

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CINARA LUDVIG GONÇALVES

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE
FEMPROPOREX SOBRE PARÂMETROS DE DANO AO DNA
EM RATOS JOVENS E ADULTOS**

**CRICIÚMA
2013**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CINARA LUDVIG GONÇALVES

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE
FEMPROPOREX SOBRE PARÂMETROS DE DANO AO DNA
EM RATOS JOVENS E ADULTOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz
Streck

**CRICIÚMA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G635e Gonçalves, Cinara Ludvig.

Efeito da administração aguda e crônica de Femproporex sobre parâmetros de dano ao DNA em ratos jovens e adultos / Cinara Ludvig Gonçalves ; Orientador : Emílio Luiz Streck. – Criciúma : Ed. do Autor, 2013.

53 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2013.

1 Medicamento - Administração. 2. Obesidade – Tratamento. 3. Dano ao DNA. 4. Femproporex. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Cinara Ludvig Gonçalves** sob o título “**Efeito da administração aguda e crônica de Femproporex sobre parâmetros de dano ao DNA em ratos jovens e adultos**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

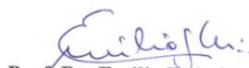
Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A .

Criciúma, SC, 26 de fevereiro de 2013


Profa. Dra. Alexandra Joppi Zugno
Membro Relator


Profa. Dra. Josiane Budni
Membro Externo


Profa. Dra. Sílvia Dal Bó
Membro Externo


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Orientador


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Folha informativa

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética e do Laboratório de Biologia Celular do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

À minha família, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar comigo todos os dias de trabalho, protegendo, acalmando e fortalecendo.

Aos meus pais, minha mãe Norma, por ser uma pessoa incrível, sábia, e acolhedora que sempre me apoiou em todas as minhas buscas, meu modelo de perseverança e sucesso. Meu pai Darci, pela simplicidade e sinceridade dos gestos, por ter ajudado onde e como podia.

Aos meus irmãos Davi e Cibelly, pelas conversas, as sérias e as descompromissadas. Pela sintonia e empatia que só irmãos possuem.

Ao meu noivo Maycol, por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos, com uma palavra, um sorriso, um abraço... incentivando e torcendo por mim. Juntos, tudo fica mais fácil.

Ao meu orientador professor Emilio Luiz Streck, pelo incentivo na pesquisa e pela confiança depositada em mim desde o período de iniciação científica até a conclusão de meu mestrado. Este período foi de muito aprendizado intelectual e pessoal.

À minhas colegas de laboratório (hoje amigas) Gabriela, Dhébora e Fram com quem convivi intensamente estes dois anos e que me ensinaram a ver a vida de várias perspectivas. Cada uma é única e insubstituível.

À Gislane T. Rezin pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre e com muita paciência, obrigada pelas contribuições neste projeto.

À Fá, Isabela e Camila, pessoas especiais que emanam energia positiva, mesmo distante, foram pessoas que iluminaram muitos momentos de minha vida, projetos, experimentos e conversas.

À Gislane Z. Réus por ser essa pessoa simples (e chique!), prestativa, parceira e alegre.

À Mariane, Thais, Giselli, Samira e Ândrea, com quem dividi disciplinas, dúvidas, quartos de hotel e momentos no dia-a-dia no laboratório.

Obrigada a todos por terem feito parte de minha história.

Agradeço ao apoio financeiro concedido pela UNESC e CAPES.

*“Menor que meu sonho eu não
posso ser.”*

Lindolf Bell

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica, multifatorial, e com tratamento de custo elevado, cuja prevalência vem aumentando em muitos países. Estratégias farmacêuticas para o tratamento da obesidade incluem os fármacos que regulam a ingestão de alimentos, a termogênese, a absorção de gordura, e seu metabolismo. O femproporex é o segundo anorexígeno a base de anfetamina (AMPH) mais consumido no mundo, o fármaco é rapidamente convertido *in vivo* em AMPH, a qual está associado a neurotoxicidade. Neste contexto, o presente estudo avaliou índice e frequência de dano ao DNA no sangue periférico de ratos Wistar jovens e adultos submetidos à administração aguda e crônica de femproporex. Na administração aguda, ratos machos jovens e adultos receberam uma única injeção de femproporex (6,25; 12,5 ou 25mg/kg i.p.) ou tween 2% para o grupo controle. Na administração crônica, os ratos jovens e adultos receberam uma injeção diária de femproporex (6,25; 12,5, ou 25mg/kg i.p.) ou tween 2% durante 14 dias. Duas horas após a última administração, os ratos foram mortos por decapitação e o sangue periférico coletado para avaliação dos parâmetros de dano ao DNA. O nosso estudo mostrou que a administração aguda de femproporex em ratos jovens e adultos elevou os níveis de índice e frequência de dano ao DNA. No entanto, após a administração crônica de femproporex em ratos jovens e adultos não houve alteração nos parâmetros avaliados. Os nossos resultados mostraram que a administração aguda de femproporex promoveu dano ao DNA, em ambos os ratos jovens e adultos. Com isso, sugerimos a ativação de um mecanismo eficiente de reparo ao DNA que atua após exposição crônica ao femproporex.

