléticas, uma única célula do músculo liso não se estende por todo o comprimento do músculo, estando tipicamente dispostas em folhas. Cada célula apresenta três tipos de filamentos: filamentos espessos de miosina, que são mais espessos no músculo esquelético; filamentos finos de actina, que contêm tropomiosina mas que não têm a proteína reguladora troponina; e filamentos intermédios de desmina, que não participam directamente na contracção, mas que fazem parte do citoesqueleto, permitindo a transmissão da força contráctil a toda a célula. Estes filamentos entrelaçam-se uns nos outros. O músculo liso não apresenta um aspecto estriado devido ao facto dos miofilamentos não se encontrarem agrupados em sarcómeros nem se organizarem em miofibrilhas, contrariamente ao músculo esquelético. Pela falta de sarcómeros, o músculo liso não tem discos Z, mas possui corpos densos que contêm a mesma proteína que aquela encontrada nas discos Z. Os corpos densos estão posicionados ao longo da célula muscular lisa assim como

anexadas à superfície interna da membrana plasmática (sarcolema). Assim, os filamentos de actina estão ancorados aos corpos densos que estão distribuídos no sarcoplasma e sarcolema e cuja coesão é mantida pelos filamentos intermédios de desmina (Figura 9). Para além dos corpos densos, o sarcolema apresenta cavéolas que se definem como sendo invaginações membranares que contêm depósitos de cálcio. As células do músculo liso estão unidas através de fendas de junção (*gap junctions*) e desmossomas. As *gap junctions* estão especialmente presentes na camada de músculo circular e permitem a passagem de moléculas regulatórias intracelulares e de correntes iónicas envolvidas na geração de potenciais de acção, facilitando deste modo a condução eléctrica directa entre as várias células (Olsson e Holmgren, 2001; Hansen, 2003; Sherwood, 2008; Fox, 2006; Webb, 2003). Relativamente aos desmossomas, estes para além de contribuírem para a adesão intercelular, permitem a transmissão de força de contracção desenvolvida por uma célula para a célula seguinte. Deste modo, o conjunto das células do músculo liso intestinal comporta-se como um sincício funcional, isto é, como um grupo interligado, funcionando mecânica e electricamente como uma unidade, sendo por isso este tipo de músculo liso denominado de músculo liso visceral ou unitário (Sherwood, 2008).

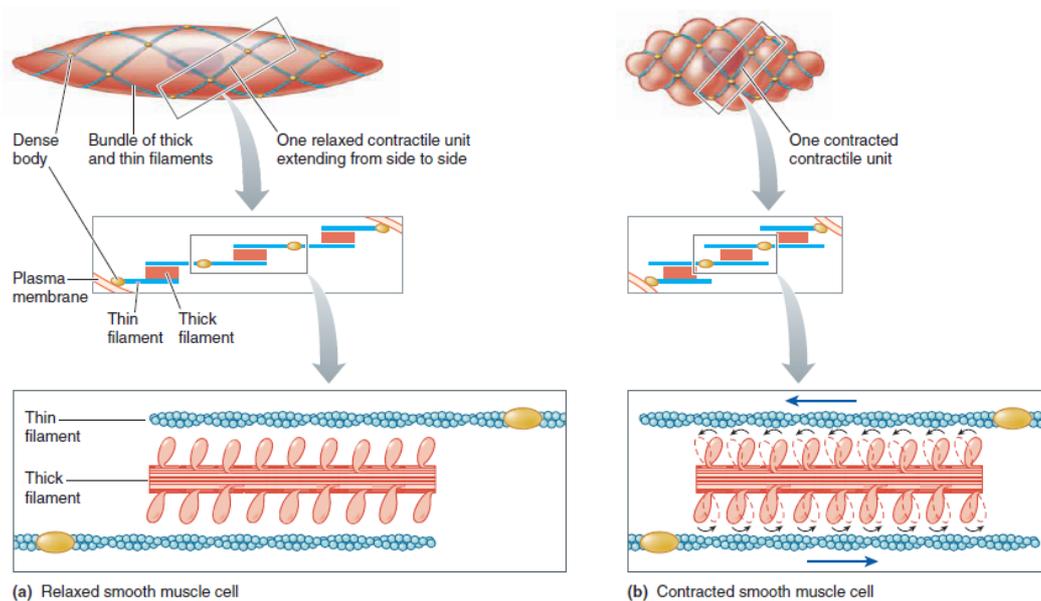


Figura 9 – Organização dos filamentos de actina e miosina nas células do músculo liso em estado de relaxamento (a) e de contracção (b) (retirado de Sherwood, 2008)

3.2.1 MECANISMO SUBJACENTE À CONTRACÇÃO DO MÚSCULO LISO INTESTINAL

A motilidade intestinal reporta-se às contracções musculares que propulsionam o conteúdo luminal e que são geradas pelo músculo liso da parede do tracto GI. Na origem do processo de contracção do músculo liso pode estar, um dos seguintes mecanismos: activação mecânica da actina e miosina; activação de receptores através da acção de hormonas ou neurotransmissores; alteração do potencial de membrana através da activação de canais iónicos ou por propagação de potenciais de acção; acção das células intersticiais de Cajal (CIC) (Webb, 2003).

A contracção do músculo liso é iniciada pelo aumento na concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}). O aumento do Ca^{2+} citoplasmático é devido à libertação de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático, ou então através do influxo de cálcio pelos canais iónicos (Sherwood, 2008; Webb, 2003). O mecanismo relativo à libertação de cálcio através do retículo sarcoplasmático envolve vias de transdução de sinal em resposta a um estímulo neurohumoral externo (Figura 10). Aquando da ligação do agonista (neurotransmissor ou hormona) a um receptor específico, a fosfolipase C é activada produzindo, a partir do lípido membranar fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (*phosphatidylinositol 4,5-biphosphate* – PIP₂), dois mensageiros secundários: inositol 1,4,5-trifosfato (inositol 1,4,5-trisphosphate – IP₃) e o diacilglicerol (diacylglycerol – DAG). O IP₃ liga-se a receptores específicos do retículo sarcoplasmático causando a libertação de cálcio para o sarcoplasma. O cálcio, juntamente com o DAG, activa a proteína cinase C (*protein kinase C* – PKC) que por sua vez fosforila outras proteínas específicas, como os canais de Ca^{2+} . No entanto, a contracção depende do estado de fosforilação da cadeia leve de miosina (*myosin light chain* – MLC). O aumento do cálcio vai permitir a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, activando a MLC cinase (*myosin light chain kinase* - MLCK), que posteriormente fosforila a MLC, permitindo que haja a formação de pontes cruzadas entre a actina e a miosina. A MLCK está ainda envolvida na estimulação da actividade de Mg^{2+} -ATPase das cabeças de miosina ocorrendo hidrólise de ATP. Esta reacção é necessária para que os filamentos de actina e miosina deslizem uns sobre os outros, levando ao encurtamento das células musculares lisas, ou seja, à contracção (Webb, 2003; Hansen, 2003; Sherwood, 2008).

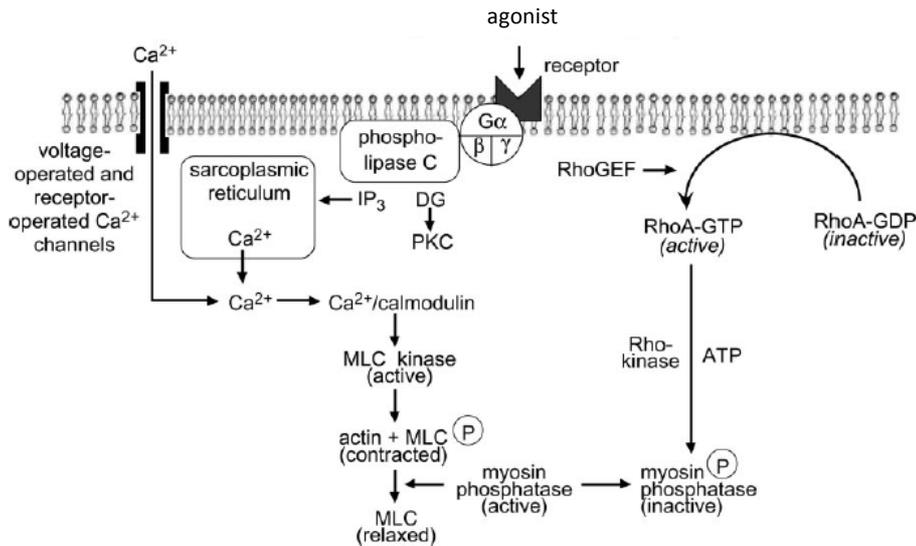


Figura 10 – Regulação da contração do músculo liso (adaptado de Webb, 2003)

3.2.2 MECANISMO SUBJACENTE AO RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO INTESTINAL

O relaxamento do músculo liso ocorre pela remoção do estímulo contráctil ou pela acção directa de substâncias que estimulam a inibição do mecanismo contráctil (Webb, 2003). Este processo requer a diminuição intracelular da concentração de Ca^{2+} e o aumento da actividade da MLC fosfatase (*myosin light chain phosphatase* – MLCP) (Figura 11). Os mecanismos inerentes à remoção de Ca^{2+} citosólico envolvem o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática. A captação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático é dependente da hidrólise de ATP. Na membrana do retículo existem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPases que quando fosforiladas, ligam-se a dois Ca^{2+} , que são translocados para o lado luminal do retículo sarcoplasmático e libertados no seu interior. O Mg^{2+} é necessário para a actividade da enzima, que se liga ao local catalítico da ATPase para mediar a reacção. A membrana plasmática também contém $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPases, proporcionando um mecanismo adicional para a redução da concentração de Ca^{2+} na célula. Esta ATPase é diferente visto que esta possui um domínio auto-inibitório que pode ser ligado pela calmodulina, causando a estimulação da bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática. O trocador antiporte de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também é encontrado na membrana plasmática e ajuda na diminuição do cálcio intracelular. Como consequência, o Ca^{2+} desliga-se da calmodulina e a MLCK permanece inactiva. Por sua vez, a MLCP é activada catalizando a desfosforilação das MLC, promovendo o relaxamento do músculo liso (Webb, 2003).

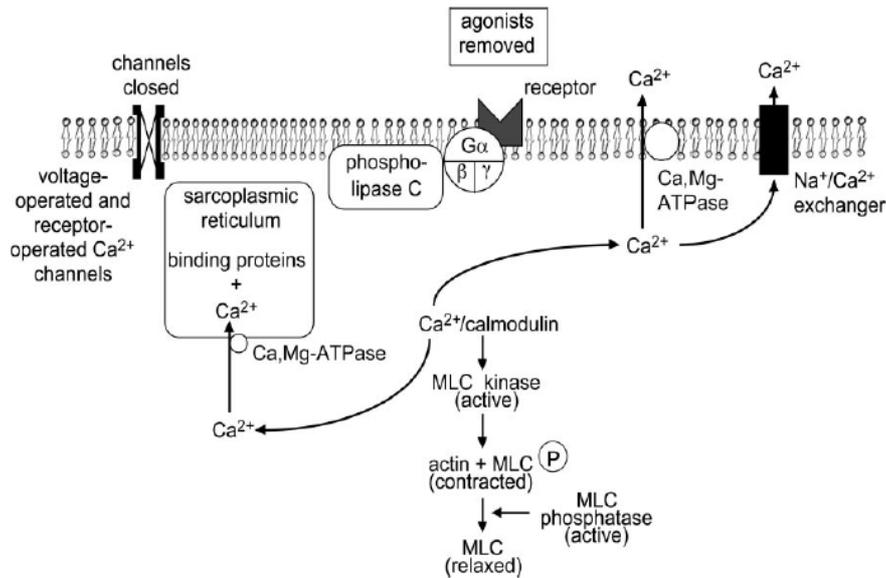


Figura 11 – Regulação do relaxamento do músculo liso (retirado de Webb, 2003)

3.2.3 CONTRACÇÃO TÓNICA *VERSUS* CONTRACÇÃO FÁSICA

A contracção do músculo liso pode ser agrupada em duas categorias, em função da dinâmica do Ca^{2+} : contracção fásica e contracção tónica (Sherwood, 2008; Hansen, 2003). O tónus muscular existe devido ao baixo potencial de repouso do músculo liso (-55 a -40 mV) e para o qual canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem estão abertos, permitindo o influxo deste catião divalente e consequentemente a manutenção do estado parcial de contracção (Sherwood, 2008). No entanto, a tonicidade pode igualmente ser regulada pela estimulação nervosa contínua de baixa intensidade ou por factores hormonais (Sherwood, 2008). As contracções fásicas rítmicas intestinais produzem movimentos propulsivos do conteúdo luminal (peristaltismo). A frequência máxima e a direcção de propagação destas contracções são reguladas por ondas lentas que são originadas pela actividade *pacemaker* das CIC existentes no plexo mientérico e na camada circular do tracto GI (Hirst e Edwards, 2004 Hansen, 2003; Čamborová *et al.*, 2003). Estas células estabelecem contacto entre si, com as células musculares e com os terminais nervosos, iniciando ritmicamente a actividade eléctrica, facilitando deste modo, a potenciação da corrente, ou seja, a origem da onda lenta (Hansen, 2003). É ainda relevante referir que estas células *pacemaker* são espontaneamente activas a valores de potencial de repouso, enquanto que as células do músculo liso continuam com os mesmos valores de potencial. Em condições experimentais, as correntes de influxo dos canais de cálcio sensíveis à voltagem nas

CIC, são activadas a valores de potencial mais baixo (mais negativo) que os canais das células musculares. No entanto, tem de ocorrer a despolarização das CIC para que haja a activação das correntes *pacemaker* (Čamborová *et al.*, 2003). Deste modo, a ritmicidade da contracção da parede GI é originada através da propagação de ondas lentas iniciadas nas zonas onde as CIC se encontram. Uma onda lenta típica, que se propaga em todas as direcções, estendendo-se às células vizinhas do músculo liso, consiste na seguinte sequência: despolarização rápida, repolarização parcial, *plateau* sustentado e repolarização completa. Na maioria dos casos, quando se atinge o limiar, ocorrem potenciais *spike* que se sobrepõem à fase de *plateau* da onda lenta. Os potenciais *spike* são despolarizações membranares que são muito mais curtas que as ondas lentas, intensificando a amplitude do *plateau* (Hansen, 2003; Huizinga e Lammers, 2009; Sherwood, 2008; Čamborová *et al.*, 2003).

3.3 REGULAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

A motilidade e secreção intestinal são reguladas pela acção da inervação extrínseca, simpática e parassimpática, e da inervação intrínseca fornecida pelo sistema nervoso entérico (SNE) e por hormonas, incluindo a secretina, insulina, factor de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor* – EGF), gastrina, taquinina e somatostatina (Benarroch, 2007). Alguns destes peptídeos são libertados a partir das células endócrinas da mucosa GI após uma refeição ou em resposta a um estímulo mecânico/químico do conteúdo GI (Ahlman e Nilsson, 2001).

O vínculo entre o SNC e o tracto GI é estabelecido através da inervação autonómica extrínseca: as vias parassimpáticas favorecem a actividade do órgão por acção da ACh, enquanto que as vias simpáticas contribuem para a redução da mesma por acção da NA (Noback *et al.*, 2005). Apesar do SNE controlar a motilidade e secreção intestinal independentemente da inervação extrínseca (propriedade que lhe valeu o epíteto de mini-cérebro (Benarroch, 2007; Wood *et al.*, 1999)), esta tem um papel modulatório na actividade do SNE. O SNE controla a motilidade e secreção através de reflexos locais que são desencadeados por diversos estímulos, incluindo distensão local da parede intestinal, distorção da mucosa e conteúdo químico do lúmen. A camada circular e longitudinal da musculatura, as glândulas secretoras e a vasculatura são considerados sistemas efectores do SNE, reflectindo a actividade

neuronal integrada destes sistemas (Wood *et al.*, 1999). Os neurónios entéricos estão classificados em diferentes categorias baseadas nas suas propriedades funcionais, electrofisiológicas e histoquímicas. Estes incluem os neurónios aferentes primários intrínsecos (*intrinsic primary afferent neurons* – IPANs), interneurónios, neurónios motores, neurónios secretomores e neurónios vasomotores. Quanto à sinalização química do SNE, esta é exercida através da acção de neurotransmissores e neuropeptídeos de acção excitatória, como a ACh, a serotonina e a substância P e de acção inibitória, como a NA, polipeptídeo intestinal vasoactivo (*vasoactive intestinal polipeptide* – VIP), neuropeptídeo Y e o óxido nítrico (*nitric oxide* – NO). O ATP pode ter uma acção tanto inibitória como excitatória, consoante a localização e o tipo de receptores em que actua. Os IPANs estão localizados em ambos os plexos (submucoso e mientérico) e são os responsáveis pela iniciação da resposta fisiológica à digestão. A sua activação constitui o início de um circuito neuronal que irá coordenar a motilidade e secreção intestinal. Os IPANs estabelecem sinapses com interneurónios (maioritariamente colinérgicos) e neurónios mientéricos ascendentes e descendentes. O reflexo ascendente excitatório envolve neurónios motores que utilizam ACh e substância P e provocam contracção da musculatura lisa no local da estimulação. Enquanto que o reflexo descendente inibitório envolve neurónios motores que utilizam NO, VIP, ATP e neuropeptídeo Y em diversas combinações, provocando o relaxamento da musculatura lisa. O reflexo peristáltico é coordenado pela acção de interneurónios colinérgicos que recebem estímulos dos IPANs e projectam-nos quer para os neurónios motores excitatórios quer para os inibitórios. As influências excitatórias e inibitórias dos neurónios motores são retransmitidas às células musculares lisas do intestino através das CIC. O SNE dispõe de mecanismos neuronais capazes de controlar a actividade das CIC e das células secretoras (neurónios secretomotores) que estão presentes na mucosa regulando a secreção intestinal de fluidos e electrólitos e ritmicidade (Costa *et al.*, 2000; Benarroch, 2007; Wood *et al.*, 1999; Hirst e Edwards, 2004, Olsson e Holmgren, 2001).

3.3.1 A ACETILCOLINA E O SISTEMA GASTROINTESTINAL

A ACh é um dos neurotransmissores mais relevantes na modulação da função intestinal pelas seguintes razões: i) é o principal mediador parassimpático; ii) as vias neuronais entéricas são na sua grande maioria colinérgicas; iii) é o principal

neurotransmissor excitatório da contracção das células musculares lisas (Hirota e McKay, 2006). Este neurotransmissor é sintetizado por conversão catalítica da acetil-CoA e colina em ACh e CoA pela colina acetiltransferase. Depois da sua síntese, a ACh é transportada via transportador vesicular de ACh para as vesículas sinápticas. Após o potencial de acção, a ACh é libertada a partir dos terminais nervosos, sendo posteriormente degradada pela acetilcolinesterase, uma enzima muito abundante na fenda sináptica, permitindo o término rápido da acção deste neurotransmissor (Hirota e McKay, 2006; Olsson e Holmgren, 2001).

Os receptores muscarínicos pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e são normalmente expressos no tracto GI sendo de absoluta importância para a função do órgão. Os tecidos e tipos de células que expressam estes receptores são diversos, incluindo as glândulas salivares, o músculo liso e as células da mucosa do estômago e do intestino (Tobin *et al.*, 2009). Periféricamente, os receptores muscarínicos foram considerados como um grupo homogéneo de receptores provocando tanto a contracção do músculo liso ou a secreção glandular (Caulfield *et al.*, 1998). Actualmente, os receptores muscarínicos estão agrupados em cinco subtipos: M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅. Originalmente, pensava-se que o subtipo de receptores muscarínicos que mediava os efeitos metabotrópicos da ACh em células não-neuronais era o M₃ (Goyal, 1988). No entanto, foi reconhecido que outros subtipos de receptores muscarínicos podem ser encontrados em glândulas salivares assim como em células do músculo liso. Mais tarde, foi sugerido que estes receptores estão implicados no controlo da inflamação, crescimento e proliferação celulares. Estudos revelaram que os subtipos de receptores muscarínicos envolvidos na resposta contráctil do músculo liso GI são os receptores M₂ e M₃. Estes receptores estão ainda envolvidos indirectamente no controlo simpático do músculo liso GI (Tobin *et al.*, 2009). A tabela I resume a classificação dos diversos receptores muscarínicos expressos em rato, ratinho e humano. Estes estão classificados de acordo com características estruturais, mecanismos de transdução e perfil farmacológico, tendo como referência os dados disponibilizados pela IUPHAR (Birdsall *et al.*, 2012). Os receptores M₂ e M₃ estão ainda descritos em neurónios colinérgicos e não colinérgicos, interneurónios e em neurónios motores dos plexos submucoso e mientérico e ainda possuem uma localização ganglionar (Mandl e Kiss, 2007). Deste modo, estes receptores estão envolvidos na modulação das vias neuronais que

controlam e regulam a actividade do sistema GI, traduzindo-se na libertação de ACh dos neurónios motores (Mandl e Kiss, 2007; Olsson e Holmgren, 2001).

Tabela I - Classificação e caracterização dos receptores muscarínicos

Tipo de Receptor	Via de Transdução, Distribuição e Função
M₁	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC, glândulas salivares, coração, olhos.</p> <p>Função: Aprendizagem e memória, neuromodulação, inibição das correntes M.</p>
M₂	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC, coração, glândulas salivares, músculo liso;</p> <p>Função: Bradicardia, contracção do músculo liso, hipertermia, diminuição da libertação pré-sináptica de neurotransmissores.</p>
M₃	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC, glândulas salivares, glândulas exócrina, músculo liso;</p> <p>Função: Contracção do músculo liso, secreção glandular, diminuição da libertação pré-sináptica de neurotransmissores.</p>
M₄	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC;</p> <p>Função: Regulação do receptor da dopamina D₁ que estimula a actividade locomotora.</p>
M₅	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC;</p> <p>Função: Desconhecida.</p>

3.3.2 A HISTAMINA NO SISTEMA GASTROINTESTINAL

A histamina desempenha funções importantes e distintas no sistema GI tais como a produção de ácido gástrico, modulação da motilidade GI, alteração da secreção iónica da mucosa, contracção do músculo liso, vasodilatação e controlo epitelial e

endotelial (Sander *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008). A histamina é sintetizada a partir do aminoácido histidina através de descarboxilação oxidativa pela enzima histidina descarboxilase. A maioria da histamina está armazenada em grânulos existentes nos mastócitos (células do sistema imunitário) e nas células enterocromafins-*like* (EC-*like*) presentes no estômago (Haas *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2000). Uma pequena componente histaminérgica tem origem neuronal no SNC e no SNE. No entanto, como a histamina não é sintetizada por neurónios entéricos, esta não é considerada como um neurotransmissor no intestino, tendo origem essencialmente nos mastócitos. Nos neurónios, a histamina é transportada através do VMAT para o interior de vesículas. Após a sua libertação, o fim da resposta à histamina é realizada através da histamina metiltransferase no SNC e pela MAO, e pela diamina oxidase nos tecidos periféricos (Haas *et al.*, 2008; Nemeth *et al.*, 1984). A acção da histamina tem vindo a ser associada a problemas gastrointestinais como a diarreia, apesar da sua principal função no tracto GI ser a secreção gástrica (Wood, 2006). A histamina actua em receptores que estão localizados em neurónios entéricos do plexo mientérico e submucoso estimulando a libertação de neurotransmissores como a ACh. Contribui também, de um modo directo, para a motilidade intestinal através de receptores H₁, localizados nas células de músculo liso da parede intestinal, provocando a sua contracção (Bertaccini *et al.*, 1992; Sander *et al.*, 2006). A tabela II resume a classificação dos diversos receptores histamínicos expressos em rato, ratinho e humano. Estes estão classificados de acordo com características estruturais, mecanismos de transdução e perfil farmacológico, tendo como referência os dados disponibilizados pela IUPHAR (Chazot *et al.*, 2012).

Tabela II - Classificação e caracterização dos receptores de histamina

Tipo de Receptor	Via de Transdução, Distribuição e Função
H ₁	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC, músculo liso das vias respiratórias, tracto GI, sistema cardiovascular, células endoteliais, linfócitos;</p> <p>Função: Contracção do músculo liso, regulação do apetite, estado de vigília.</p>
H ₂	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_s, estimulando a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC, estômago, útero, músculo liso vascular, coração;</p> <p>Função: Estimulação da secreção gástrica, relaxamento do músculo liso.</p>

H₃	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual: SNC, nervos periféricos, coração, pulmões, tracto GI, células endoteliais;</p> <p>Função: Autorreceptores pré-sinápticos.</p>
H₄	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual: Medula óssea, leucócitos;</p> <p>Função: Quimiotaxia dos mastócitos.</p>

3.4 A SEROTONINA NO SISTEMA GASTROINTESTINAL

A 5-HT, uma molécula sinalizadora muito importante no sistema GI, é sintetizada e armazenada em diversos tipos de células, maioritariamente nas células EC (90%) e em neurónios (10%) do intestino (Gershon e Tack, 2007; Hansen, 2003). É um mensageiro parácrino que activa tanto os neurónios aferentes primários intrínsecos como os extrínsecos, para iniciar, respectivamente, reflexos peristálticos e secretores e para transmitir informação ao SNC. Este neurotransmissor é igualmente utilizado pelos interneurónios mientéricos (Gershon e Tack, 2007). No entanto, dos neurónios que constituem o SNE apenas uma pequena quantidade contém 5-HT, sendo a maioria colinérgica. Assim a 5-HT actua principalmente como modulador da actividade neuronal, influenciando a contracção do músculo liso de modo indirecto, apesar de estarem descritos receptores de 5-HT no músculo liso. Actualmente estão descritos 7 tipos de receptores serotoninérgicos com diversos subtipos e a sua localização celular varia consoante a espécie (Hansen, 2003). Os receptores são metabotrópicos com 7 domínios transmembranares acoplados à proteína G, à excepção dos receptores 5-HT₃, que formam um canal iónico pentamérico. A tabela III resume a classificação dos diversos receptores da 5-HT expressos em rato, ratinho e humano. Estes estão classificados de acordo com características estruturais, mecanismos de transdução e perfil farmacológico, tendo como referência os dados disponibilizados pela IUPHAR (Lummis *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2011).

Tabela III – Classificação e caracterização dos receptores de 5-hidroxitriptamina

Tipo de receptor	Sub-tipo de receptor	Mecanismo de transdução, distribuição e Função
5-HT ₁	5-HT _{1A}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC, plexo mientérico, músculo liso vascular, macrófagos, rins;</p> <p>Função: hiperpolarização neuronal, autorreceptor a nível central, heterorreceptor no plexo mientérico, inibição da libertação de neurotransmissores, contracção do músculo liso vascular, antinocicepção, comportamento e aprendizagem, actividade locomotora, estimulação da capacidade fagocítica, estimulação da proliferação celular.</p>
	5-HT _{1B}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: músculo liso vascular, endotélio vascular, timo, baço, linfócitos, SNC, neurónios autonómicos;</p> <p>Função: autorreceptor/heterorreceptor, inibição da libertação de neurotransmissores, contracção do músculo liso vascular.</p>
	5-HT _{1D}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC, neurónios autonómicos, músculo liso vascular;</p> <p>Função: autorreceptor/heterorreceptor, inibição da libertação de neurotransmissores, contracção do músculo liso vascular.</p>
	5-HT _{1E}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC;</p> <p>Função: desconhecida.</p>
	5-HT _{1F}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC, útero, mesentério, coração, timo, linfócitos, baço;</p> <p>Função: desconhecida.</p>

5-HT ₂	5-HT _{2A}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC e SNP, endotélio vascular, músculo liso vascular, músculo liso dos brônquios, bexiga, intestino delgado; plaquetas;</p> <p>Função: contracção do músculo liso, agregação plaquetária, potenciação da dor inflamatória periférica.</p>
	5-HT _{2B}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC, endotélio vascular, músculo liso vascular, músculo liso do útero, fundus do estômago, intestino delgado, intestino grosso, pulmões, traqueia, coração, rins, fígado, ovários, músculo esquelético, testículos, placenta, próstata, pâncreas;</p> <p>Função: contracção do músculo liso, regulação da diferenciação e proliferação do coração adulto e em desenvolvimento.</p>
	5-HT _{2C}	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC;</p> <p>Função: analgesia, ansiedade, hiperlocomoção, redução do consumo de comida, regulação do sono, regulação da resposta ao stress.</p>
5-HT ₃	<p>Mecanismo de transdução: Receptor ionotrópico, com permeabilidade a iões monovalentes (Na⁺ e K⁺) e Ca²⁺, contribuindo para o aumento da [Ca²⁺]_i e consequentemente para a despolarização do neurónio;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC e SNP, neurónios entéricos;</p> <p>Função: modulação da actividade e transmissão neuronal, excitação simpática e parassimpática, controlo de reflexos a nível cardiovascular, respiratório, urinário e gastrointestinal; reflexo do vômito; nocicepção; controlo do tónus e secreção intestinais.</p>	
5-HT ₄	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína G_s, estimulando a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC, músculo liso do esófago, do intestino delgado e do intestino grosso, músculo cardíaco, neurónios entéricos, neurónios respiratórios;</p> <p>Função: relaxamento/contracção do músculo liso, aumento do ritmo cardíaco, modulação da transmissão neuronal, plasticidade sináptica, aprendizagem e memória, estímulo do consumo de comida.</p>	

5-HT ₅	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado à proteína G_i/G_o, inibindo a adenil ciclase (primário); ou acoplado a proteína G_q/G₁₁, estimulando a fosfolipase C (secundário);</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC;</p> <p>Função: ainda não totalmente definida, modulação do comportamento e possível controlo do ritmo cardíaco.</p>
5-HT ₆	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína G_s, estimulando a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC, timo, linfócitos, baço;</p> <p>Função: aprendizagem e memória, modulação da transmissão colinérgica e dopaminérgica.</p>
5-HT ₇	<p>Mecanismo de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína G_s, estimulando a adenil ciclase;</p> <p>Distribuição tecidual/Função: SNC, coração, músculo liso vascular, músculo liso do intestino delgado e intestino grosso, timo, linfócitos, baço;</p> <p>Função: relaxamento do músculo liso, nocicepção, antinocicepção, regulação do ritmo cardíaco, hipotermia, hipotensão, aprendizagem e memória.</p>

Apesar de ter sido descrito que o receptor 5-HT_{1P} medeia uma resposta pós-sináptica excitatória desencadeada por um sub-conjunto de interneurónios mientéricos, este receptor ainda não foi oficialmente aceite pela IUPHAR (Gershon, 1999). Contudo, alguns autores sugerem que o receptor 5-HT_{1P} poderá ser o receptor 5-HT₇, apesar de este ser maioritariamente expresso no SNC, o RNAm do receptor 5-HT₇ foi encontrado no íleo e cólon de humanos, mediando o relaxamento do músculo liso (Bard *et al.*, 1993).

Três subtipos de receptores 5-HT foram identificados em neurónios colinérgicos. Um dos quais é o receptor 5-HT_{1A}. Este receptor pré-sináptico dos terminais colinérgicos do plexo mientérico comporta-se como um heterorreceptor somatodendrítico. Deste modo, o seu efeito reflecte-se na diminuição da libertação de ACh e na redução da actividade intestinal. Pensa-se, ainda, que este receptor possa estar associado com a abertura de canais de K⁺ e com a inibição da fosfolipase C (Dietrich e Kilbinger, 1996; Foong *et al.*, 2010).

Os receptores 5-HT_{2A/2B}, sendo expressos nas células do músculo liso da parede do tracto GI, contribuem para a contracção intestinal (Andrade *et al.*, 2011). Em 1994,

Baxter e colaboradores identificaram os receptores 5-HT_{2B} como mediadores da contração da camada longitudinal do músculo liso no *fundus* de estômago de rato em resposta à 5-HT exógena. Por outro lado, em 2007, outro grupo de investigadores liderado por Komada observaram a intervenção dos receptores 5-HT_{2A/2B} na resposta contráctil da camada circular do músculo liso do *antrum* de estômago de rato à 5-HT exógena. A nível intestinal, experiências levadas a cabo em ratinhos *knockout* para o receptor 5-HT_{2A} mostraram que há ausência de contração das células do músculo liso do cólon em resposta à 5-HT exógena (Fiorica-Howells *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos funcionais em íleo de rato revelaram o envolvimento dos receptores 5-HT_{2A} na contração da camada longitudinal do músculo liso em resposta à 5-HT exógena, e em intestino delgado e cólon humanos o envolvimento dos receptores 5-HT_{2B}. Mais ainda, o RNAm que codifica o receptor 5-HT_{2B} foi identificado no intestino delgado de rato, ratinho e humano. (Briejer *et al.*, 1997; Borman *et al.*, 2002; Borman e Burleigh, 1995).

Quanto aos receptores 5-HT₃, estes estão descritos apenas a nível neuronal no SNC, no SNE, em neurónios sensoriais e em neurónios pré- e pós-ganglionares autonómicos. Estes receptores formam um canal iónico pentamérico que facilita o influxo de Na⁺ e Ca²⁺ e o efluxo de K⁺ resultando numa despolarização do neurónio. Deste modo, a sua principal função é a modulação da libertação de vários neurotransmissores a partir dos terminais nervosos (Lummis *et al.*, 2011). Em 2000, Bertrand e a sua equipa concluíram que a adição de 5-HT exógena activa os receptores 5-HT₃ desencadeando a geração de potenciais de acção nos terminais nervosos da mucosa. Estes receptores estão presentes em diversas regiões do intestino delgado e do intestino grosso de rato e humano e estão localizados em neurónios dos plexos mientéricos e submucoso, em neurónios que inervam as CIC e em células endócrinas (Niesler *et al.*, 2003; Michel *et al.*, 2005; Glatzle *et al.*, 2002). Assim, os receptores 5-HT₃ medeiam a libertação de ACh dos terminais do plexo mientérico provocando a contração de segmentos de íleo de cobaias, rato e ratinho (Bertrand *et al.*, 2000; Fox e Morton, 1990; Tuladhar *et al.*, 2000; Kiso *et al.*, 2001).

Os receptores 5-HT₄ foram identificados em neurónios do plexo mientérico e em células musculares lisas, aumentando a transmissão sináptica de neurónios colinérgicos, aumentando deste modo a actividade de neurónios motores que inervam o músculo liso intestinal (Hansen, 2003; Hoyer *et al.*, 1994). Tendo em conta que estes receptores modulam a neurotransmissão, estes vão influenciar o comportamento da

parede do sistema GI e das células secretoras, estimulando o esvaziamento gástrico em estômago de rato, ratinho, cobaia e humano; o reflexo peristáltico, ou seja, a contracção ascendente e relaxamento descendente, em rato, ratinho e humano; e a secreção intestinal de Cl^- , HCO_3^- e absorção de Na^+ em rato e de HCO_3^- em ratinho (Hegde *et al.*, 1995; Degen *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2002; Foxx-Orenstein *et al.*, 1996; Grider, 2003; Tuo *et al.*, 2004). Relativamente ao músculo liso, a activação dos receptores 5-HT₄ reflecte-se no relaxamento ou contracção, consoante a espécie e a região do tracto G: ocorre relaxamento do esófago e do íleo de rato; contracção do íleo de cobaia; relaxamento do cólon humano (devido à activação da adenil ciclase) e contracção da camada circular e longitudinal do cólon de rato (Tuladhar *et al.*, 1996; Tuladhar *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 1991; McLean e Coupar, 1996 A e B; Ono *et al.*, 2005; Mitsui *et al.*, 2005).

3.4.1 AS CÉLULAS ENTEROCROMAFINS

As células enterocromafins (EC) constituem a maior população celular endócrina no tracto GI, tendo sido a primeira célula endócrina a ser identificada. A designação destas células resulta da sua capacidade em ligar sais de crómio. Mais tarde, a capacidade de ligar e reduzir iões de prata deram-lhe um novo nome: células argentafins. A função destas células foi durante muito tempo desconhecida. Com a introdução de novas técnicas de investigação, as células EC demonstraram ter capacidade para a síntese de monoaminas, capacidade conhecida como APUD (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*). Estas células possuem ainda um papel fundamental na regulação da secreção, da motilidade e da percepção da dor visceral (Schäfermayer *et al.*, 2004). Estas células têm uma localização intraepitelial quase exclusiva, possuindo o seu domínio apical em contacto com o lúmen. O citoplasma das células EC é ocupado por um grande número de grânulos secretórios, sendo a 5-HT o principal produto de secreção (Ahlman H *et al.*, 2001). Com efeito, a maioria (90%) da 5-HT do organismo encontra-se em células EC, que sintetiza, armazena e liberta esta amina (Kidd *et al.*, 2008; Racké K. *et al.*, 1996). A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido triptofano através de hidroxilação e descarboxilação no citoplasma das células EC sendo transportadas para o interior dos grânulos secretórios através VMAT. *In vivo*, a libertação de 5-HT é sensível à estimulação mecânica ou à acidificação do lúmen do intestino. A 5-HT tem como alvo principal os

IPANs que irão activar outros circuitos neuronais que por sua vez iniciarão reflexos peristálticos e a actividade secretora intestinal. A terminação da acção da 5-HT é feita através da sua recaptação pelas células EC e por neurónios ou por degradação enzimática realizada pela MAO (Gershon, 1999; Gershon e Tack, 2007). Estudos levados a cabo por Agnes Schäfermayer em 2004 revelaram que existe um largo espectro de receptores especificamente expressos neste tipo de células, como é o caso dos receptores β -adrenérgicos, muscarínicos assim como os receptores GABA-érgicos. Além disso, as células EC parecem expressar alguns receptores do olfacto e do paladar, sugerindo possuir uma função fisiológica como “célula sentinela” no intestino.

Por fim, a modulação da libertação de 5-HT endógena a partir das células EC tem vindo a ser relacionada com a acção conjunta dos receptores 5-HT₃ e 5-HT₄. Em íleo de cobaias, humano e suíno, estes receptores parecem, respectivamente, estimular e inibir a libertação de 5-HT (Gebauer *et al.*, 1993; Schwörer e Ramadori, 1998). No entanto, como são resultados de estudos funcionais são ainda necessários estudos moleculares para comprovar a localização destes receptores neste tipo de células endócrinas.

3.5 A ANFETAMINA E AS *TRACE AMINES* NO SISTEMA GASTROINTESTINAL

Como já foi referido anteriormente, as TA (tiramina e β -PEA) são tradicionalmente vistas como aminas simpaticomiméticas de acção indirecta exercendo os seus efeitos através da libertação de NA dos terminais nervosos simpáticos, causando por isso vasoconstrição e aumento da pressão sanguínea arterial (Broadley, 2010). No entanto, surgiram recentemente evidências de que mecanismos não simpaticomiméticos poderiam estar envolvido na resposta vasoconstrictora. De facto, Fehler colaboradores (2010), em anéis de aorta de rato, observaram vasoconstrição pela β -PEA independente de uma acção simpaticomimética e inclusive observaram a expressão da proteína do TAAR1 por western blotting bem como o respectivo RNAm por PCR-RT. Herbert e colaboradores (2008) já tinham observado idênticos efeitos vasculares da p-tiramina (0,1 – 3 mM) e da β -PEA (0,3 – 10 mM) na artéria coronária de porco (para revisão, Broadley, 2010). Paradoxalmente, mas reforçando a ideia de um receptor específico para as TA, Varma e colaboradores (Varma & Chemtob, 1993;

Varma *et al.*, 1995) verificaram que em tiras de aorta de rato previamente contraídas, a tiramina em altas concentrações (100 μ M – 10 mM) induzia um relaxamento dependente da concentração e independente do endotélio e da activação de receptores α 2-adrenérgicos.

Para além dos efeitos directos vasculares independentes de mecanismos noradrenérgicos, e no que diz respeito a outras acções periféricas das TA, em estudos levados a cabo por Broadley e colaboradores, foram igualmente observados efeitos contrácteis das TA (β -PEA, 1 μ – 10 mM) em íleo de rato e cobaia independentes da activação de receptores de NA, de ACh, de histamina e de 5-HT, sendo mais uma vez provável a mediação desta resposta fisiológica pelos TAARs. Paradoxalmente, no mesmo estudo as TA relaxaram a vasculatura mesentérica, contrastando com a constrição observada na aorta de rato e de cobaia, resposta igualmente independente de uma acção simpaticomimética (Broadley *et al.*, 2009). De referir ainda que já no passado mais longínquo, foram realizados estudos quanto à possível actividade excitatória da anfetamina em três tipos de preparação do sistema GI - íleo isolado de cobaia, jejuno de coelho e estômago de rato – tendo a anfetamina contraído de forma consistente as três preparações. Segundo os autores, este efeito excitatório parecia ser devido à acção da anfetamina nos receptores de 5-HT, uma vez que o efeito excitatório era antagonizado pela dessensibilização com 5-HT (Innes *et al.*, 1969).

Recentemente a relação entre TA, TAARs, 5-HT e função intestinal foi reforçada pelo estudo sobre a regulação luminal de libertação de 5-HT por células EC humanas normais e neoplásicas, levado a cabo pelo grupo de investigação liderado por Kidd (2008). Este chegou à conclusão que existe a possibilidade das células EC possuírem na membrana receptores específicos (acoplados à proteína G e adenilciclase positivos) para as TA, substâncias odorantes e gustantes, que induzem a libertação de 5-HT (Kidd *et al.*, 2008). O modelo da célula EC com esses receptores está representado na Figura 12.

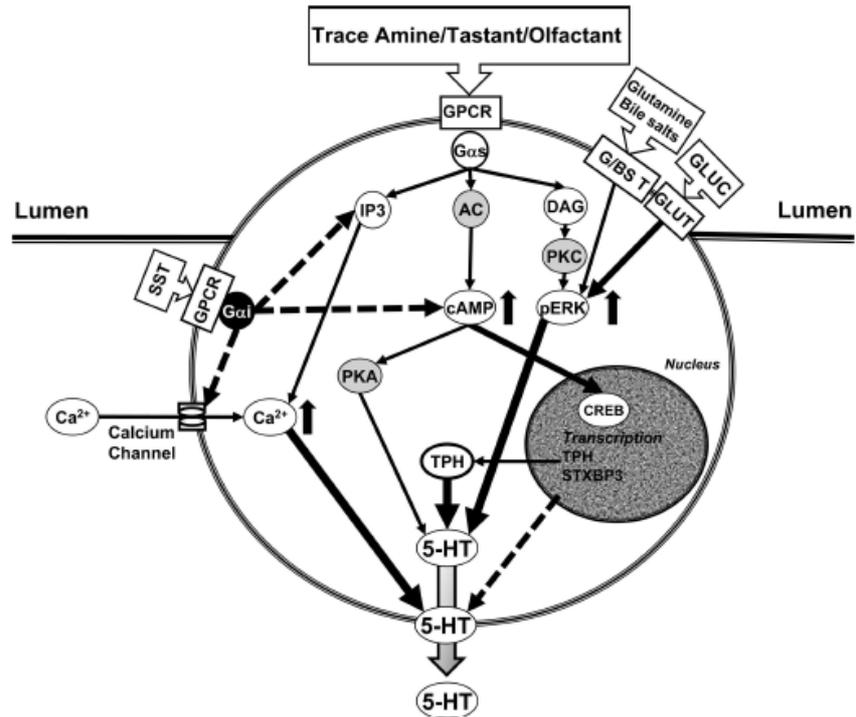


Figura 12 – Modelo do receptor acoplado à proteína G, ativado por TA, substâncias odorantes e gustantes que medeia a secreção das células EC (retirado de Kidd *et al.*, 2008)

Em 2009, Nozawa e colaboradores reforçam igualmente a ideia das EC libertarem 5-HT (responsável via intrínseca ou extrínseca pela motilidade GI) em resposta à composição química do lúmen intestinal e activação de receptores expressos à sua superfície.