Palavras-chave: femproporex; dano ao DNA; sangue periférico; obesidade.

ABSTRACT

Obesity is a chronic, multifactorial, and costly disease, and its prevalence is increasing in many countries. Pharmaceutical strategies for the treatment of obesity include drugs that regulate food intake, thermogenesis, fat absorption, and fat metabolism. Fenproporex is the second most commonly consumed amphetamine-based anorectic worldwide; this drug is rapidly converted in vivo into amphetamine (AMPH), which is associated with neurotoxicity. In this context, the present study evaluated the index and frequency of DNA damage in the peripheral blood of young and adult Wistar rats submitted to an acute and chronic administration of fenproporex. In the acute administration, young and adult male rats received a single injection of fenproporex (6.25, 12.5 or 25mg/kg, i.p.) or tween 2%. In the chronic administration, young and adult rats received one daily injection of fenproporex (6.25, 12.5, or 25mg/kg, i.p.) or tween 2% for 14 days. Two hours after the last injection, the rats were killed by decapitation and their peripheral blood removed for evaluation of DNA damage parameters. Our study showed that acute administration of fenproporex in young and adult rats presented higher levels of damage index and frequency in the DNA. However, chronic administration of fenproporex in young and adult rats did not alter the levels of DNA damage in both parameters of the Comet assay. Our results showed that acute administration of fenproporex promoted damage in DNA, in both young and adult rats. We suggest the activation of an efficient DNA repair mechanism that acts after chronic exposure to fenproporex.

Keywords: fenproporex; DNA damage; peripheral blood; obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da anfetamina e do femproporex.....	24
Figura 2. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico.....	31
Figura 3. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico.....	31
Figura 4. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos adulto sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico.....	32
Figura 5. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos adulto sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico.....	32
Figura 6. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico.....	33
Figura 7. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico.....	33
Figura 8. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos adultos sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico.....	34
Figura 9. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos adultos sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPH – Anfetamina, do inglês *amphetamine*
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARC- Núcleo Arqueado, do inglês *Arcuate Nucleus*
COMT - catecol-o-metiltransferase
d-AMPH – dextroanfetamina, do inglês *dextroamphetamine*
DM - *Diabetes mellitus*
DM2 - *Diabetes mellitus* tipo 2
DA- Dopamina
DNA - Ácido desoxirribonucléico, do inglês *desoxyribonucleic acid*
EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos, do inglês *Food and Drug Administration*
IMC - Índice de Massa Corporal
LMP - Agarose de Baixo Ponto de Fusão, do inglês *Low-Melting Point*
m-AMPH- meta-anfetamina
MDMA - Metilendioximetanfetamina
NMDA- N-metil D-Aspartato
NMP- Agarose de Ponto de Fusão Normal, do inglês *Normal Melting Point*
NA- Noradrenalina
NOSn- Óxido Nítrico Sintase Neuronal
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Tampão Fosfato-Salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*
POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares
SCGF - Ensaio cometa, do inglês *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*
SNC - Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBESIDADE.....	16
1.1.1 Definição.....	16
1.1.2 Etiologia.....	16
1.1.3 Epidemiologia.....	17
1.2 Tratamento farmacológico para obesidade.....	18
1.2.1 Anfetaminas.....	21
1.2.2 Femproporex.....	23
1.3 GENOTOXICIDADE DE FÁRMACOS.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Geral.....	27
2.2 Específicos.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
3.2 DILUIÇÃO DO MEDICAMENTO.....	28
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	28
3.3.1 Administração aguda de femproporex.....	29
3.3.2 Administração crônica de femproporex.....	29
3.4 ENSAIO COMETA.....	29
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS.....	31
5 DISCUSSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