CAPÍTULO 2

OBJECTIVOS

Como já foi referido no capítulo anterior, os efeitos gastrointestinais subjacentes à toma de anfetamina são imprevisíveis. Deste modo, tendo em vista o estudo dos mecanismos farmacológicos subjacentes a esses mesmos efeitos, foram definidos os seguintes objectivos:

1. Determinar se o mecanismo subjacente à contracção intestinal induzida pela anfetamina é directo ou indirecto
2. Através de estudos funcionais de contracção de músculo liso caracterizar farmacologicamente a resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina utilizando antagonistas selectivos de diferentes tipos de receptores;
3. Determinar o possível envolvimento dos TAAR1;
4. Avaliar a possível contribuição das células EC para o mecanismo de contracção intestinal induzido pela anfetamina;
5. Caracterizar a micro-anatomia de segmentos de íleo de rato e determinar a localização celular de receptores envolvidos no mecanismo de contracção intestinal induzida pela anfetamina, através de estudos histoquímicos/imunohistoquímicos;
6. Avaliar o impacto da administração *in vivo* de anfetamina na função intestinal através da observação da resposta contráctil do íleo isolado de rato, 24 horas após a administração de anfetamina;
7. Quantificar os níveis de monoaminas no estriado de rato, 24 horas após a administração *in vivo* de anfetamina, como medida de avaliar neurotoxicidade.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

1. MODELO ANIMAL

O modelo animal utilizado foi o rato Wistar macho com cerca de 8-10 semanas (200-300g), fornecidos pela Charles River (Barcelona, Espanha). Os ratos foram mantidos em armários de biotério ventilados com condições controladas de temperatura e humidade e ciclos de luz/obscuridade de 12 horas. Durante o período em que estiveram no biotério, os animais tiveram livre acesso a água e a alimentos próprios para roedores, bem como mudança da cama regular.

2. ISOLAMENTO E MONTAGEM DO ÓRGÃO

Os animais foram sacrificados por decapitação e a porção intestinal correspondente ao íleo foi isolada. Esta foi colocada imediatamente numa solução fisiológica de Krebs-Henseleit¹ fria e arejada com carbogénio (95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono). Posteriormente, o mesentério adjacente foi removido e a porção de íleo foi cortada em segmentos com cerca de 1,5 cm de comprimento, em que o conteúdo intestinal foi removido através de lavagens com a mesma solução. De seguida, os segmentos intestinais foram suspensos em hastes e colocados em banho de órgãos de 15 mL com solução fisiológica Krebs-Henseleit, mais uma vez arejada com carbogénio e mantida a 37°C (termóstato GFL), sob tensão óptima basal de 29,4 mN, de acordo com a metodologia descrita por Santos (2005) (Figura 13).



Figura 13 – Segmentos de íleo montados em banho de órgãos de 15 mL

¹ Solução de Krebs-Henseleit (composição em mmoles/L): NaCl 118,67; KCl 5,36; MgSO₄·7H₂O 0,57; CaCl₂ 1,90; KH₂PO₄·2H₂O 0,90; NaHCO₃ 25,0; glucose 11,1; pH 7,4.

A tensão óptima basal foi determinada em experiências realizadas anteriormente, nas quais se estudou a resposta contráctil do órgão a 100 μM de ACh sob diferentes tensões (Henriques, 2011). A tensão basal em cada experiência foi aquela que ocorreu espontaneamente no tecido submetido à tensão óptima, após o período de equilíbrio que se segue à montagem do órgão.

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – ESTUDOS FUNCIONAIS

Após um período de duas horas de equilíbrio com lavagens periódicas, para remover produtos de metabolismo e para recuperação das reservas de ATP e restauração do potencial de membrana por reactivação do transporte iónico dependente de ATP, registaram-se, com transdutores de força (Letica Scientific Instruments) ligados a um polígrafo de quatro canais (Polygraph 4006 – Letica Scientific Instruments), as contracções isométricas de curvas concentração-resposta (CR) de adições independentes à 5-HT (0,1 μM – 60 μM), à tiramina e à anfetamina (1 μM – 6000 μM) (Figura 14), na presença ou na ausência de diversos compostos, os quais foram adicionados ao banho de órgãos quinze minutos antes de cada dose da curva CR. Foram adicionados os seguintes compostos: 100 μM de reserpina (inibidor do transportador vesicular de monoaminas, VMAT), 1 μM de fluoxetina (inibidor da recaptção neuronal de 5-HT, isto é, do SERT), 1 μM de ritanserina (antagonista não selectivo dos receptores 5-HT₂), 1 μM de cetanserina (antagonista não selectivo dos receptores 5-HT_{2A/2C}), 0,25 e 0,05 de μM RS 127445 (antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2B}), 1 μM de atropina (antagonista não selectivo dos receptores muscarínicos), 1 μM de mepiramina (antagonista/agonista inverso dos receptores H₁), 1 e 5 μM de EPPTB (antagonista selectivo dos TAAR1) e 10 μM de prazosina (antagonista selectivo dos receptores α_1 -adrenérgicos). Após cada contracção, cada segmento foi lavado inúmeras vezes até a preparação atingir novamente o tónus basal de que se tinha partido. Inicialmente todos os segmentos de íleo foram sujeitos a 100 μM de ACh exógena para induzir directamente a contracção máxima do músculo liso do íleo e, desta forma, ser possível a comparação dos resultados de experiências diferentes.

Em todas as experiências foram utilizados segmentos controlo, aos quais se adicionou apenas o solvente apropriado para cada composto referido anteriormente.

Os resultados finais de cada experiência foram expressos em percentagem da resposta contráctil de cada segmento à ACh.

Nas experiências com o agonista 5-HT foram efectuadas duas curvas não cumulativas CR, tendo a primeira curva sido efectuada na ausência de qualquer fármaco antagonista. Neste caso cada segmento serviu de controlo de si próprio: as respostas contrácteis da segunda curva CR foram expressas em percentagem da contracção máxima obtida na primeira curva CR do respectivo segmento (nem sempre com a última dose de 5-HT), executada na ausência de qualquer composto. Os resultados finais de cada experiência foram expressos em percentagem da resposta obtida nos segmentos controlo.

Os resultados foram igualmente analisados em termos de mN de tensão como forma de traduzir em valores absolutos a eficácia/actividade intrínscas ($E_{máx}$) dos diferentes agonistas testados em induzir contracção. As potências dos agonistas estudados foram traduzidas em termos de pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da resposta máxima). Os valores de pEC_{50} foram obtidos por interpolação de cada curva concentração-resposta de adições independentes em escala semilogarítmica (% da contracção máxima versus logaritmo da concentração em mol/L), usando um programa de computador (CurveExpert, versão 1.4 para Windows). Assim os valores de $E_{máx}$ e pEC_{50} representam, respectivamente, a eficácia (capacidade contráctil máxima) e a potência de cada fármaco em induzir uma resposta, isto é, a contracção intestinal.

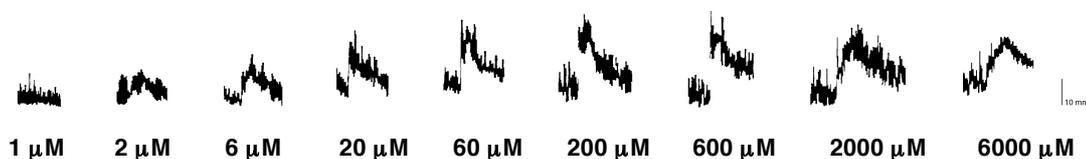


Figura 14 – Registos de uma curva não cumulativa concentração-resposta à anfetamina em íleo isolado de rato. Escala: 10 mm = 3,9 mN; 40 segundos

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DOS ESTUDOS FUNCIONAIS

Avaliaram-se as diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pEC_{50} calculados para cada agonista, bem como as diferenças entre as respostas contrácteis induzidas por cada dose das curvas CR de anfetamina/tiramina/5-HT na ausência (controlo) e na presença dos diferentes fármacos mencionados anteriormente. Para o efeito, foi utilizado o teste de *t* de *Student* para dados não emparelhados na determinação das diferenças estatísticas entre dois grupos de valores, enquanto que, para avaliar a significância das diferenças entre três ou mais grupos foi utilizada a análise de variância (*Analysis of variance* – ANOVA), seguida do teste de *Dunnnett* ou *Tukey* de múltiplas comparações (SPSS versão 17.0 para Windows). Os valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Neste trabalho todos os resultados, quer no texto, quer nos gráficos e tabelas, estão apresentados como média \pm erro padrão da média (*Standard Error of the Mean* – S.E.M.) do número de experiências (*n*) indicado.

5. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS NOS ESTUDOS FUNCIONAIS

Os reagentes utilizados na preparação da solução fisiológica de Krebs-Henseleit foram adquiridos na Panreac (Barcelona, Espanha) e foram produtos *pro analysi*. Para os estudos funcionais foram usados os seguintes fármacos: anfetamina, tiramina, cloridrato de acetilcolina, maleato de mepiramina, sulfato de atropina, cloridrato de 5-HT, reserpina (Sigma-Aldrich, St Louis, E.U.A.), tartarato de cetanserina, ritanserina, RS 127445, fluoxetina, prazosina (Tocris, Bristol, Reino Unido) e EPPTB (obtido através de protocolo de colaboração com a La Roche). As soluções foram preparadas com os solventes indicados pelos fabricantes

6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – ESTUDOS *IN VIVO*

Com o intuito de estudar o comportamento do rato após a administração de anfetamina e a sua neurotoxicidade, as possíveis consequências de tal administração na função intestinal, isto é, na resposta contráctil do íleo isolado de rato, e ainda

possíveis diferenças na micro-anatomia do mesmo, procedeu-se ao desenho de um protocolo experimental de modo a satisfazer essas mesmas necessidades.

6.1 GRUPOS DE ESTUDO

O protocolo experimental incluiu dois grupos de ratos: no grupo controlo foi administrado através de injeção i.p. uma única dose de solução salina de NaCl 0,9%; no grupo de estudo, os ratos foram submetidos a uma única injeção i.p. de anfetamina preparada em solução salina de NaCl 0,9% e cuja concentração foi de 15 mg/Kg.

Utilizaram-se 7 ratos do grupo injectado com o fármaco e 8 ratos injectados com a solução salina (ratos que sobreviveram as 24 horas). A percentagem de mortes entre o total de ratos que foram submetidos à injeção da solução salina de anfetamina foi de 22,2 % (contabilizando os ratos que foram submetidos à injeção da solução salina de anfetamina e que não sobreviveram as 24 horas).

6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL – ESTUDO COMPORTAMENTAL E ESTUDO FUNCIONAL

Após a pesagem dos ratos para saber qual o volume de solução a injectar, a temperatura dos animais foi medida com a ajuda de uma sonda própria para ratos. De seguida injectaram-se as soluções aos animais. Posteriormente, a temperatura foi medida de meia em meia hora, e o comportamento dos animais foi filmado. Os animais do grupo injectado com a solução salina de anfetamina não foram mantidos na mesma caixa que os animais do grupo controlo de forma a evitar qualquer comportamento de agressividade. Os animais foram sacrificados ao fim de 24 horas por decapitação. Foram recolhidos e congelados a -80°C os seguintes órgãos: estriado, coração e íleo. Foi ainda recolhido íleo que posteriormente foi fixado numa solução de formol tamponado, e íleo que foi utilizado para os estudos funcionais. Os estudos funcionais com o íleo isolado tanto de ratos controlo como de ratos sujeitos a 15mg/Kg de anfetamina seguiram a mesma metodologia já descrita, tendo-se efectuado apenas curvas CR de adições independentes à anfetamina e 5-HT na ausência de qualquer fármaco antagonista. Pretendia-se apenas a comparação das características

farmacológicas ($E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50}) dos dois agonistas nas duas condições experimentais. Os segmentos de íleo foram igualmente sujeitos a 100 μ M de ACh exógena para induzir directamente a contracção máxima e, desta forma, ser possível a comparação dos resultados de experiências de diferentes dias.

7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – TÉCNICAS DE HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

7.1 MICRO-ANATOMIA DOS SEGMENTOS DE ÍLEO DE RATO WISTAR

Com o objectivo de verificar a micro-anatomia dos segmentos de íleo de rato Wistar, foram realizados estudos histoquímicos (coloração com hematoxilina/eosina – HE) e imunohistoquímicos.

Os segmentos de íleo foram isolados e fixados em formol, tamponado a pH 7,0 e processados de forma convencional, com posterior inclusão em parafina. Realizaram-se cortes histológicos de 3 μ m de espessura que foram sujeitos inicialmente a coloração com HE.

7.2 LOCALIZAÇÃO CELULAR DOS RECEPTORES 5-HT_{2A} E 5-HT_{2B} EM SEGMENTOS DE ÍLEO DE RATO WISTAR

Para a determinação da localização celular dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}, os cortes foram desparafinados, rehidratados (xilol, álcool absoluto e álcool a 95%) e lavados em água corrente. De seguida, a peroxidase endógena foi inibida por incubação em H₂O₂ a 3%, durante 15 minutos, à temperatura ambiente em câmara húmida. Após lavagem com água destilada, efectuou-se a recuperação antigénica através de microondas, em tampão citrato de sódio (10mM) a pH 6,0 durante 20 minutos, a 500 Watts. Depois do arrefecimento do tampão e de lavagem com tampão fosfato salino² (*Phosphate Buffer Saline* – PBS), procedeu-se à incubação com os soros primários de anticorpos de cabra, anti-receptor 5-HT_{2A} e anti-receptor 5-HT_{2B} (Santa Cruz Biotechnology, California, E.U.A.), todos na diluição 1:10, durante 90 minutos, à temperatura ambiente e em câmara húmida. Seguidamente, os cortes

² PBS (composição em mmoles/L): Na₂HPO₄ 9,1; NaH₂PO₄ 1,7; NaCl 150; pH 7,4.

foram lavados com PBS e, em vez de um anticorpo secundário, foi utilizado um polímero sintético anti-cabra ligado à peroxidase (Zymed, San Francisco, E.U.A.), o qual foi incubado durante 10 minutos, mediante as recomendações do fabricante. Lavou-se novamente com PBS e a revelação também foi levada a cabo com diaminobenzidina (DAB), durante 5 minutos. Por fim, efectuou-se o contraste com hematoxilina de Gil, azularam-se, desidrataram-se e montaram-se as lâminas em meio sintético.

8. MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS NOS ESTUDOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS

Anticorpo de cabra anti-receptor 5-HT_{2A} de rato/humano e anticorpo de cabra anti-receptor 5-HT_{2B} de rato/ratinho/humano (Santa-Cruz Biotechnology Inc., California, E.U.A.); SuperPicture™ polymer detection system (Zymed, San Francisco, E.U.A.); diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, St Louis, E.U.A.). Os restantes reagentes usados foram produtos *pro analysi* (Merck, Frankfurter, Alemanha).

9. PROTOCOLO EXPERIMENTAL – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CATECOLAMINAS NO ESTRIADO DE RATO WISTAR POR HPLC DE FASE REVERSA COM DETECÇÃO ELECTROQUÍMICA

Para a quantificação dos níveis de dopamina e de 5-HT, bem como dos seus respectivos metabolitos (ácido 3,4-dihidroxifenilacético (*3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid* – DOPAC) e ácido homovanílico (*Homovanillic Acid* – HVA), e ácido 5-hidroxi-indolacético (*5-Hydroxyindoleacetic Acid* – 5-HIAA)), utilizou-se um método de cromatografia líquida de alta pressão (*High Pressure Liquid Chromatography* – HPLC) de fase reversa com detecção electroquímica (amperométrica) (Morgadinho et al., 2004). O equipamento utilizado incluiu uma bomba Gilson (modelo 307), um auto-injector Gilson (modelo 234; loop 50 µl), um detector electroquímico Gilson (modelo 142) e software UniPoint v5.11 (Figura 15).



Figura 15 – Sistema de HPLC utilizado na quantificação de monoaminas

9.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE EFLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE CATECOLAMINAS POR HPLC

Adicionaram-se 500 μL de ácido perclórico (HClO_4) 0,2 M a cada amostra e de seguida procedeu-se à sua homogeneização com a ajuda de um sonicador, no qual foram realizados 2 pulsos de 10 segundos para cada amostra. Colocaram-se ainda as amostras num banho de ultra-sons durante 3 minutos de forma a homogeneizar correctamente a amostra. Posteriormente centrifugaram-se as amostras a 13000 rpm durante 7 min e a 4°C. Retirou-se o sobrenadante para tubos contendo um microfiltro 0,22 μm Nylon (Spin-X® Centrifuge Tube Filter, Costar) e centrifugaram-se novamente as amostras a 13000 rpm durante 4 min e a 4°C. As amostras foram congeladas a -80°C para posterior análise por HPLC.

Ao *pellet* obtido anteriormente, foi adicionado 500 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e de seguida procedeu-se à homogeneização das amostras como anteriormente foi descrito. Centrifugaram-se as amostras a 13000 rpm durante 15 min e a 4°C. Retirou-se o sobrenadante de cada amostra para tubos novos que foram congelados a -80°C para posterior quantificação de proteína.

9.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para a separação e quantificação das diferentes monoaminas utilizou-se uma coluna ODS 2 Waters Spherisorb® (4.6 x 250 mm; tamanho das partícula: 5 μ m). A fase móvel, desgaseificada e filtrada, foi constituída por acetato de sódio trihidratado (0,1 M), ácido cítrico monohidratado (0,1M), octilsulfato de sódio (0,5 mM), EDTA (0,15 mM), trietilamina (1 mM) e metanol (10 %) (pH 3,8). O fluxo foi de 1 ml/minuto e a sensibilidade foi mantida a 2nA/V. Os tempos de retenção obtidos estão apresentados na Tabela IV. A concentração das monoaminas em cada amostra foi calculada tendo como referência curvas padrão de cada monoamina (Figura 16). Os resultados foram apresentados em ng/mg de proteína.

Tabela IV – Tempos de retenção, em minutos

Monoaminas	Tempo de retenção, minutos (média \pm erro)
DOPAC	6,09 \pm 0,04
DA	7,33 \pm 0,07
5-HIAA	12,63 \pm 0,13
HVA	14,33 \pm 0,11
5-HT	18,94 \pm 0,07

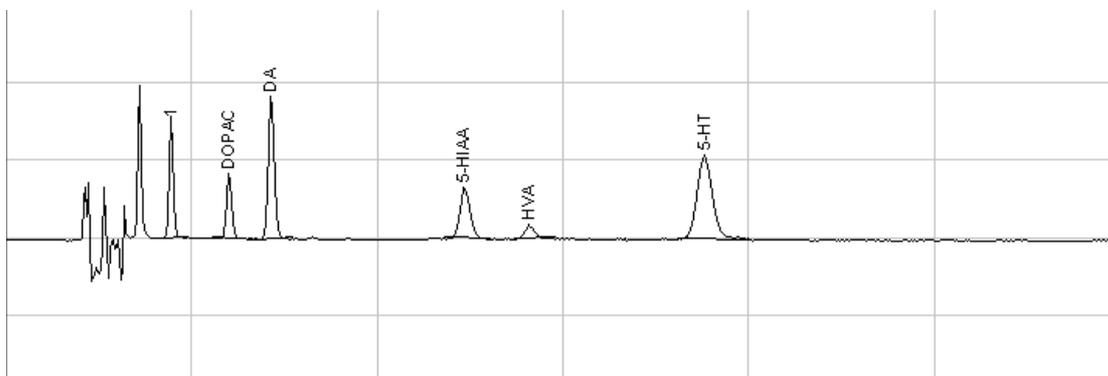


Figura 16 – Cromatograma representativo da amostra do padrão total 50 ng/mL contendo DA, DOPAC, 5-HIAA, HVA e 5-HT

9.3 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ATRAVÉS DO MÉTODO BCA

A quantificação da proteína foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid* – BCA), um método simples, rápido e preciso para quantificação colorimétrica de proteínas totais. Este método baseia-se na capacidade das proteínas reduzirem o Cu^{2+} a Cu^{+} em meio alcalino. A cor púrpura resultante da reacção química é a consequência da interacção do BCA com o Cu^{+} . Este complexo solúvel em água possui elevada absorvância a 570 nm. Este método possui ainda uma característica fundamental que é a linearidade dos resultados, permitindo deste modo a quantificação de proteínas.

Para a análise quantitativa, as amostras previamente preparadas foram diluídas com a razão de 1:10. Para a curva padrão prepararam-se 6 diluições utilizando-se albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* – BSA) e ainda um padrão em branco (sem proteína). Os dois reagentes A e B (Thermo Scientific) utilizados foram misturados na proporção de 1:50 de A:B e aplicados a cada amostra (incluindo padrões). Posteriormente, incubou-se a 37°C durante 30 minutos. De seguida mediram-se as absorvâncias a 570 nm. Todas as amostras e padrões foram preparados em duplicado.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

1. RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À ANFETAMINA E À TIRAMINA

A anfetamina e a tiramina, testadas nas concentrações 1-6000 μM (Broadley *et al.*, 2009), induziram contracções dependentes da concentração no íleo isolado de rato com idêntica actividade intrínseca ($E_{\text{máx}}$) e potência ($p\text{EC}_{50}$). Os parâmetros farmacológicos quer da anfetamina quer da tiramina, encontram-se descritos na Tabela V.

Tabela V – Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina e à tiramina.

	$E_{\text{máx}}$ (mN)	$p\text{EC}_{50}$	n
Anfetamina	10,51 \pm 1,35	4,64 \pm 0,19	25
Tiramina	11,54 \pm 1,65	4,09 \pm 0,32	13

$E_{\text{máx}}$ = contracção máxima em mN de tensão; $p\text{EC}_{50}$ = logaritmo negativo da concentração molar de anfetamina e tiramina capaz de induzir metade da contracção máxima; n= número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.

2. EFEITO DA ATROPINA E DA MEPIRAMINA NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À ANFETAMINA

Os mecanismos colinérgicos desempenham um papel importante na regulação da motilidade intestinal, tendo em conta que a ACh é um dos principais neurotransmissores de carácter excitatório no SNE. A função da histamina a nível intestinal é também um factor a ter conta. Deste modo, foram realizadas curvas CR à anfetamina na ausência de qualquer fármaco (controlo, n=13), na presença de 1 μM de atropina (n=6), um antagonista não selectivo dos receptores muscarínicos, e na presença de 1 μM de mepiramina (n=8), um antagonista/agonista inverso dos receptores H_1 (Figura 17). Não foram verificadas alterações estatisticamente significativas entre as curvas CR controlo e as curvas CR executadas na presença dos dois antagonistas. Assim, conclui-se que a resposta contráctil à anfetamina não é mediada nem por receptores muscarínicos, nem pelo receptor H_1 , não havendo o envolvimento da histamina ou do mecanismo de tradução de sinal associado ao receptor H_1 .

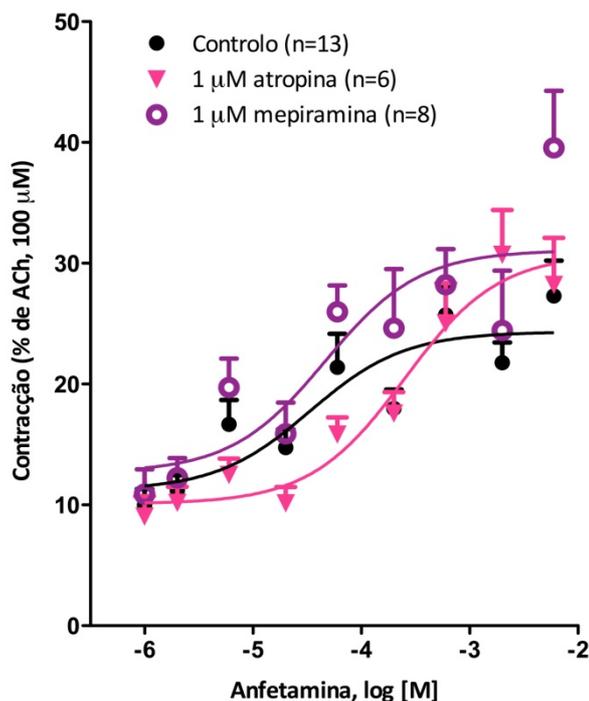


Figura 17 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 1 µM de atropina (▼) e na presença de mepiramina 1 µM (○); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

3. EFEITO DA RESERPINA NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À ANFETAMINA

Como já foi referido na Introdução, cerca de 90-95% da 5-HT é sintetizada, armazenada e libertada pelas células EC localizadas na parede intestinal. Deste modo, é relevante avaliar a influência das mesmas na contractilidade intestinal induzida pela anfetamina. Foram, por isso, realizadas curvas CR à anfetamina na ausência (controlo, n=8) e na presença de 100 µM de reserpina (n=8), um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, cujo efeito se traduz na diminuição da *pool* vesicular/granular de neurotransmissores das células EC (Figura 18). A reserpina bloqueou a resposta contráctil à anfetamina, em cerca de 45,3%, observando-se diferenças estatisticamente significativas em todas as doses da curva CR (na presença de reserpina observou-se uma contração residual à volta de 9% relativa à contração máxima obtida com 100 µM de ACh). Assim, pode-se concluir que a anfetamina provoca contrações intestinais indirectamente após a indução da libertação da 5-HT a partir da *pool* granular das células EC.

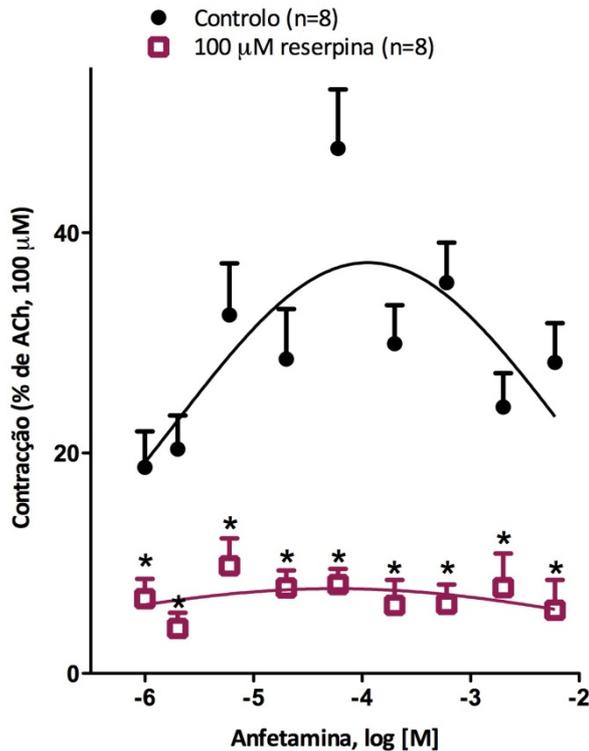


Figura 18 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 μ M de reserpina (□); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

4. EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À ANFETAMINA

Realizaram-se ainda curvas CR à anfetamina na ausência (controlo, $n=7$) e na presença de 1 μ M de fluoxetina ($n=8$), um inibidor selectivo do SERT e consequentemente da recaptação de 5-HT (Figura 19). As últimas 3 doses foram estatisticamente significativas, tendo-se verificado um antagonismo do tipo não competitivo com redução da resposta máxima em cerca de 14,78%, comprovando-se o envolvimento do SERT na resposta contráctil intestinal à anfetamina.

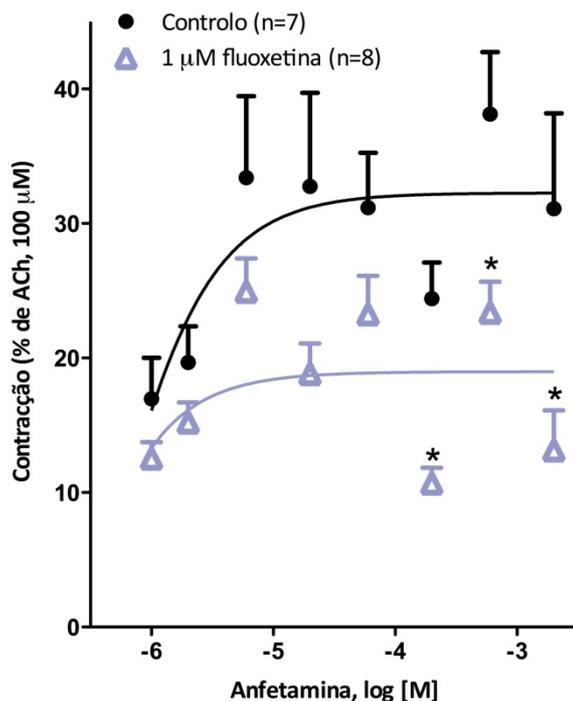


Figura 19 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 µM de fluoxetina (△); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

5. CONTRIBUTO DOS RECEPTORES DE 5-HT NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO DE RATO À ANFETAMINA

5.1 EFEITOS DA RITANSERINA E DA PRAZOSINA NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO DE RATO À ANFETAMINA

Como já foi referido anteriormente, a 5-HT desempenha um papel fundamental na regulação da actividade GI. Com o fim de avaliar o possível envolvimento de receptores da 5-HT; descartar a possibilidade de envolvimento de mecanismos simpáticos, tanto tendo em consideração o mecanismo clássico atribuído à anfetamina, como tendo em consideração a abolição pela reserpina da curva CR bifásica da anfetamina (contração nas doses mais baixas e relaxamento nas doses mais elevadas da curva CR), foram realizadas curvas CR à anfetamina na ausência (controlo, $n=25$), na presença de 1 µM de ritanserina ($n=10$), um antagonista não selectivo dos receptores 5-HT_{2A/2B/2C} ou 10 µM de prazosina ($n=8$), um antagonista selectivo dos receptores α_1 -adrenérgicos, e na presença de ambos os antagonistas

(n=10) (Figura 20). A ritanserina por si só aboliu por completo a resposta contráctil à anfetamina o que nos leva a propor a activação de receptores 5-HT₂ pela 5-HT libertada. No entanto, por assistirmos inclusive à abolição completa da contracção basal do órgão pelo antagonista não selectivo dos receptores 5-HT₂, sentiu-se a necessidade de averiguar se estes resultados eram fruto da possível activação de mecanismos simpáticos com consequente activação de receptores α 1-adrenérgicos inibitórios ou da não selectividade exclusiva da ritanserina para receptores serotoninérgicos. Foi, por isso, utilizada a prazosina sozinha e em simultâneo com a ritanserina. A potenciação da contracção induzida pela anfetamina na presença de prazosina, sem alteração do perfil bifásico, reforça a ideia que o bloqueio de mecanismos inibitórios adrenérgicos potencia a acção excitatória/contráctil da anfetamina. Não havendo diferenças estatisticamente significativas entre a curva CR à anfetamina na presença de ritanserina e a curva CR à anfetamina na presença simultaneamente de ritanserina e prazosina, exclui-se o envolvimento dos receptores α -adrenérgicos na abolição da resposta contráctil do íleo de rato à anfetamina na presença de ritanserina.

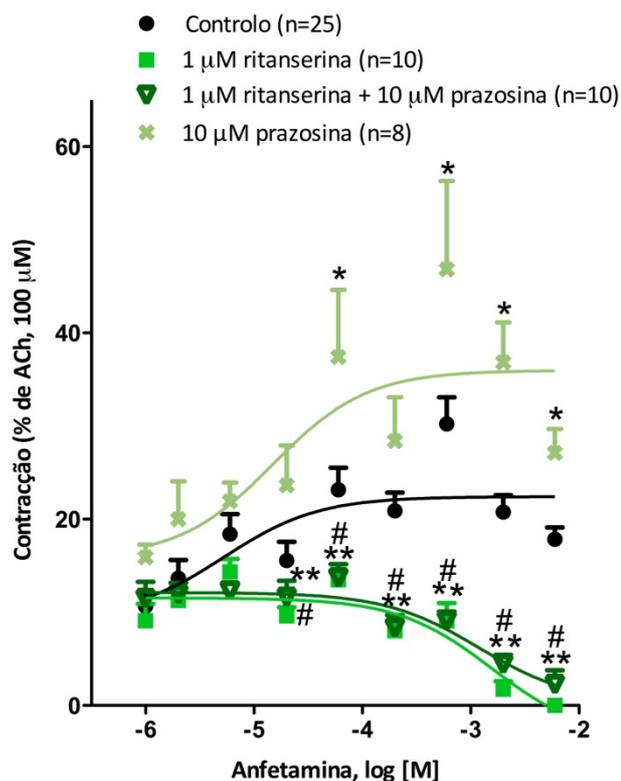


Figura 20 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 1 μM de ritanserina (■), de 10 μM de prazosina (✕) e na presença em simultâneo de 1 μM de ritanserina e 10 μM de prazosina (▽); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$, prazosina vs controlo; ** $p < 0,05$, ritanserina + prazosina vs controlo ou prazosina; # $p < 0,05$ ritanserina vs controlo ou prazosina.

5.2 EFEITOS DA CETANSERINA E DO RS 127445 NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À ANFETAMINA

Tendo em conta os resultados anteriores, foi necessário averiguar qual dos receptores, 5-HT_{2A} ou 5-HT_{2B} está a mediar a resposta contráctil. Para isso, foram realizadas curvas CR à anfetamina na ausência (controlo, n=12), na presença de 0,05 μM de RS 127445 (n=6) ou na presença de 0,25 μM de RS 127445 (n=6), um antagonista selectivo do receptor 5-HT_{2B} (Figura 21). Apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significativas em termos de $E_{máx}$, houve um desvio para a direita da curva CR da anfetamina na presença da concentração mais selectiva de RS 127445 (antagonismo de tipo competitivo): com efeito houve uma diminuição significativa da potência ($p=0,012$) entre a curva controlo (pEC_{50} $5,48 \pm 0,17$, n=8) e a curva executada na presença de 0,05 μM de RS 127445 (pEC_{50} $4,66 \pm 0,19$, n=5), como

é possível verificar na Tabela VI. Concluímos que há envolvimento de receptores 5-HT_{2B} na resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina.

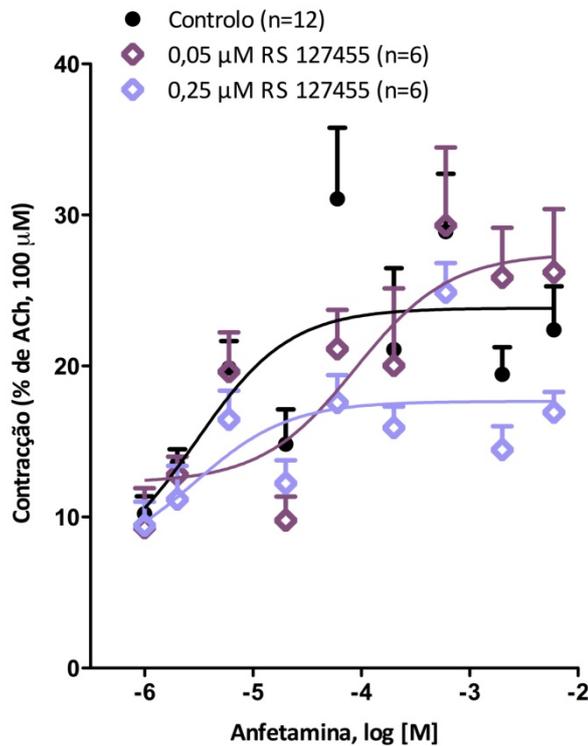


Figura 21 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 0,25 µM de RS 127445 (◇) ou na presença de 0,05 µM de RS 127445 (◇); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

Tabela VI – Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina na ausência, na presença de 0,05 µM de RS 127445 e na presença de 0,25 µM de RS 127445.

	pEC ₅₀	n
Anfetamina	5,48±0,17	8
Anfetamina + 0,05 µM RS 127445	4,66±0,19 *	5
Anfetamina + 0,25 µM RS 127445	5,37±0,13	4

pEC₅₀= logaritmo negativo da concentração molar de anfetamina capaz de induzir metade da contração máxima; n= número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$ vs controlo.

Impunha-se agora realizar curvas CR à anfetamina na ausência (controlo, n=10) e na presença de 1 µM de cetanserina (n=5), um antagonista selectivo dos receptores 5-

HT_{2A/2C} e confrontar mais uma vez com 0,05 μ M de RS 127445 (n=6), concentração que alterou significativamente a curva CR da anfetamina (Figura 22). Mais uma vez não houve diferenças significativas relativamente à eficácia da anfetamina na presença dos dois antagonistas, registando-se, no entanto, diferenças significativas quanto à potência (pEC₅₀) (Tabela VII). A cetanserina induziu igualmente um desvio para a direita da curva CR da anfetamina sem alteração da resposta máxima (antagonismo do tipo competitivo) o que pressupõe igualmente o envolvimento de receptores 5-HT_{2A/2C} na resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina.

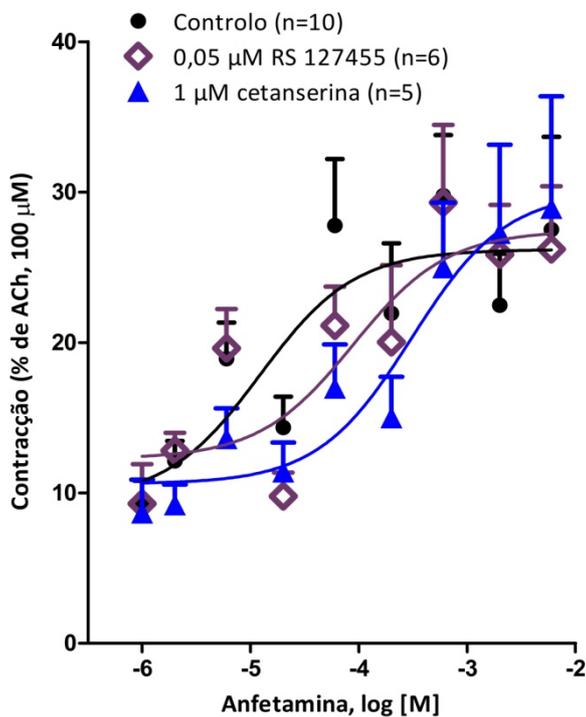


Figura 22 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 0,05 μ M de RS127445 (◇) ou na presença de 1 μ M de cetanserina (▲); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

Tabela VII – Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina na ausência e na presença de 0,05 μ M de RS127445 ou na presença de 1 μ M de cetanserina.

	pEC ₅₀	n
Anfetamina	5,38±0,14	6
Anfetamina + 0,05 μM RS127445	4,66±0,19 *	5
Anfetamina + 1 μM cetanserina	4,26±0,22 *	8

pEC₅₀= logaritmo negativo da concentração molar de anfetamina capaz de induzir metade da contracção máxima; n= número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$ vs controlo.

6. EFEITO DO EPPTB NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À ANFETAMINA E À TIRAMINA

Para averiguar o eventual envolvimento dos TARR1 na resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina, foram realizadas curvas CR à anfetamina na ausência (controlo, n=13) e na presença de 1 (n=9) e 5 μ M (n=10) de EPPTB, um antagonista selectivo dos TAAR1 (Figura 23). Apenas com 5 μ M de EPPTB se obteve um antagonismo do tipo não competitivo com redução da resposta máxima de 20,5%, sem desvio significativo para a direita (ANOVA, $p=0,054$), como é possível concluir pelos valores constantes na Tabela VIII.

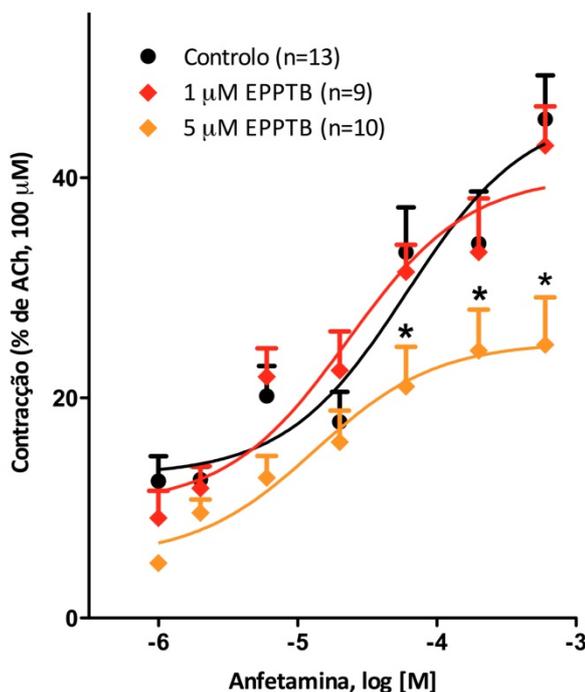


Figura 23 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina na ausência (●, controlo), na presença de 1 µM de EPPTB (◆) ou na presença de 5 µM de EPPTB (◇); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnett*. * $p < 0,05$ vs controlo.

Tabela VIII – Resposta contrácteis de segmentos de íleo de rato à anfetamina na ausência e na presença de 1 µM de EPPTB ou na presença de 5 µM de EPPTB.

	$E_{máx}$ (%ACh)	pEC_{50}	n
Anfetamina	45,32±3,99	4,61±0,15	13
Anfetamina + 1 µM EPPTB	42,92±3,57	4,91±0,21	9
Anfetamina + 5 µM EPPTB	24,84±4,30 *	5,19±0,08	10

$E_{máx}$ =contração máxima em % da contração obtida com 100 µM de ACh; pEC_{50} =logaritmo negativo da concentração molar de anfetamina capaz de induzir metade da contração máxima; n=número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnett*. * $p < 0,05$ vs controlo.

Foram também realizadas curvas CR à tiramina na ausência (controlo, n=13) e na presença de 5 µM de EPPTB (n=13) (Figura 24). Este protocolo experimental foi realizado tendo em conta que a literatura aponta a tiramina como um agonista total dos TAAR1. O EPPTB na concentração 5 µM também alterou significativamente a curva

CR da tiramina, à semelhança da anfetamina, tendo produzido um antagonismo do tipo não competitivo com redução da resposta máxima de 10,3%, sem desvio significativo para a direita (teste *t* de *Student*, $p=0,994$), como é possível concluir pelos valores constantes na Tabela IX.

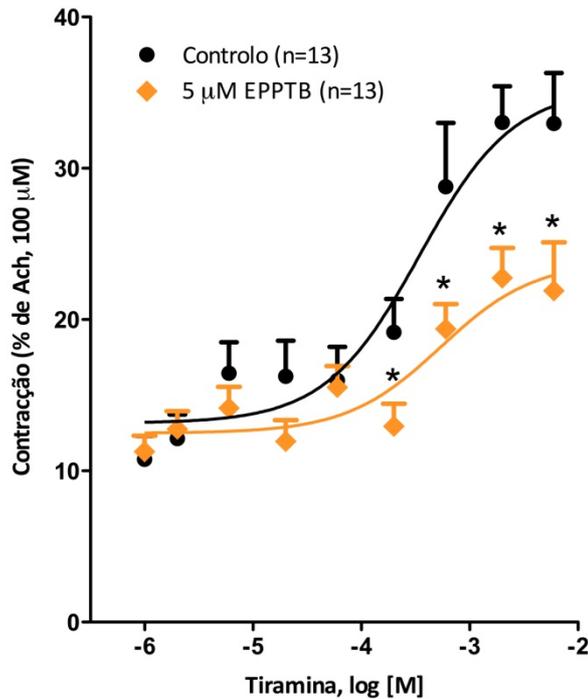


Figura 24 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à tiramina na ausência (●, controlo) e na presença de 5 μM de EPPTB (◆); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo.

Tabela IX – Resposta contrácteis de segmentos de íleo de rato à tiramina na ausência e na presença de 5 μM de EPPTB.

	$E_{máx}$ (%ACh)	pEC_{50}	n
Tiramina	33,03±2,40	4,80±0,47	13
Tiramina + 5 μM EPPTB	22,75±1,98 *	4,81±0,29	13

$E_{máx}$ = contração máxima em % da contração obtida com 100 μM de ACh; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de tiramina capaz de induzir metade da contração máxima; n= número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo.

7. EFEITO DA RITANSERINA NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À 5-HT

Tendo em conta o grupo de resultados que confirma o envolvimento de receptores de 5-HT do tipo 5-HT₂ na resposta contráctil de segmentos de íleo à anfetamina, pretendeu-se estudar a resposta contráctil dos mesmos à 5-HT exógena. Foram, por isso, realizadas curvas CR à 5-HT na ausência (controlo, n=8) e na presença de 1 μ M de ritanserina (n=8) (Figura 25). A ritanserina alterou de modo muito significativo a resposta contráctil do íleo à 5-HT, havendo uma redução do seu efeito máximo de 58%.

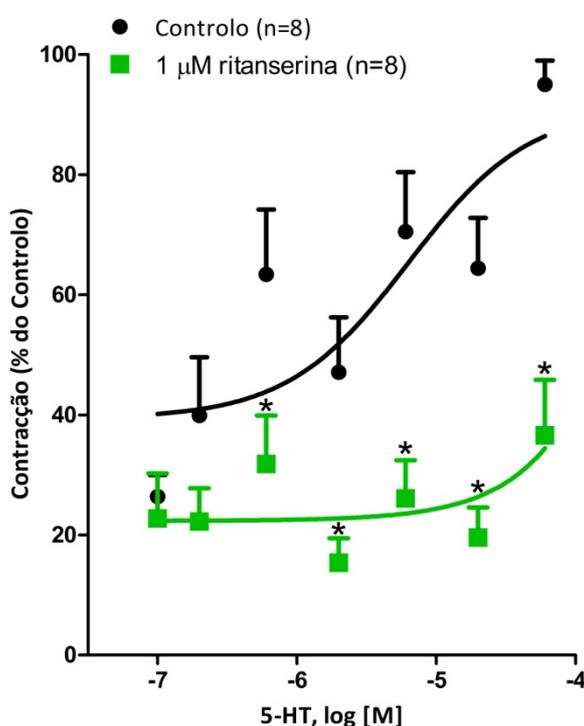


Figura 25 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de ritanserina (■); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

8. EFEITO DO RS 127445 NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À 5-HT

Um pouco à semelhança do que foi realizado a nível de protocolo experimental com a anfetamina, foi também realizado com a 5-HT. Deste modo, foram efectuadas curvas CR à 5-HT na ausência (controlo, n=16) e na presença de 0,05 μ M de RS 127445 (n=10) ou na presença de 0,25 μ M RS 127445 (n=6) (Figura 26).

Relativamente aos resultados, ambas as concentrações do antagonista alteraram a curva CR do agonista, tendo a concentração de $0,25 \mu\text{M}$ RS 127445 diminuído a resposta contráctil na 3ª e 4ª dose da curva e a concentração de $0,05 \mu\text{M}$ de RS 127445, na 4ª e 5ª dose. Tendo em conta que essas diferenças ocorreram nas doses intermédias, calculou-se igualmente o pEC_{50} para averiguar a possibilidade do desvio para a direita da curva CR da 5-HT, isto é, de haver diminuição na potência da 5-HT induzida pelo antagonista. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas nesse parâmetro como se pode constatar nos valores constantes na Tabela X.

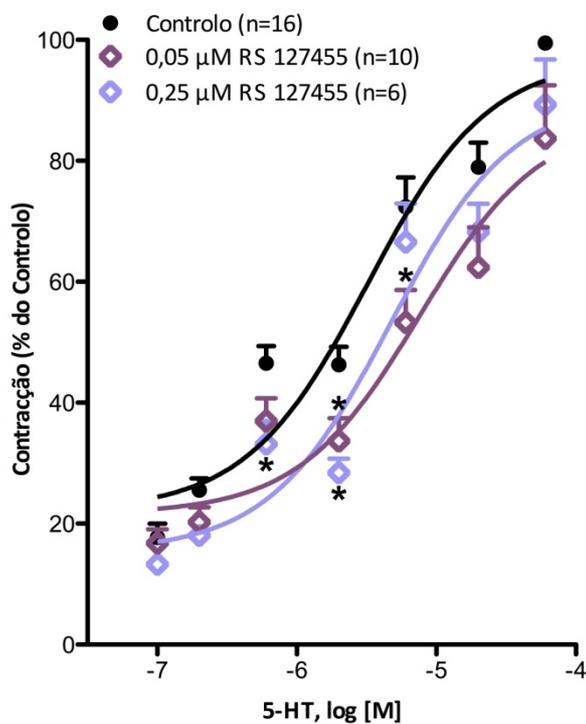


Figura 26 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de $0,05 \mu\text{M}$ de RS 127445 (◇) ou na presença de $0,25 \mu\text{M}$ de RS 127445 (◇); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$ vs controlo.

Tabela X – Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à 5-HT na ausência e na presença de 0,05 μM de RS 127445 ou na presença de 0,25 μM de RS 127445.

	pEC₅₀	n
5-HT	5,78±0,11	16
5-HT + 0,05 μM de RS 127445	5,60±0,14	10
5-HT + 0,25 μM de RS 127445	5,55±0,14	6

pEC₅₀= logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contracção máxima; n= número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.

9. EFEITO DA CETANSERINA E DO RS 127445 NA RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À 5-HT

Novamente, à semelhança do que foi realizado no estudo da anfetamina, foram igualmente realizadas curvas CR à 5-HT na ausência (controlo, n=16) e na presença de 0,05 μM de RS 127445 (n=10) ou na presença de 1 μM de cetanserina (n=6). Como se constata na Figura 27, a cetanserina não alterou a curva CR à 5-HT, excepto na última dose, reduzindo a resposta máxima significativamente cerca de 32%. Já o RS 127445, diminuiu de forma significativa a resposta contráctil do íleo de rato à 5ª dose da curva CR. Por esse motivo e pelo facto de se tratar de uma dose intermédia, calculou-se o pEC₅₀ de forma a saber se o antagonista teria provocado um desvio para a direita, indicativo de um antagonismo de tipo competitivo. Como consta na Tabela XI, não se verificaram alterações estatisticamente significativas da potência da 5-HT na presença dos dois antagonistas em estudo.

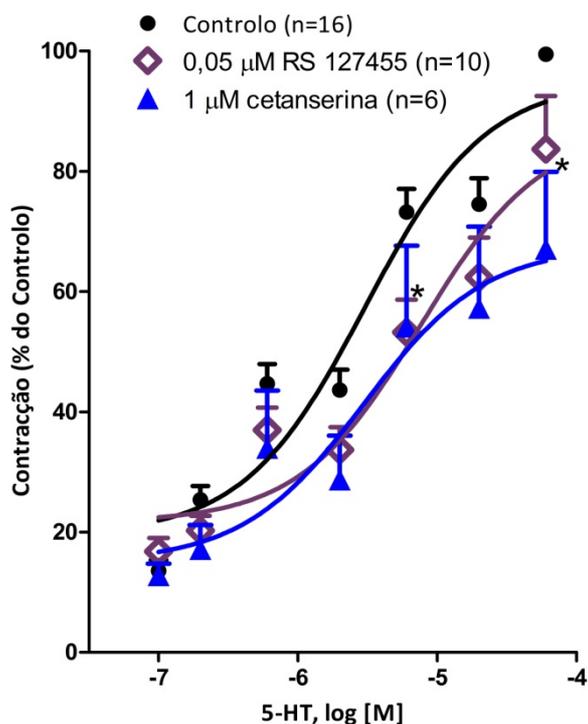


Figura 27 – Resposta contráctil do íleo isolado de rato à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 0,05 μM de RS 127445 (◇) ou na presença de 1 μM de cetanserina (▲); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$ vs controlo.

Tabela XI – Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à 5-HT na ausência e na presença de 0,05 μM de RS127445 ou na presença de 1 μM de cetanserina.

	pEC ₅₀	n
5-HT	5,71 \pm 0,10	16
5-HT + 0,05 μM de RS 127445	5,60 \pm 0,14	10
5-HT + 1 μM de cetanserina	5,80 \pm 0,21	6

pEC₅₀= logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contração máxima; n= número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.

10. ESTUDOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS SEGMENTOS DE ÍLEO DE RATO WISTAR

Nas Figuras 28-31, estão apresentadas secções representativas de segmentos de íleo de ratos Wistar, que foram submetidos a técnicas histoquímicas e

imunohistoquímicas. Como já foi anteriormente referido no Capítulo 3 – Materiais e Métodos, a imunoreactividade foi detectada utilizando a diaminobenzidina, conferindo uma coloração acastanhada, enquanto que a hematoxilina foi utilizada como coloração de contraste para detectar os núcleos celulares que coram de púrpura. O padrão da imunoreactividade foi consiste em todas as secções obtidas do número de amostras recolhidas para estudo (4 ratos).

A micro-anatomia do íleo de rato visível graças à HE permitiu caracterizar as camadas musculares lisas longitudinais e circulares, assim como as células ganglionares poliédricas dos plexos submucoso e mientérico (Figura 28).

Para as marcações por imunohistoquímica, nomeadamente dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}, foram utilizados como controlos positivos preparações sugeridas pelo fabricante, nomeadamente células musculares lisas vasculares de artéria uterina humana para o anticorpo contra o receptor 5-HT_{2A}, onde este subtipo de receptor foi farmacologicamente caracterizado (Fontes Ribeiro *et al.*, 1991) e fundo de estômago de rato para o anticorpo contra o receptor 5-HT_{2B}, onde este subtipo de receptor foi também farmacologicamente caracterizado (Baxter *et al.*, 1994; Komada & Yano, 2007). Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 29 A e B.

Quanto à localização celular dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}, verificou-se imunoreactividade para o receptor 5-HT_{2A} e para o receptor 5-HT_{2B} em células ganglionares do plexo mientérico e no plexo submucoso, mas não nas células musculares lisas da camada circular ou longitudinal da parede intestinal (Figuras 30 e 31).

10.1 MICRO-ANATOMIA DOS SEGMENTOS DE ÍLEO DE RATO

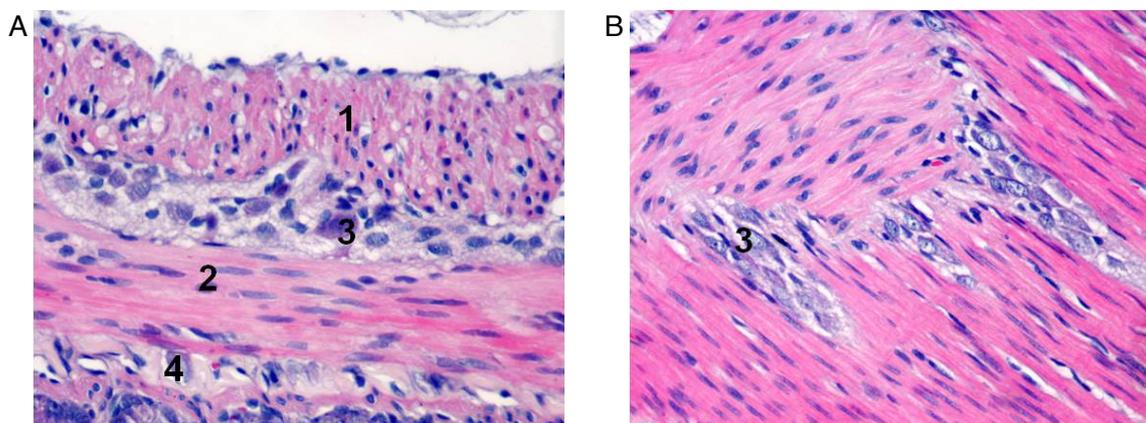


Figura 28 – Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 8-10 semanas. H/E X400. Visualização das camadas e músculo liso longitudinal (1) e circular (2) e dos plexos mientérico (3) e submucoso (4).

10.2 LOCALIZAÇÃO CELULAR DOS RECEPTORES 5-HT_{2A} E 5-HT_{2B} EM SEGMENTOS DE ÍLEO DE RATO WISTAR

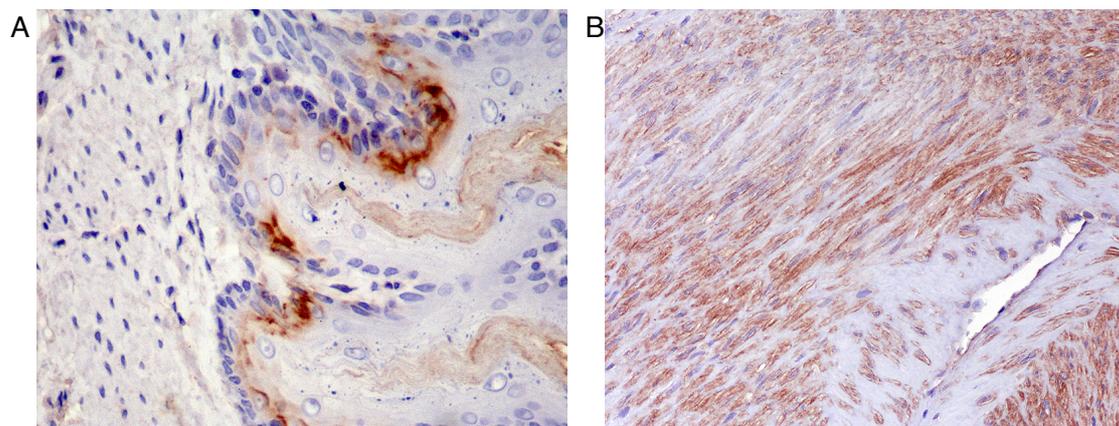


Figura 29 – Fundo de estômago de rato Wistar macho 8-10 semanas (A) e artéria uterina humana (B). Técnica de imunohistoquímica: imunoreactividade ao receptor 5-HT_{2B} X400 (A) e 5-HT_{2A} X200 (B), na camada basal e em células musculares lisas vasculares, respectivamente.

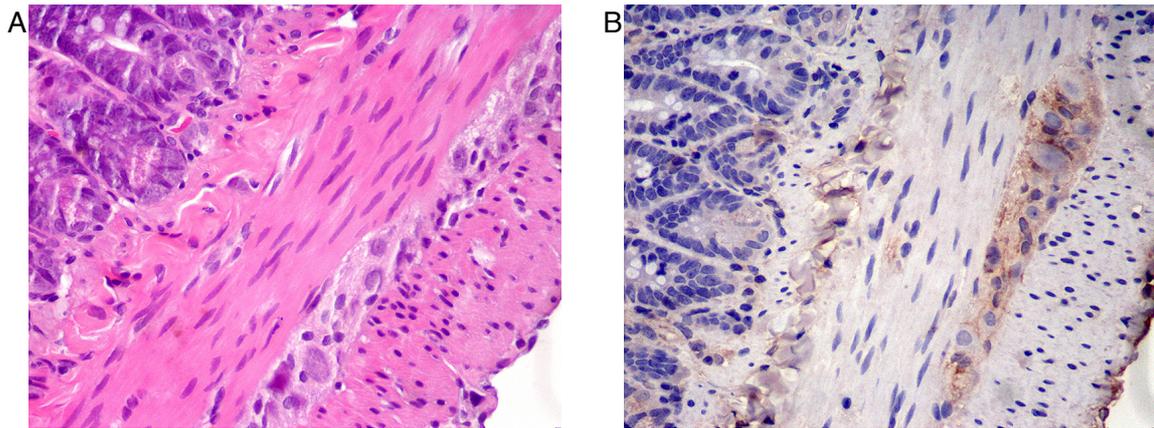


Figura 30 – Íleo de rato Wistar macho de 8-10 semanas. (A) H/E X400; (B) Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{2B} X400 presente nas células ganglionares situadas no plexo mientérico e submucoso da parede intestinal.

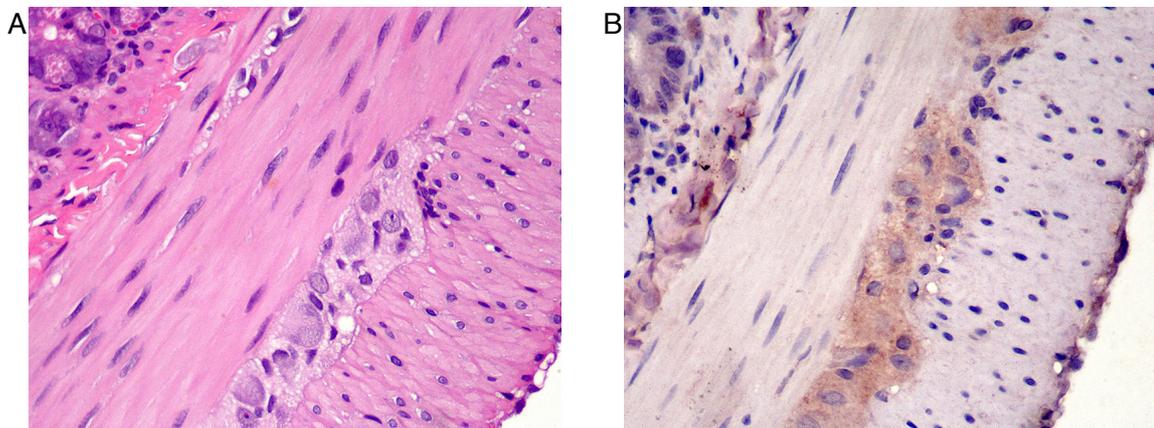


Figura 31 – Íleo de rato Wistar macho de 8-10 semanas. (A) H/E X400; (B) Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{2A} X400 presente nas células ganglionares situadas no plexo mientérico e submucoso da parede intestinal.

11. ESTUDOS *IN VIVO* – A INFLUÊNCIA DA ANFETAMINA NO COMPORTAMENTO ANIMAL E NA FISIOLÓGIA GASTROINTESTINAL

11.1 INFLUÊNCIA DA ANFETAMINA NO COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR

Como seria de esperar, os ratos que foram administrados com anfetamina tiveram um comportamento estereotipado que começou cerca de 5 minutos após a injeção i.p. e durou cerca de 3 horas. O comportamento estereotipado incluiu o seguinte: movimentação vertical (sobre as patas traseiras), lambar, cheirar, cabeça com movimentos circulares, andar para trás, geralmente seguido por um período em que gradualmente o animal perdia a função locomotora chegando à fase de exaustão que

podia durar cerca de 30 minutos a 1 hora. Após o período de exaustão, o rato recuperava a função locomotora de modo gradual. Foram também observadas alterações a nível físico no animal, como edema no focinho, o pêlo eriçado e o globo ocular mais saliente. É de notar ainda que os comportamentos estereotipados observados nos ratos que foram submetidos à dose de 15 mg/Kg de anfetamina foram aumentando de intensidade à medida que a temperatura corporal do animal aumentava. Após atingido o pico de temperatura pelo grupo submetido ao fármaco, começava a fase de exaustão. Na apresentação oral desta tese, irão ser mostradas as imagens vídeos captadas durante as experiências, nas quais será possível visualizar a sucessão de comportamentos estereotipados.

11.2 MONITORIZAÇÃO DA TEMPERATURA

Como foi referido no capítulo anterior, foram realizadas medições de temperatura antes e depois (a cada meia hora) da injeção i.p. em ambos os grupos em estudo. Os resultados traduzidos em diferença de temperatura relativamente à temperatura antes da injeção ($t=0$) estão patentes no gráfico da Figura 32. Houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de estudo submetido ao fármaco e o grupo controlo até aos 90 minutos após a administração das soluções. Estes resultados evidenciam o pico de hipertermia atingido pelos animais sujeitos a anfetamina. Após esse tempo, a temperatura corporal dos animais voltava à temperatura basal ($t=0$).

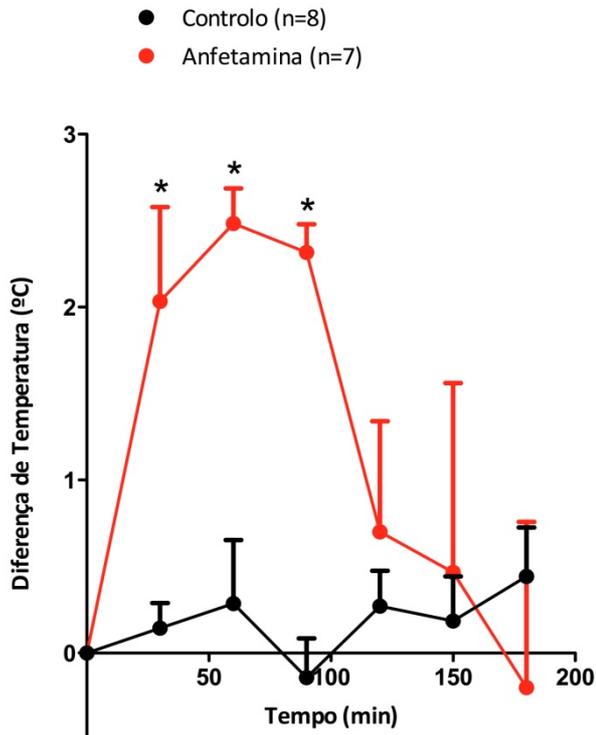


Figura 32 – Diferença de temperatura (relativamente à temperatura antes da injeção t=0) em relação ao tempo em minutos dos ratos controlo (●) e dos ratos sujeitos a 15 mg/Kg com anfetamina (●); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo.

11.3 ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS OBSERVADAS NA ANATOMIA DO TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATO 24 HORAS APÓS ADMINISTRAÇÃO *IN VIVO* DE 15 MG/KG DE ANFETAMINA

Foram observadas alterações macroscópicas ao nível do sistema GI como evidenciam a Figura 33. Relativamente aos ratos salinos, os ratos que foram submetidos ao fármaco tinham o íleo mais constricto e rosado, o mesentério mais vascularizado, o cego com diminuição de volume e o estômago, pelo contrário, com aumento de tamanho.

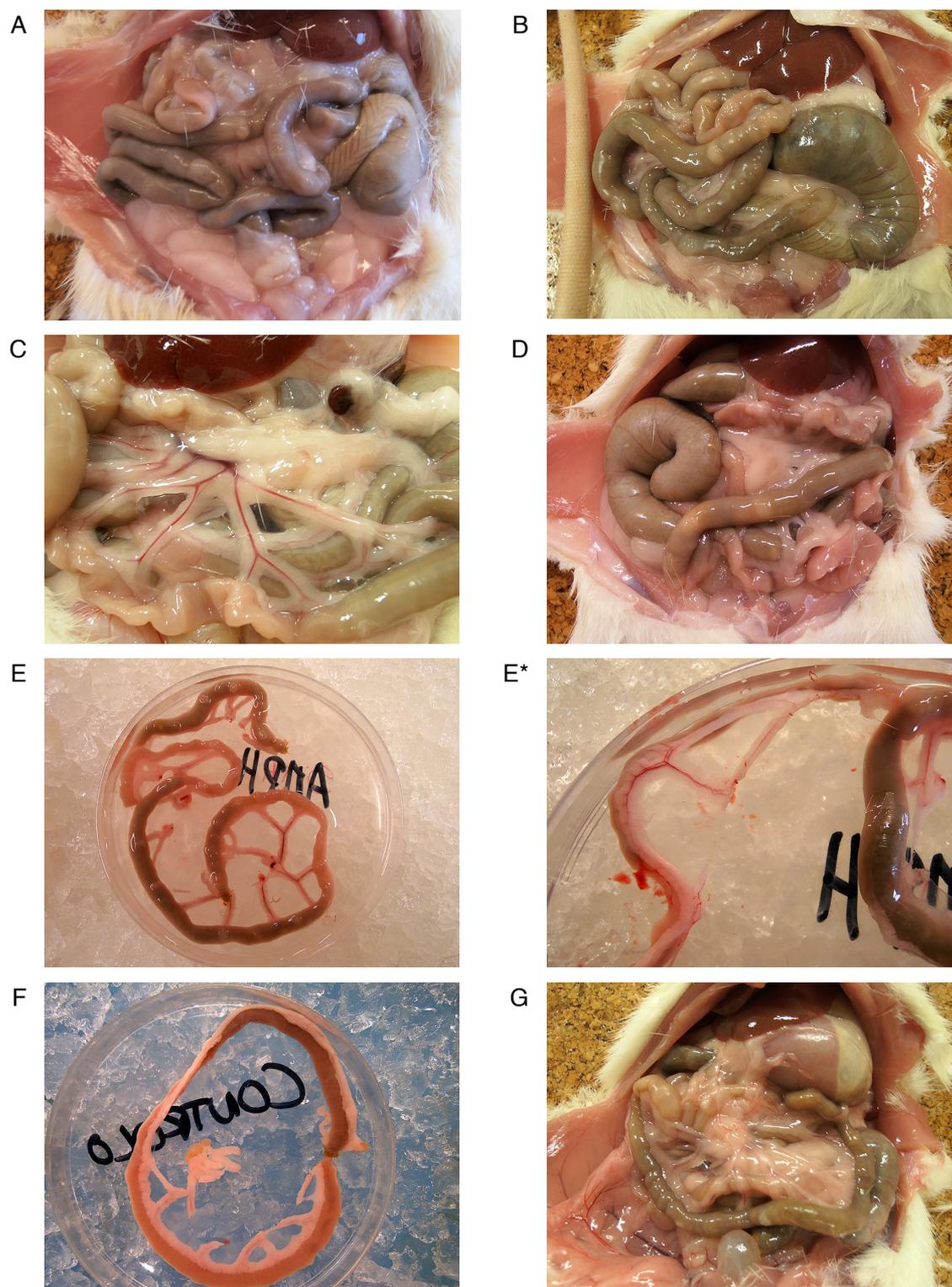


Figura 33 – Alterações macroscópicas observadas entre os diferentes grupos de ratos em estudo. Diferenças relativamente ao rato anfetamina (A) e ao rato controle (B) no ceco; mesentério do rato anfetamina (C) vs mesentério do rato controle (D); íleo do rato anfetamina (E) com pormenor da vasoconstrição (E*) e íleo do rato controle (F); estômago do rato anfetamina (G).

11.4 RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO À ANFETAMINA E À 5-HT 24 HORAS APÓS ADMINISTRAÇÃO *IN VIVO* DE 15 MG/KG DE ANFETAMINA

Com a finalidade de averiguar possíveis consequências da administração de anfetamina na função intestinal, estudou-se a resposta contráctil dos íleos isolados, quer de ratos controlo quer de ratos sujeitos a anfetamina, realizando-se curvas CR à anfetamina e à 5-HT, 24 horas após a administração de salino ou de 15mg/Kg de anfetamina respectivamente. Os resultados foram traduzidos em % da contracção obtida com 100 μ M de ACh e em mN de tensão (Figuras 34 a 37). Relativamente à curva CR à anfetamina, houve diferenças estatisticamente significativas nalgumas doses da curva CR (7^a e 8^a dose), havendo diminuição da resposta contráctil (em mN de tensão) dos animais que foram sujeitos à anfetamina, não se tendo observado alterações significativas quando os resultados são traduzidos em % da ACh. Concluindo, não se observaram alterações da eficácia e potência (Tabela XII) da anfetamina.

Em relação à 5-HT observou-se uma tendência de aumento (diferenças estatisticamente significativas na 3^a e 4^a dose da curva CR quando os resultados são traduzidos em % da ACh, mas não em valores absolutos) da resposta contráctil a este agonista nos animais sujeitos a anfetamina, sem contudo alterar a potência da 5-HT, como é possível concluir dos resultados constantes na Tabela XIII.

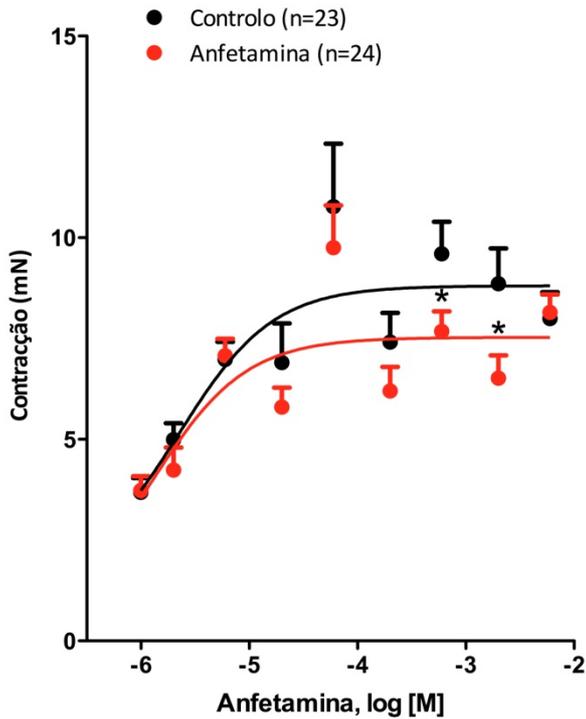


Figura 34 – Respostas contráteis à anfetamina dos íleos isolados de ratos controle (●, n=23) e de ratos submetidos a anfetamina (●, n=24); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controle

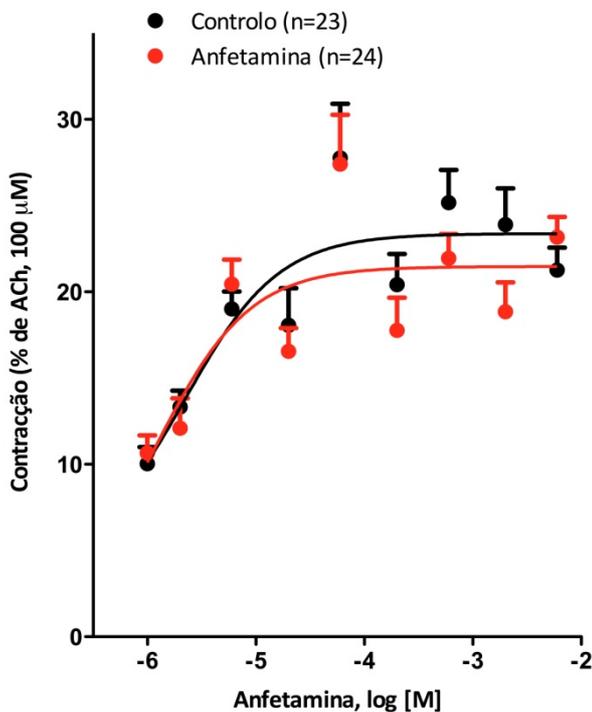


Figura 35 – Respostas contráteis à anfetamina dos íleos isolados de ratos controle (●, n=23) e de ratos submetidos a anfetamina (●, n=24) à anfetamina; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

Tabela XII – Respostas contrácteis à anfetamina de segmentos de íleo de ratos controlo e de ratos injectados com anfetamina.

	pEC ₅₀	n
Ratos controlos	4,89±0,16	18
Ratos anfetamina	5,05±0,23	18

pEC₅₀= logaritmo negativo da concentração molar de anfetamina capaz de induzir metade da contracção máxima; n= número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.

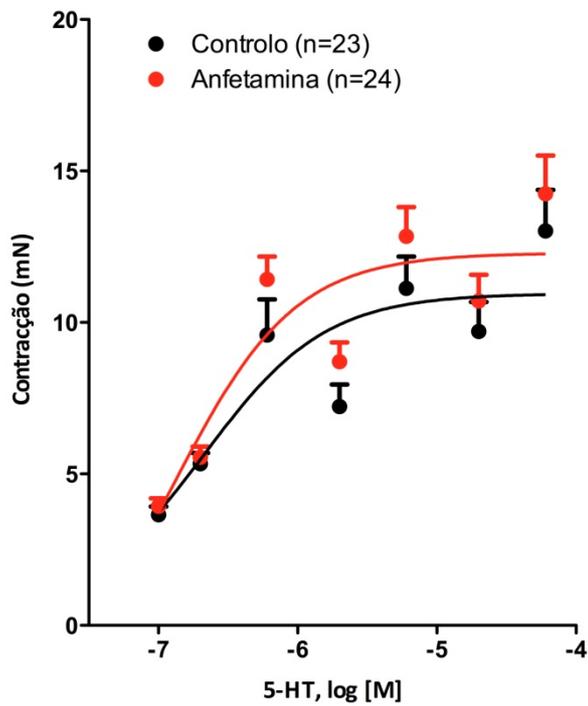


Figura 36 – Respostas contrácteis à 5-HT dos íleos isolados de ratos controlo (●, n=23) e de ratos submetidos a anfetamina (●, n=24); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M..

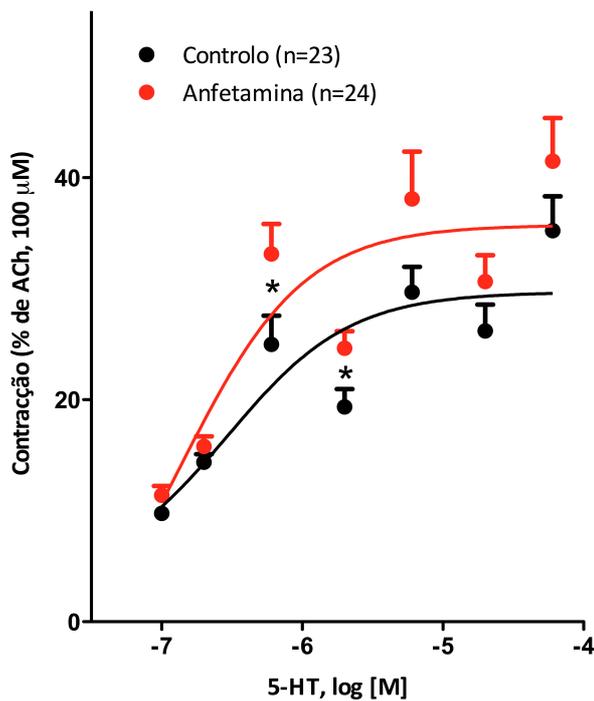


Figura 37 – Respostas contráteis à 5-HT dos íleos isolados de ratos controle (●, n=23) e de ratos submetidos à anfetamina (●, n=24); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ vs controle

Tabela XIII – Respostas contráteis à 5-HT de segmentos de íleo de ratos controle e de ratos injectados com anfetamina.

	pEC ₅₀	n
Ratos controles	6,31 \pm 0,13	22
Ratos anfetamina	6,28 \pm 0,14	23

pEC₅₀= logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contração máxima; n= número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.

11.5 NÍVEIS ESTRIATAIS TOTAIS DE DA E DOS SEUS METABOLITOS (DOPAC E HVA)

Os níveis de DA, DOPAC e HVA foram analisados nas amostras de estriado nos dois grupos de animais 24 hora após a administração do fármaco em estudo ou do salino. A anfetamina produziu uma depleção estatisticamente significativa da DA relativamente ao grupo controle (656,41 \pm 29,83 vs 819,97 \pm 21,86 ng/mg de proteína;

$p=0,004$) (Figura 38 A). Relativamente aos metabolitos da DA, a anfetamina não alterou de modo significativo os níveis proteicos de DOPAC e HVA (Figura 38 B e C)

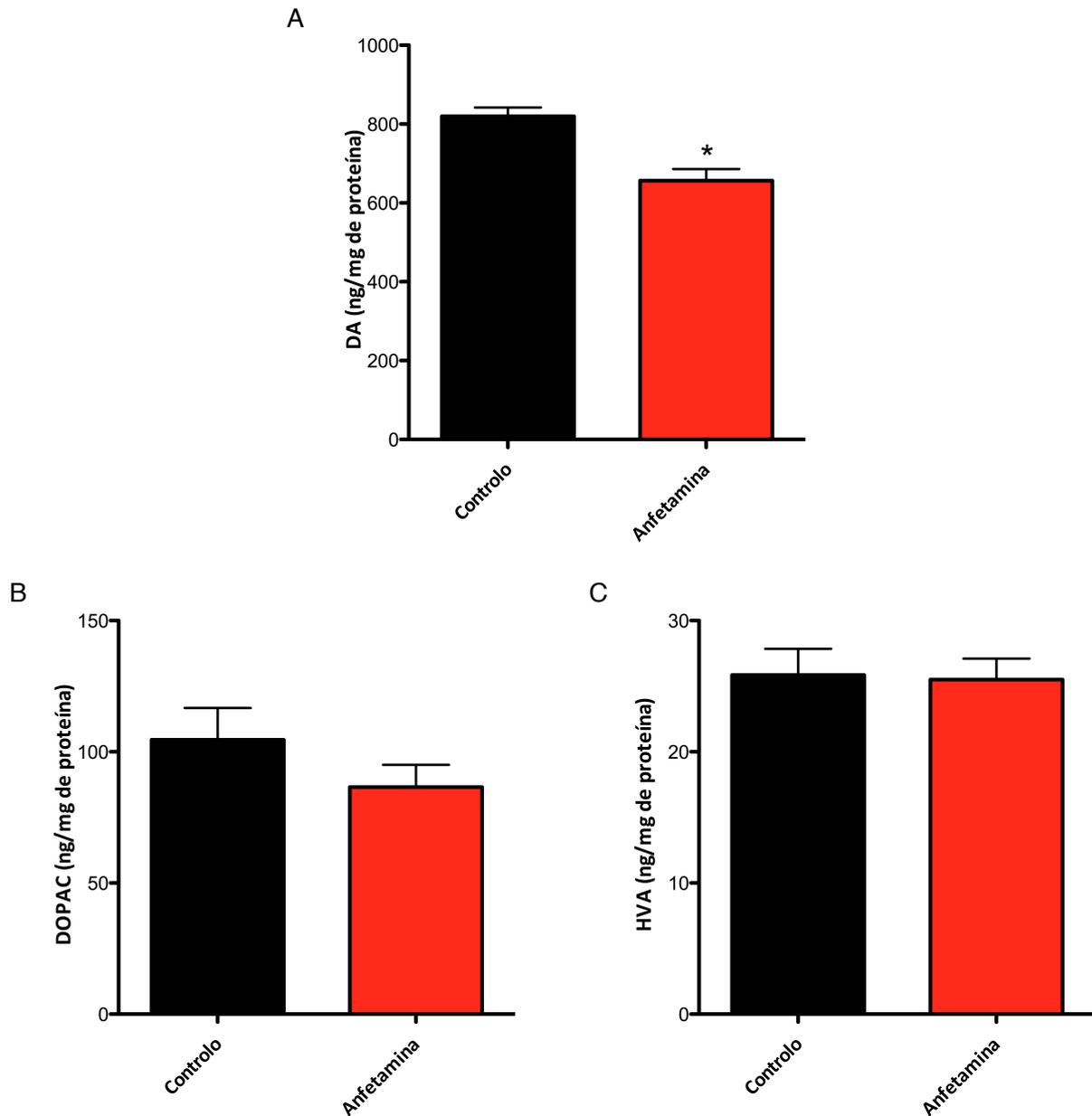


Figura 38 – Efeito da administração de anfetamina ($n=5$) (15 mg/Kg) nos níveis estriatais, totais de DA (A) e dos seus metabolitos, DOPAC (B) e HVA (C); os animais controlo ($n=5$) foram injectados com NaCl 0,9%; os animais foram sacrificados 24 horas após a administração; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ vs controlo

11.5.1 *TURNOVER* TOTAL DA DA (DOPAC+HVA/DA), INTRACELULAR (DOPAC/DA) E EXTRACELULAR (HVA/DA)

O *turnover* total da DA (DOPAC+HVA/DA), foi calculado para tentar realizar uma melhor caracterização do impacto da anfetamina no metabolismo da dopamina e consequentemente na neurotoxicidade dopaminérgica. Relativamente ao *turnover* da dopamina intracelular (DOPAC/DA), este é indicativo de síntese e metabolismo oxidativo intra-neuronal da DA, já o *turnover* da dopamina extracelular (HVA/DA) pode ser utilizado como um indicador do metabolismo da DA extraneuronal e libertação de DA. Não houve alterações significativas quanto aos *turnovers* entre o grupo controlo e o grupo que foi injectado com anfetamina (Figura 39).

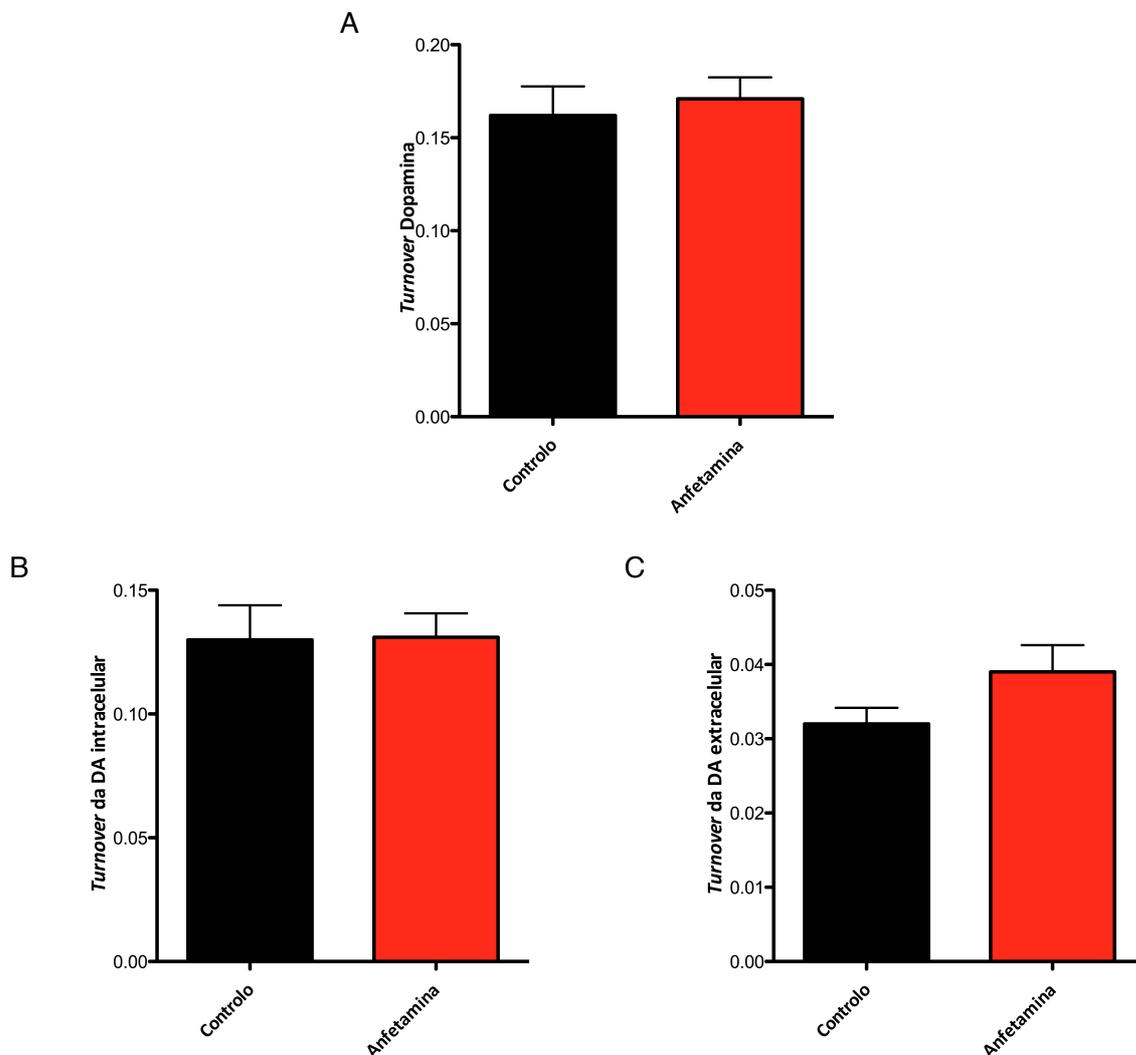


Figura 39 – Efeito da administração de anfetamina (n=5) (15 mg/Kg) no *turnover* da dopamina (DOPAC+HVA/DA) (A), no *turnover* da dopamina intracelular (DOPAC/DA) (B) e no *turnover* da dopamina extracelular (HVA/DA) (C); os animais controlo (n=5) foram injectados com NaCl 0,9%; os animais foram sacrificados 24 horas após a administração; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

11.6 NÍVEIS ESTRIATAIS TOTAIS DE 5-HT E DO SEU METABOLITO 5-HIAA

Determinou-se igualmente os níveis estriatais de 5-HT (Figura 40), no entanto não foi detectada qualquer diferença entre os grupos em estudo.

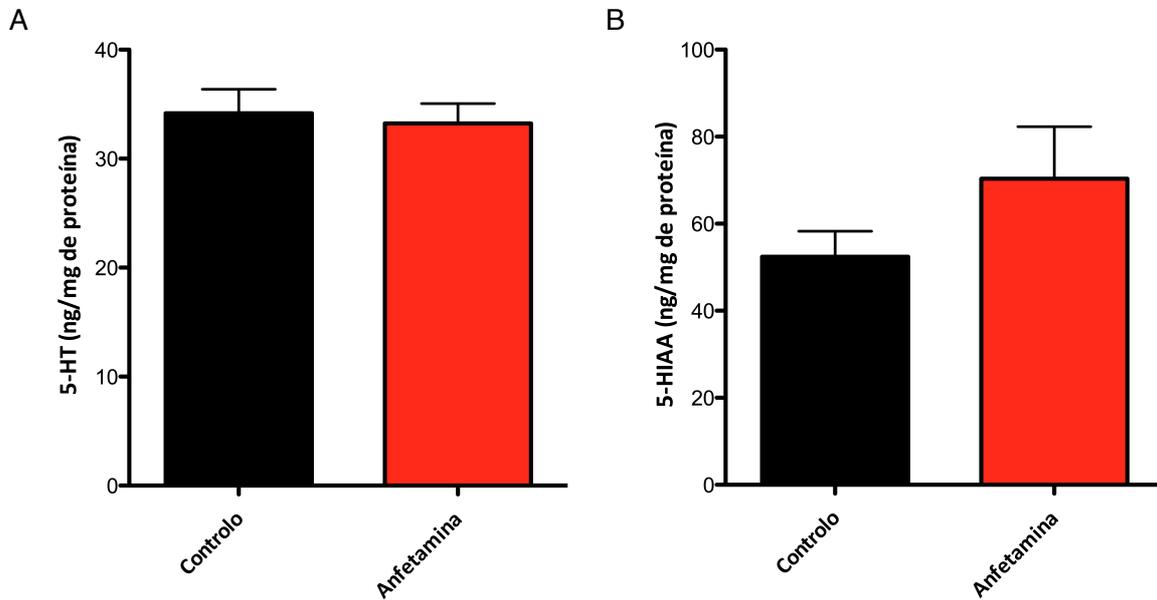


Figura 40 – Efeito da administração de anfetamina (n=5) (15 mg/Kg) nos níveis estriatais, totais de 5-HT (A) e do seu metabolito 5-HIAA (B); os animais controlo (n=5) foram injectados com NaCl 0,9%; os animais foram sacrificados 24 horas após a administração; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

Os estudos funcionais de contracção dos segmentos de íleo isolado de rato tiveram como principal objectivo a investigação dos mecanismos farmacológicos subjacentes ao efeito da anfetamina a nível GI. Para tal, foi elaborada uma estratégia metodológica que foi construída à medida dos resultados obtidos em cada protocolo experimental. Esta facilidade em poder mudar de rumo quanto ao protocolo seguinte, constitui uma grande vantagem dos estudos funcionais. Por outro lado, a manipulação da concentração efectiva do fármaco no íleo e a simplicidade da quantificação da resposta do órgão, fazem dos estudos farmacológicos *in vitro* muito mais vantajosos relativamente a estudos *in vivo*.

A escolha do sexo dos animais utilizados nos estudos funcionais teve em conta o facto das fêmeas, em ciclos de difícil determinação/previsão, possuírem níveis elevados de estrogénios que poderia alterar a resposta GI de modo indirecto. Os animais foram sacrificados por decapitação, sem qualquer tipo de anestesia prévia, no sentido de evitar a interferência de fármacos anestésicos na contractilidade do órgão. A escolha do íleo (porção do intestino delgado mais próxima do cego) para estes estudos funcionais teve em conta o facto deste ser considerando um modelo *standard* para o estudo da acção farmacológica de compostos no intestino (Liu e Coupar, 1997). Foram realizadas curvas CR de adições independentes, pois em ensaios preliminares, a contracção induzida pela anfetamina é uma contracção tipicamente fásica, não apresentando por esse mesmo motivo, um *plateau* estável que permitisse a adição sucessiva de doses (curva CR cumulativa). Por outro lado, com curvas CR de adições independentes evita-se que haja esgotamento do órgão.

Relativamente aos estudos *in vivo* realizados, a escolha do sacrifício às 24 horas teve em conta que o intestino, sendo um órgão que está sob um desgasto constante, é também acompanhado por uma renovação constante a nível do epitélio, e por isso seria improvável verificar dano a nível da função fisiológica, caso o sacrifício fosse realizado às 48 ou 72 horas. Por outro lado, a nível da literatura científica, os estudos *in vivo* que têm sido realizados e que têm como objectivo avaliar as repercussões da toma de anfetamina no SNC, tem como *timeline* as 72 ou mais horas (Fuller e Hemrick-Luecke, 1980; Bowyer *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2012), fazendo com que o

estudo de avaliação, por nós conduzido, quer das repercussões centrais, quer das repercussões no funcionamento de órgãos periféricos, seja pioneiro na área.

As doses que foram escolhidas para a realização das curvas CR à tiramina e à 5-HT tiveram como base estudos realizados por outros grupos de investigadores (Broadley *et al.*, 2009; Herbert *et al.*, 2008; McLean e Coupar, 1996 B; Briejer *et al.*, 1997; Tuladhar *et al.*, 2002). Relativamente às curvas CR à anfetamina, a janela de intervalo (1-6000 μM) da concentração efectiva no banho de órgãos teve em conta estudos funcionais já realizados por Broadley e colaboradores (2009) com TA (p -tiramina e β -PEA) (Broadley *et al.*, 2009). No que diz respeito ao estudo *in vivo*, foi escolhida uma dose de anfetamina que mantivesse um compromisso entre uma taxa de sobrevivência relativamente elevada mas que ao mesmo tempo tivesse um significado terapêutico. A nível terapêutico, as doses de anfetamina utilizada situam-se entre 5 e 60 mg diários (Wise *et al.*, 2007). Um outro estudo que visava estudar as doses terapêuticas da anfetamina na redistribuição vesicular utilizou a dose 15 mg/Kg (Riddle *et al.*, 2007). E por isso, tendo estas informações em consideração, a dose escolhida para um primeiro estudo *in vivo* foi de 15 mg/Kg.

A anfetamina, a tiramina (1-6000 μM) e a 5-HT (0,1-60 μM) induziram contracções dependentes da concentração em segmentos de íleo isolado de rato Wistar. O facto de a anfetamina induzir contracções dependentes da concentração permite realçar um dos efeitos adversos descritos para este fármaco - a diarreia, sendo que este efeito deverá ser mais notório quanto maior a dose administrada.

Os estudos funcionais realizados serviram para tentar compreender o mecanismo farmacológico subjacente ao efeito contráctil induzido pela anfetamina. Numa primeira fase, e tendo em conta o que foi descrito na introdução sobre os mecanismos subjacentes à contracção intestinal, foi considerada a hipótese de um reforço da acção da ACh a nível pós-sináptico por parte da anfetamina. Nesse sentido, foi utilizado a atropina, um antagonista não selectivo dos receptores muscarínicos, permitindo bloquear todos os receptores existentes nas preparações de íleo de rato. A atropina não alterou as curvas CR à anfetamina, excluindo, por isso, o envolvimento dos receptores muscarínicos no mecanismo contráctil do fármaco em estudo.

Foi também necessário estudar a interferência da anfetamina na componente histaminérgica intestinal. Para isso foram realizadas curvas CR na ausência e na presença de mepiramina, um antagonista/agonista inverso dos receptores H_1 . Apenas foi analisado este tipo de receptor por este estar descrito no músculo liso e mediar a sua contracção. Tendo em conta os resultados obtidos, em que não houve alterações na curva CR à anfetamina, o envolvimento da histamina ou do mecanismo de tradução de sinal associado ao receptor H_1 foi excluído.

Estando as componentes histaminérgica e colinérgica excluídas, tornou-se imperativo estudar a componente serotoninérgica, uma vez que a actividade intestinal apresenta essa forte componente. Tendo em conta a distribuição dos tipos e subtipos de receptores da 5-HT descritos em intestino, excluíram-se os receptores 5-HT₅ e 5-HT₆, por estes não se encontrarem descritos no tracto GI e os receptores 5-HT₄ e 5-HT₇, por promoverem o relaxamento intestinal, direccionando-se os estudos funcionais para os receptores 5-HT₂. Por um lado, os recursos disponíveis não permitiram fazer um *screening* mais pormenorizado, por outro lado, estudos imunohistoquímicos realizados por outra colega do grupo revelaram ausência de marcação dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nas camadas musculares e plexos nervosos em cortes histológicos de íleo de rato Wistar, espécie animal igualmente utilizada neste estudo (Henriques, 2011). Deste modo, avaliámos a intervenção dos dois subtipos dos receptores 5-HT₂, os 5-HT_{2A} e os 5-HT_{2B} (os receptores 5-HT_{2C} como já referido na introdução têm apenas uma localização central) na resposta contráctil à anfetamina através de estudos funcionais e estudos imunohistoquímicos.

Foi, em primeiro lugar, utilizado um antagonista não selectivo para os receptores 5-HT₂, a ritanserina ($pK_i=8,8$ para receptores 5-HT_{2A}; $pK_i=8,3$ para receptores 5-HT_{2B}; $pK_i=8,9$ para receptores 5-HT_{2C}) (Baxter *et al.*, 1995). Os resultados obtidos foram, sem margem para dúvidas, muito claros quanto à redução significativa da resposta contráctil do íleo à anfetamina induzida pela ritanserina, o que evidencia o envolvimento de receptores 5-HT₂. Aliás, na última dose da curva CR a ritanserina induziu inclusive a anulação do tónus basal característico deste órgão de cerca de 10% da contracção obtida com 100 μ M de ACh. De forma a ficar claro, que esta diminuição na contracção não se tratava na realidade, de uma activação de receptores α -adrenérgicos que no intestino têm uma acção inibitória, potenciando dessa forma um relaxamento, foram também realizadas curvas CR na ausência e na presença de

prazosina, um antagonista selectivo dos receptores α_1 -adrenérgicos, e na presença, em simultâneo, de prazosina e ritanserina. De facto, a anulação do tónus basal tanto poderia traduzir a não selectividade da ritanserina para receptores serotoninérgicos, como poderia traduzir o mecanismo de acção clássico atribuído à anfetamina, com indução da libertação de catecolaminas nas doses mais altas da curva CR e consequente relaxamento por activação de receptores adrenérgicos, sobretudo na presença da anulação da componente contráctil mediada por receptores 5-HT₂. A presença da prazosina por si só potenciou de forma significativa a contracção do íleo reforçando a ideia de que o bloqueio de mecanismos adrenérgicos inibitórios potencia a acção excitatória/contráctil da anfetamina. No entanto, a adição de prazosina não alterou a curva CR à anfetamina na presença de ritanserina o que reitera a selectividade deste último antagonista para receptores serotoninérgicos. Tendo em conta estes resultados, foi necessário averiguar qual o subtipo do receptor 5-HT₂ que estaria envolvido na resposta contráctil do órgão à anfetamina, e nesse sentido, foram realizadas curvas CR na presença de cetanserina, um antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (pKi=8,9 e 7,0, respectivamente) (Baxter *et al.*, 1995) e na presença de 0,05 μ M e 0,25 μ M de RS 127445, antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2B} (pKi=9,5 para receptores 5-HT_{2B} vs pKi=6,3 para receptores 5-HT_{2A}) (Bonhaus *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2012). Não houve diferenças significativas relativamente à eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) da anfetamina na presença dos dois antagonistas, registando-se, no entanto, redução significativa da potência (pEC₅₀), isto é, um antagonismo de tipo competitivo. Tanto o RS 127445, na sua concentração mais selectiva (0,05 μ M), como a cetanserina induziram um desvio para a direita da curva CR da anfetamina sem alteração da resposta máxima, o que pressupõe o envolvimento de receptores 5-HT_{2A} e de receptores 5-HT_{2B} na resposta contráctil do íleo isolado de rato à anfetamina.

Os protocolos para a caracterização do receptor serotoninérgico envolvido na resposta contráctil do íleo de rato à anfetamina foram igualmente executados com o agonista total desses receptores, a 5-HT.

A ritanserina alterou de modo muito significativo a resposta contráctil do íleo à 5-HT exógena, havendo uma redução do seu efeito máximo de 58%. Foram ainda realizadas curvas CR à 5-HT exógena na presença do RS 127445 nas duas concentrações acima já referidas. Embora se tenham observado reduções significativas na resposta contráctil à anfetamina em doses intermédias das curvas CR

com ambas as concentrações do antagonista não se observaram diferenças significativas na actividade intrínseca ($E_{máx}$) da 5-HT nem na potência (pEC_{50}) da mesma. Relativamente à cetanserina, esta alterou significativamente a resposta máxima à 5-HT não tendo alterado a potência do agonista nesta preparação.

Os estudos imunohistoquímicos corroboraram os resultados dos estudos funcionais uma vez que revelaram imunoreactividade para o receptor 5-HT_{2A} e para o receptor 5-HT_{2B} em células ganglionares do plexo mientérico e do plexo submucoso, mas não nas células musculares lisas da camada circular ou longitudinal da parede intestinal. A sobreposição local dos dois subtipos de receptores leva-nos a colocar duas hipóteses: ou se trata do mesmo receptor ou há co-localização de ambos os receptores. De facto não foi observado um efeito somatório na redução da resposta contráctil à anfetamina e à 5-HT na presença de ambos os antagonistas, cetanserina e RS 127445, (resultados não apresentados), mas a ritanserina, antagonista não selectivo, teve um efeito substancialmente maior que cada um dos antagonistas selectivos utilizados individualmente.

Assim, tendo em conta que o mecanismo da anfetamina envolve a componente serotoninérgica, foi proposta que aquela poderia interferir com a libertação endógena de 5-HT a partir das células EC, uma vez que estas são o principal armazém de 5-HT no sistema GI. O que poderia estar a acontecer com os antagonistas utilizados é que estes poderiam estar a antagonizar a resposta contráctil à 5-HT endógena, cuja libertação é estimulada pela anfetamina ao nível das células EC. A literatura sugere que a 5-HT possui um papel importante na fisiopatologia do sistema GI, por exemplo na síndrome do intestino irritável, as perturbações na funcionalidade das células EC e na sinalização da 5-HT afectam de modo directo e indirecto as funções secretora e motora intestinais, podendo levar à ocorrência de diarreia ou obstipação (Crowell, 2004; Sikander *et al.*, 2009). Deste modo pretendeu-se avaliar o efeito da desgranulação das células EC por parte da anfetamina, tendo presente a capacidade da anfetamina de interferir com o VMAT-2. Assim, foram realizadas curvas CR à anfetamina na ausência e na presença de uma pré-incubação com 100 μ M de reserpina (Henriques, 2011), um inibidor do transportador vesicular de monoaminas cujo efeito se traduz na diminuição da pool vesicular das células EC. Tendo em conta os resultados obtidos com reserpina em que se verificou uma diminuição significativa da resposta contráctil em todas as doses da curva CR à anfetamina, pode-se concluir

que realmente a anfetamina provoca a libertação de 5-HT endógena a partir de células EC. Foram também realizadas curvas CR à anfetamina na ausência e na presença de fluoxetina, um inibidor selectivo da recaptação de 5-HT. Houve também redução da resposta máxima à anfetamina, o que evidencia a importância do SERT na acção da mesma. Estes resultados vieram reforçar a ideia da importância da 5-HT endógena na resposta contráctil do íleo de rato à anfetamina.

Tendo em consideração a recente possibilidade das células EC possuírem na membrana receptores específicos (acoplados à proteína G e adenil ciclase positivos) para as TA, que induzem a libertação de 5-HT (Kidd *et al.*, 2008) e em colaboração com a La Roche, foi possível testar o antagonista selectivo dos receptores TAAR1, o EPPTB. Foram por isso realizadas curvas CR à anfetamina e à tiramina (agonista total dos receptores TAAR1) na ausência e na presença do antagonista. Houve, efectivamente, diminuição da resposta máxima à tiramina e à anfetamina quando o antagonista foi utilizado na concentração de 5 μ M. Tendo em conta estes resultados, os receptores TAAR1 podem realmente intervir na resposta contráctil do íleo de rato à anfetamina. Mais ainda, tendo presente que os TAAR1 são intracelulares (ver Introdução), a fluoxetina, inibidor do SERT, poderá ter inibido o acesso da amina ao compartimento intracelular impedindo sua acção. Assim é possível que a anfetamina actue directamente nas células EC activando esses receptores e que posteriormente haja a libertação de 5-HT, corroborando a importância destas células na resposta contráctil do órgão à anfetamina. Neste caso, seria imperativo saber a localização celular destes receptores, no entanto, o impedimento financeiro constituiu uma grande limitação nesse sentido.

Com o intuito de avaliar o impacto da administração *in vivo* de anfetamina na função intestinal foi estudada a resposta contráctil do íleo isolado de rato, 24 horas após a administração de anfetamina, bem como o impacto no comportamento do animal e sua neurotoxicidade.

Relativamente aos estudos *in vivo* realizados, a variação da temperatura do animal sujeito a anfetamina ao longo do tempo parece ter tido um papel fundamental quanto ao comportamento que o mesmo apresentou. É necessário referir que a temperatura ambiente da sala onde foram realizados os estudos *in vivo*, foi controlada para que não houvesse a variável da temperatura ambiente. A temperatura foi mantida nos 22°C

(como recomendado pela Charles River). Após a administração do fármaco, o animal que foi injectado com a solução salina de anfetamina, começou a ter um comportamento estereotipado. À medida que a temperatura corporal do animal ia aumentando, esse comportamento estereotipado exacerbava-se. Quando o pico de hipertermia era atingido, o animal entrava numa fase de exaustão em que, gradualmente, a actividade locomotora ia diminuindo até à fase em que o animal já não demonstrava qualquer actividade. Geralmente, a fase de exaustão demorava o mesmo tempo que demorava a temperatura corporal a atingir novamente a temperatura basal. Relativamente aos comportamentos estereotipados que já foram referidos no Capítulo 4 – Resultados, eles vão ao encontro do que já tinha sido verificado por outro grupo de investigadores (Curzon *et al.*, 1979). Curiosamente, estes comportamentos estereotipados também já foram observados em roedores aos quais tinha sido injectada β -PEA (Grandy, 2007).

As alterações macroscópicas observadas na cavidade abdominal dos ratos do grupo da anfetamina relativamente ao grupo controlo foram muito visíveis. O tamanho do cego, assim como o seu conteúdo, diminuiu drasticamente; o estômago aumentou de volume; o íleo encontrava-se mais constricto e mais rosado e a vasculatura mesentérica mais proeminente. Quanto à constrição do íleo, esta observação vai ao encontro do que já tinha sido referido no Capítulo 1 – Introdução, em que a anfetamina tem um efeito contráctil no órgão em estudo (Broadley *et al.*, 2009), daí a constrição basal que o órgão apresentava. Assim, a maior contratilidade do íleo poderá ter favorecido a motilidade intestinal fazendo com que o conteúdo intestinal fosse mais rapidamente expulso do organismo, razão pela qual o cego apresentava um volume tão reduzido comparativamente com o volume do cego dos ratos controlo. Deste modo, a maior contratilidade intestinal pressupõe maior efluxo de sangue pelas artérias mesentéricas de modo a que haja sempre disponibilidade de substâncias necessárias à contracção intestinal, resultando numa maior vascularização a nível do mesentério.

Para averiguar se houve alterações quanto à resposta contráctil do íleo, foram realizadas curvas CR à anfetamina e à 5-HT. Não tendo havido alterações na potência da anfetamina e 5-HT (pEC_{50}) observou-se uma tendência para aumento da eficácia da 5-HT e redução da mesma para a anfetamina. Este aumento na resposta contráctil do íleo à 5-HT pode ser explicado pela maior vascularização e maior constrição basal

já existente, potenciando nesta forma a contratilidade do órgão. Já no caso da resposta contráctil do íleo à anfetamina, a diminuição da contracção pode ser explicada pelo facto do órgão já se encontrar constricto. Segundo a literatura, caso a actividade entérica seja pronunciada, a anfetamina pode ter um efeito oposto, ou seja, diminuir a actividade entérica e deste modo causar obstipação (Goodman e Gilman, 2007). Desta forma, o facto do íleo já se encontrar com actividade entérica pronunciada, a resposta contráctil diminuiu.

Ainda relativo aos estudos *in vivo*, os estriados que foram recolhidos aquando do sacrifício dos animais, foram utilizados para a quantificação de dopamina e os seus metabolitos (DOPAC e HVA) e de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA. Os marcadores bioquímicos de neurotoxicidade incluem a diminuição dos níveis de monoaminas assim como dos seus maiores metabolitos (Carvalho *et al.*, 2012). Houve apenas uma diminuição estatisticamente significativa no nível estriatal total de dopamina. Isto querará dizer que provavelmente os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade foram activados. Posto isto, a dose terapêutica administrada de 15mg/Kg de anfetamina, embora tenha sido suficiente para causar alterações neuroquímicas, não induziu alterações funcionais significativas a nível periférico.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS
FUTURAS

A anfetamina é um fármaco utilizado no tratamento da narcolepsia, ADHD e também utilizado como anorexígeno. O abuso deste fármaco está associado a efeitos adversos a nível neurológico, psiquiátrico e cardiovascular. No entanto, os efeitos da anfetamina tracto GI são imprevisíveis. Nesse sentido, este trabalho procurou compreender os mecanismos farmacológicos subjacentes a esses efeitos imprevisíveis induzidos pela anfetamina, através de estudos funcionais de contracção de músculo liso de íleo de rato, de estudos *in vivo* e de estudos histoquímicos/imunohistoquímicos. Os resultados obtidos nos estudos funcionais em ratos Wistar excluem a possibilidade de um mecanismo muscarínico assim como o envolvimento da histamina ou do mecanismo de tradução de sinal associado ao receptor H_1 , no mecanismo de contracção intestinal induzido pela anfetamina. Sugere-se o envolvimento dos receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e TAAR1. Mais ainda, propõem-se que a anfetamina possa desencadear a libertação de monoaminas a partir das células EC. Os estudos histoquímicos e imunohistoquímicos revelaram imunoreactividade a receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B} em células ganglionares do plexo mientérico e submucoso, mas não nas células musculares lisas da camada circular ou longitudinal da parede intestinal. Assim sendo, não se pode descartar a hipótese de um terceiro interveniente (que não a ACh e a histamina) neste mecanismo, libertado a partir das células ganglionares e que actue em receptores específicos nas células musculares lisas. Relativamente aos estudos *in vivo*, a tendência que existe na diminuição da resposta contráctil à anfetamina do íleo isolado de rato previamente injectado com 15 mg/Kg de anfetamina, enfatiza que os efeitos associados à toma da anfetamina são imprevisíveis e dependem da contracção basal do órgão. Conclui-se também que o pico de hipertermia observado tem um papel fundamental no seu comportamento estereotipado e que embora a dose terapêutica administrada tenha sido suficiente para causar algum nível de neurotoxicidade a nível central, não induziu alterações funcionais significativas a nível periférico.

No futuro, será imperativo a realização de estudos histoquímicos/imunohistoquímicos para averiguar a localização celular dos TAAR1. O desenvolvimento de estudos moleculares que permitam identificar o mecanismo bioquímico intestinal da anfetamina seria, igualmente, um bom complemento a este trabalho. Será também necessário realizar novamente estudos *in vivo*,

preferencialmente administrando o fármaco oralmente (através de gavagem), de forma a mimetizar a toma do fármaco em humanos, e fazendo o sacrifício dos animais às 48 e 72 horas de modo a verificar possíveis alterações fisiofarmacológicas intestinais ao longo do tempo, à semelhança do que está descrito a nível central (Bowyer *et al.*, 1998).

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFIA

- AHLMAN H, Nilsson O. The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of Oncology*. 2001;12 Suppl 2:S63-8.
- ANDRADE R, Barnes N, Baxter G, Bockaert J, Branchek T, Cohen M, Dumuis A, Eglen R, Göthert M, Hamblin M, Hamon M, Hartig P, Hen R, Herrick-Davis K, Hills R, Hoyer D, Humphrey P, Latté K, Maroteaux L, Martin G, Middlemiss D, Mylecharane E, Peroutka S, Saxena P, Sleight A, Villalon C, Yocca F. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT_{1,2,4,5,6,7}. Last modified on 10/01/2012. Accessed on 27/02/2012. IUPHAR database (IUPHARDB).
- ASGHAR SJ, Tanay VA, Baker GB, Greenshaw A, Silverstone PH. Relationship of plasma amphetamine levels to physiological, subjective, cognitive and biochemical measures in healthy volunteers. *Human Psychopharmacology*. 2003;18(4):291-9.
- BALDESSARINI RJ, Fischer JE. Substitute and alternative neurotransmitters in neuropsychiatric illness. *Archives of General Psychiatry*. 1977;34(8):958-64.
- BALDESSARINI RJ. Trace amines and alternative neurotransmitters in the central nervous system. *Biochemical Pharmacology*. 1978 Mar 1;27(5):621-6.
- BARD JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(31):23422-6.
- BARGER G, Walpole GS. Isolation of the pressor principles of putrid meat. *Journal of Physiology*. 1909;38(4):343-52.
- BAXTER G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family reunited? *Trends in Pharmacological Sciences*. 1995;16(3):105-10.
- BAXTER GS, Murphy OE, Blackburn TP. Further characterization of 5-hydroxytryptamine receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. *British Journal of Pharmacology*. 1994;112(1):323-31.
- BENARROCH EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology*. 2007;69(20):1953-7.

- BERGER UV, Gu XF, Azmitia EC. The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *European Journal of Pharmacology*. 1992;215(2-3):153-60.
- BERMAN SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Molecular Psychiatry*. 2009;14(2):123-42.
- BERRY MD. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *Journal of Neurochemistry*. 2004;90(2):257-71.
- BERTRAND PP, Kunze WA, Furness JB, Bornstein JC. The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience*. 2000;101(2):459-69.
- BIRDSALL Nigel J. M., David A. Brown, Noel J. Buckley, Arthur Christopoulos, Richard M. Eglén, Frederick Ehlert, Rudolf Hammer, Heinz J. Kilbinger, Gunter Lambrecht, Fred Mitchelson, Ernst Mutschler, Neil M. Nathanson, Roy D. Schwarz, Andrew B. Tobin, Jürgen Wess. Acetylcholine receptors (muscarinic). Last modified on 23/02/2012. Accessed on 03/06/2012. IUPHAR database (IUPHAR-DB).
- BORMAN RA, Burleigh DE. Functional evidence for a 5-HT_{2B} receptor mediating contraction of longitudinal muscle in human small intestine. *British Journal of Pharmacology*. 1995;114(8):1525-7.
- BORMAN RA, Tilford NS, Harmer DW, Day N, Ellis ES, Sheldrick RL, Carey J, Coleman RA, Baxter GS. 5-HT_{2B} receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. *British Journal of Pharmacology*. 2002;135(5):1144-51.

- BOROWSKY B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhani PP, Bonini JA, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek TA, Gerald C. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 2001;98(16):8966-71.
- BOWYER JF, Frame LT, Clausing P, Nagamoto-Combs K, Osterhout CA, Sterling CR, Tank AW. Long-term effects of amphetamine neurotoxicity on tyrosine hydroxylase mRNA and protein in aged rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998;286(2):1074-85.
- BRADAIA A, Trube G, Stalder H, Norcross RD, Ozmen L, Wettstein JG, Pinard A, Buchy D, Gassmann M, Hoener MC, Bettler B. The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 2009;106(47):20081-6.
- BRIEJER MR, Mathis C, Schuurkes JA. 5-HT receptor types in the rat ileum longitudinal muscle: focus on 5-HT₂ receptors mediating contraction. *Neurogastroenterology and Motility*. 1997;9(4):231-7.
- BROADLEY KJ, Akhtar Anwar M, Herbert AA, Fehler M, Jones EM, Davies WE, Kidd EJ, Ford WR. Effects of dietary amines on the gut and its vasculature. *British Journal of Nutrition*. 2009;101(11):1645-52.
- BROADLEY KJ. The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010;125(3):363-75.
- BRUNTON, L, Lazo, J, Parker, K. Secção VI. Fármacos que afectam a função gastrointestinal; e secção XII – Hormonas e seus antagonistas. In Goodman and Gilman – *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11th ed, McGraw-Hill Companies, 2007.

- BUNZOW JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI, Darland T, Suchland KL, Pasumamula S, Kennedy JL, Olson SB, Magenis RE, Amara SG, Grandy DK. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Molecular Pharmacology*. 2001;60(6):1181-8.
- BURCHETT SA, Hicks TP. The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*. 2006;79(5-6):223-46.
- CAMILLERI M. Serotonin in the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2009;16(1):53-9.
- CAPELA JP, Carmo H, Remião F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F. Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview. *Molecular Neurobiology*. 2009;39(3):210-71.
- CARVALHO M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F, Carvalho F, Bastos MD. Toxicity of amphetamines: an update. *Archives of Toxicology*. 2012 Mar 6.
- CAULFIELD MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews*. 1998;50(2):279-90.
- CERVINSKI MA, Foster JD, Vaughan RA. Psychoactive substrates stimulate dopamine transporter phosphorylation and down-regulation by cocaine-sensitive and protein kinase C-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(49):40442-9.
- CHAZOT Paul, Hiroyuki Fukui, C. Robin Ganellin, Helmut L. Haas, Stephen J. Hill, Rebecca Hills, Roberto Levi, Walter Schunack, Jean-Charles Schwartz, Nigel P. Shankley, Henk Timmerman, J. Michael Young. Histamine receptors. Last modified on 10/02/2012. Accessed on 25/04/2012. IUPHAR database (IUPHAR-DB).

- COSTA M, Brookes SJ, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*. 2000;47 Suppl 4:iv15-9; discussion iv26.
- COSTA VM, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M, Remião F. Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases. *Current Medical Chemistry*. 2011;18(15):2272-314.
- CRESPI D, Mennini T, Gobbi M. Carrier-dependent and Ca²⁺-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *p*-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *British Journal of Pharmacology*. 1997;121(8):1735-43.
- CROWELL MD. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *British Journal of Pharmacology*. 2004;141(8):1285-93.
- CURZON G, Fernando JC, Lees AJ. Backward walking and circling: behavioural responses induced by drug treatments which cause simultaneous release of catecholamines and 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology*. 1979;66(4):573-9.
- DALE, M M, H P. Rang, and Maureen M. Dale. *Rang & Dale's Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2007. Print.
- DEGEN L, Matzinger D, Merz M, Appel-Dingemanse S, Osborne S, Lüchinger S, Bertold R, Maecke H, Beglinger C. Tegaserod, a 5-HT₄ receptor partial agonist, accelerates gastric emptying and gastrointestinal transit in healthy male subjects. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2001;15(11):1745-51.
- DIETRICH C, Kilbinger H. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus: potential mechanisms. *Neuropharmacology*. 1996;35(4):483-8.
- DONINI A, Lange AB. Evidence for a possible neurotransmitter/neuromodulator role of tyramine on the locust oviducts. *Journal of Insect Physiology*. 2004;50(4):351-61.
- FAN X, Hess EJ. D₂-like dopamine receptors mediate the response to amphetamine in a mouse model of ADHD. *Neurobiology of Disease*. 2007;26(1):201-11.

- FEHLER M, Broadley KJ, Ford WR, Kidd EJ. Identification of trace-amine-associated receptors (TAAR) in the rat aorta and their role in vasoconstriction by β -phenylethylamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2010;382(4):385-98.
- FIORICA-HOWELLS E, Hen R, Gingrich J, Li Z, Gershon MD. 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2002;282(5):G877-93.
- FLECKENSTEIN AE, Hanson GR. Impact of psychostimulants on vesicular monoamine transporter function. *European Journal of Pharmacology*. 2003;479(1-3):283-9.
- FLECKENSTEIN AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007;47:681-98.
- FOONG JP, Parry LJ, Gwynne RM, Bornstein JC. 5-HT(1A), SST(1), and SST(2) receptors mediate inhibitory postsynaptic potentials in the submucous plexus of the guinea pig ileum. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;298(3):G384-94
- FOX A, Morton IK. An examination of the 5-HT₃ receptor mediating contraction and evoked [³H]-acetylcholine release in the guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology*. 1990;101(3):553-8.
- FOXX-ORENSTEIN AE, Kuemmerle JF, Grider JR. Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology*. 1996;111(5):1281-90.
- FULLER RW, Hemrick-Luecke S. Long-lasting depletion of striatal dopamine by a single injection of amphetamine in iprindole-treated rats. *Science*. 1980;209(4453):305-7.
- GEBAUER A, Merger M, Kilbinger H. Modulation by 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors of the release of 5-hydroxytryptamine from the guinea-pig small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1993;347(2):137-40.

- GERSHON MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414.
- GERSHON MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 1999;13 Suppl 2:15-30.
- GLATZLE J, Sternini C, Robin C, Zittel TT, Wong H, Reeve JR Jr, Raybould HE. Expression of 5-HT₃ receptors in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2002;123(1):217-26.
- GOYAL RK. Identification, localization and classification of muscarinic receptor subtypes in the gut. *Life Sciences*. 1988;43(26):2209-20.
- GRANDY DK. Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast? *Pharmacology and Therapeutics*. 2007;116(3):355-90.
- GRIDER JR. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;307(2):460-7.
- GUDELSKY GA, Nash JF. Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *Journal of Neurochemistry*. 1996;66(1):243-9.
- HAAS HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiology Reviews*. 2008;88(3):1183-241.
- HANSEN MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiological Research*. 2003;52(1):1-30.
- HARTUNG HW, Munch JC. Amino alcohols: VI. The preparation and pharmacodynamic activity of 4 isomeric phenylisopropylamines. *Journal of the American Chemical Society*, 1931;53:1875-1879.
- HEGDE SS, Wong AG, Perry MR, Ku P, Moy TM, Loeb M, Eglen RM. 5-HT₄ receptor mediated stimulation of gastric emptying in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1995;351(6):589-95.

- HENRIQUES, Alda Maria Pereira da Silva Duarte – Caracterização farmacológica da contracção intestinal induzida pela metformina. Coimbra; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 2011. Tese de Mestrado.
- HERBERT AA, Kidd EJ, Broadley KJ. Dietary trace amine-dependent vasoconstriction in porcine coronary artery. *British Journal of Pharmacology*. 2008;155(4):525-34.
- HIROTA CL, McKay DM. Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British Journal of Pharmacology*. 2006;149(5):463-79.
- HIRST GD, Edwards FR. Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004;96(1):1-10.
- HOYER D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. VII. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*. 1994;46(2):157-203.
- HUIZINGA JD, Lammers WJ. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009;296(1):G1-8.
- INNES IR, Kohli JD. Excitatory action of sympathomimetic amines on 5-hydroxytryptamine receptors of gut. *British Journal of Pharmacology*. 1969;35(3):383-93.
- INNES IR. Action of dexamphetamine on 5-hydroxytryptamine receptors. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 1963;21:427-35.
- KADOWAKI M, Wang XO, Shimatani H, Yoneda S, Takaki M. 5-HT₄ receptor enhances the propulsive power of the peristaltic reflex in the rat distal colon. *Autonomic Neuroscience*. 2002;31;99(1):62-5.
- KAKIMOTO Y, Armstrong MD. On the identification of octopamine in mammals. *Journal of Biological Chemistry*. 1962;237:422-7.
- KATZUNG B. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th Edition. McGraw-Hill Medical, 2009.

- KIDD M, Modlin IM, Gustafsson BI, Drozdov I, Hauso O, Pfragner R. Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008;295(2):G260-72.
- KISO T, Ito H, Miyata K, Kamato T, Naitoh Y, Iwaoka K, Yamaguchi T. A novel 5-HT₃ receptor agonist, YM-31636, increases gastrointestinal motility without increasing abdominal pain. *European Journal of Pharmacology*. 2001 9;431(1):35-41.
- KOMADA T, Yano S. Pharmacological characterization of 5-Hydroxytryptamine-receptor subtypes in circular muscle from the rat stomach. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(3):508-13.
- KOPIN IJ, Fischer JE, Musacchio J, Horst WD. Evidence for a false neurochemical transmitter as a mechanism for the hypotensive effect of monoamine oxidase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1964;52:716-21.
- LIBERLES SD, Buck LB. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*. 2006;442(7103):645-50.
- LINDEMANN L, Ebeling M, Kratochwil NA, Bunzow JR, Grandy DK, Hoener MC. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*. 2005;85(3):372-85.
- LINDEMANN L, Hoener MC. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005;26(5):274-81.
- LINDEMANN L, Meyer CA, Jeanneau K, Bradaia A, Ozmen L, Bluethmann H, Bettler B, Wettstein JG, Borroni E, Moreau JL, Hoener MC. Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;324(3):948-56.
- LIU L, Coupar IM. Characterisation of pre- and post-synaptic alpha-adrenoceptors in modulation of the rat ileum longitudinal and circular muscle activities. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1997;356(2):248-56.

- LIU S, Xia Y, Hu H, Ren J, Gao C, Wood JD. Histamine H3 receptor-mediated suppression of inhibitory synaptic transmission in the submucous plexus of guinea-pig small intestine. *European Journal of Pharmacology*. 2000;397(1):49-54.
- MAGUIRE JJ, Parker WA, Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Davenport AP. International Union of Pharmacology. LXXII. Recommendations for trace amine receptor nomenclature. *Pharmacological Reviews*. 2009;61(1):1-8.
- MANDELL AJ, Morgan M. Amphetamine induced increase in tyrosine hydroxylase activity. *Nature*. 1970;227(5253):75-6.
- MANDL P, Kiss JP. Role of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of gastrointestinal motility. *Brain Research Bulletin*. 2007;72(4-6):194-200.
- MCLEAN PG, Coupar IM. Further investigation into the signal transduction mechanism of the 5-HT4-like receptor in the circular smooth muscle of human colon. *British Journal of Pharmacology*. 1996;118(4):1058-64.
- MCLEAN PG, Coupar IM. Stimulation of cyclic AMP formation in the circular smooth muscle of human colon by activation of 5-HT4-like receptors. *British Journal of Pharmacology*. 1996;117(2):238-9.
- MICHEL K, Zeller F, Langer R, Nekarda H, Kruger D, Dover TJ, Brady CA, Barnes NM, Schemann M. Serotonin excites neurons in the human submucous plexus via 5-HT3 receptors. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1317-26.
- MILLER GM, Verrico CD, Jassen A, Konar M, Yang H, Panas H, Bahn M, Johnson R, Madras BK. Primate trace amine receptor 1 modulation by the dopamine transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;313(3):983-94.
- MILLER GM. The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. *Journal of Neurochemistry*. 2011;116(2):164-76.

- MITSUI R, Ono S, Karaki S, Kuwahara A. Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. *Neurogastroenterology and Motility*. 2005;17(4):585-94.
- MORGADINHO MT, Fontes Ribeiro CA, Macedo TR. Influence of the sample preparation method on the serotonin determination in plasma and platelets. *Biomedical Chromatography*. 2004;18(9):739-44.
- MUNDORF ML, Hochstetler SE, Wightman RM. Amine weak bases disrupt vesicular storage and promote exocytosis in chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*. 1999;73(6):2397-405.
- NAGAYA Y, Kutsukake M, Chigusa SI, Komatsu A. A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience Letters*. 2002;329(3):324-8.
- NEMETH PR, Ort CA, Wood JD. Intracellular study of effects of histamine on electrical behaviour of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Journal of Physiology*. 1984;355:411-25.
- NIESLER B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene*. 2003;22;310:101-11.
- NOZAWA K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;3;106(9):3408-13
- OLSSON C, Holmgren S. The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 2001;128(3):481-503.
- ONO S, Mitsui R, Karaki S, Kuwahara A. Muscarinic and 5-HT₄ receptors participate in the regulation of the frequency of spontaneous contractions of the longitudinal muscle in rat distal colon. *Biomedical Research*. 2005;26(4):173-7.

- PARTILLA JS, Dempsey AG, Nagpal AS, Blough BE, Baumann MH, Rothman RB. Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;319(1):237-46.
- PINESS G, Milles H, Alles G. Clinical observations on phenylaminoethanol sulphate. *Journal of the American Medical Association*, 1930;94:790-791.
- RACKÉ K, Reimann A, Schwörer H, Kilbinger H. Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural Brain Research*. 1996;73(1-2):83-7.
- RAMAMOORTHY S, Blakely RD. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science*. 1999;285(5428):763-6.
- REESE EA, Bunzow JR, Arttamangkul S, Sonders MS, Grandy DK. Trace amine-associated receptor 1 displays species-dependent stereoselectivity for isomers of methamphetamine, amphetamine, and para-hydroxyamphetamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;321(1):178-86.
- REEVES JJ, Bunce KT, Humphrey PP. Investigation into the 5-hydroxytryptamine receptor mediating smooth muscle relaxation in the rat oesophagus. *British Journal of Pharmacology*. 1991;103(1):1067-72.
- RIBEIRO CA, Macedo TR, Porfirio MH. Pharmacological characterization of the postsynaptic serotonergic receptor in the human uterine artery. *Pharmacology*. 1991;43(5):264-72.
- RIDDLE EL, Hanson GR, Fleckenstein AE. Therapeutic doses of amphetamine and methylphenidate selectively redistribute the vesicular monoamine transporter-2. *European Journal of Pharmacology*. 2007;571(1):25-8.
- ROTHMAN RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, Partilla JS. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*. 2001;39(1):32-41.

- SANDER LE, Lorentz A, Sellge G, Coëffier M, Neipp M, Veres T, Frieling T, Meier PN, Manns MP, Bischoff SC. Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut*. 2006;55(4):498-504.
- SANTOS, Sónia Alexandra Pinto Ribeiro da Silva – Efeitos adversos dos triptanos: suas bases farmacológicas. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (2005). Tese de Doutoramento.
- SCHÄFERMEYER A, Gratzl M, Rad R, Dossumbekova A, Sachs G, Prinz C. Isolation and receptor profiling of ileal enterochromaffin cells. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2004;182(1):53-62.
- SCHWÖRER H, Ramadori G. Autoreceptors can modulate 5-hydroxytryptamine release from porcine and human small intestine in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1998;357(5):548-52.
- SHERWOOD, Lauralee; *Human Physiology: from cells to systems*. 7th Edition. Brooks Cole. 2008. Chapter 8: Muscle Physiology.
- SIKANDER A, Rana SV, Prasad KK. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clinica Chimica Acta*. 2009;403(1-2):47-55.
- SITTE HH, Freissmuth M. The reverse operation of Na(+)/Cl(-)-coupled neurotransmitter transporters--why amphetamines take two to tango. *Journal of Neurochemistry*. 2010;112(2):340-55.
- SOTNIKOVA TD, Caron MG, Gainetdinov RR. Trace amine-associated receptors as emerging therapeutic targets. *Molecular Pharmacology*. 2009;76(2):229-35.
- SULZER D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in Neurobiology*. 2005;75(6):406-33.
- TOBIN G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;60(1):3-21.

- TULADHAR BR, Costall B, Naylor RJ. Modulation of 5-HT₄ receptor function in the rat isolated ileum by fluoxetine: the involvement of endogenous 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology*. 2002;136(1):150-6.
- TULADHAR BR, Costall B, Naylor RJ. Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor mediating relaxation in the rat isolated ileum. *British Journal of Pharmacology*. 1996;119(2):303-10.
- TULADHAR BR, Womack MD, Naylor RJ. Pharmacological characterization of the 5-HT receptor-mediated contraction in the mouse isolated ileum. *British Journal of Pharmacology*. 2000;131(8):1716-22.
- TUO BG, Sellers Z, Paulus P, Barrett KE, Isenberg JI. 5-HT induces duodenal mucosal bicarbonate secretion via cAMP- and Ca²⁺-dependent signaling pathways and 5-HT₄ receptors in mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004;286(3):G444-51.
- VANDER A, Sherman J, Luciano D, Widmaier E, Raff H, Strang H. *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. McGraw-Hill; 9th ed. 2003.
- VARMA DR, Chemtob S. Endothelium- and beta-2 adrenoceptor-independent relaxation of rat aorta by tyramine and certain other phenylethylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993;265(3):1096-104.
- VARMA DR, Deng XF, Chemtob S, Nantel F, Bouvier M. Characterization of the vasorelaxant activity of tyramine and other phenylethylamines in rat aorta. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1995;73(6):742-6.
- WAINSCOTT DB, Little SP, Yin T, Tu Y, Rocco VP, He JX, Nelson DL. Pharmacologic characterization of the cloned human trace amine-associated receptor1 (TAAR1) and evidence for species differences with the rat TAAR1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;320(1):475-85.
- WEBB RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*. 2003;27(1-4):201-6.

- WICHEMS CH, Hollingsworth CK, Bennett BA. Release of serotonin induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and other substituted amphetamines in cultured fetal raphe neurons: further evidence for calcium-independent mechanisms of release. *Brain Research*. 1995;695(1):10-8.
- WISE MS, Arand DL, Auger RR, Brooks SN, Watson NF. Treatment of narcolepsy and other hypersomnias of central origin. *Sleep*. 2007;30(12):1712-27.
- WOLGIN DL. Amphetamine stereotypy, the basal ganglia, and the "selection problem". *Behavioural Brain Research*. 2011 Nov 11.
- WOOD JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut*. 1999;45 Suppl 2:II6-II16.
- WOOD JD. Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. *Gut*. 2006;55(4):445-7.
- WOOD JD. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(9):1313-32.
- XIE Z, Miller GM. Trace amine-associated receptor 1 is a modulator of the dopamine transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;321(1):128-36.
- XIE Z, Westmoreland SV, Bahn ME, Chen GL, Yang H, Vallender EJ, Yao WD, Madras BK, Miller GM. Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(1):116-27.
- YAMADA J, Sugimoto Y, Ohkura M, Inoue K. Effects of the 5-HT₂ receptor antagonist, ritanserin on hyperthermia and depletion of 5-HT in frontal cortex induced by a 5-HT releasing drug, p-chloroamphetamine (PCA) in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2001;24(10):1195-7.
- ZUCCHI R, Chiellini G, Scanlan TS, Grandy DK. Trace amine-associated receptors and their ligands. *British Journal of Pharmacology*. 2006;149(8):967-78.