1.1.1 Definição

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2006) define obesidade como uma condição de acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo, numa extensão em que comprometa a saúde do paciente. Um dos principais diagnósticos para a classificação do grau da enfermidade relacionada ao aumento do peso é baseado no cálculo do índice de massa corporal (IMC). Esse valor correspondente à divisão da massa corporal (em quilogramas) do indivíduo pelo quadrado de sua altura (em metros). Sendo que valores acima de 30 são considerados grau I de obesidade. As medidas cirúrgicas devem ser restritas aos pacientes com obesidade grau II ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$) associada à comorbidades e pessoas com obesidade grau III ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) (Wannmacher, 2004).

1.1.2 Etiologia

A etiologia da obesidade é complexa e multifatorial, consequência da interação de genes, ambiente, estilos de vida e fatores emocionais. A causa fundamental da obesidade e do sobrepeso é um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias utilizadas. Atualmente observa-se a união de dois fatores agravantes: o excesso de energia fornecida por alimentos ricos em gordura, sal e açúcares, mas pobres em vitaminas, minerais e outros micronutrientes, junto à diminuição da atividade física devido a hábitos sedentários (WHO, 2012).

A ocorrência da obesidade reflete a interação entre fatores dietéticos e ambientais com uma predisposição genética. O controle da ingestão de nutrientes e o decorrente estado de equilíbrio homeostático dependem de uma série de sinais periféricos que atuam diretamente sobre o sistema nervoso central (SNC), levando a respostas adaptativas adequadas. No SNC, um complexo circuito regula a ingestão de alimentos e o gasto de energia. De modo geral, o peso corporal é regulado por uma interação complexa entre hormônios e neuropeptídeos, sob o controle principal de núcleos hipotalâmicos (Duarte et al., 2005). Os neurônios do núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo são o principal alvo desses sinais circulantes. Os neurônios

do ARC expressam neurotransmissores do controle anabólico (orexígeno) e catabólico (anorexígenos) os neurônios do ARC inervam o núcleo medial (ventromedial e paraventricular) e o hipotálamo lateral (Velloso, 2006).

A carga genética está relacionada à estabilidade na manutenção de peso e gordura corporal ao longo do tempo. Mutações nos genes de hormônios e neuropeptídeos de seus receptores ou de seus elementos regulatórios estão associados à obesidade (Guilá, 2003; Duarte et al., 2005), embora não explicando as formas mais comuns dessa patologia (Duarte et al., 2005). As vias de expressão gênica controlam a regulação de vias eferentes (leptina, nutrientes, sinais nervosos) de mecanismos centrais (neurotransmissores hipotalâmicos) e de vias aferentes (insulina, catecolaminas, sistema nervoso autônomo) (Marques-Lopes et al., 2004).

1.1.3 Epidemiologia

Atualmente, a obesidade é considerada o transtorno nutricional mais preocupante em países desenvolvidos e em desenvolvimento, trata-se de um problema de saúde pública com caráter epidêmico devido ao substancial aumento da sua incidência em todo o mundo (ABESO, 2010a). Desde 1980, a obesidade mais do que duplicou no mundo. Pesquisas apontam que 65% da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade mata mais pessoas do que a subnutrição (WHO, 2012).

No Brasil, a obesidade como problema de saúde pública é um evento recente. Dados da Vigitel (2011) apontam que quase metade da população brasileira está acima do peso (48,5%). Os resultados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em parceria com o Ministério da Saúde revelou dados alarmantes. Especialmente nos últimos seis anos houve um aumento substancial da obesidade e excesso de peso na população. Estima-se que 5,6 milhões de crianças (5 a 10 anos), 6,8 milhões de adolescentes (10 a 19 anos) e 61,5 milhões de adultos apresentam excesso de peso (IBGE, 2010).

O crescimento da obesidade no Brasil tem alcançado proporções epidêmicas, e gerado altos custos para os sistemas de saúde. Recentemente foram demonstrados os valores do custo da obesidade para o Sistema Único de Saúde (SUS). Estima-se que seja gasto cerca de US\$ 20.152.102.171 por ano com todas as doenças relacionadas ao sobrepeso e à obesidade, que inclui câncer, diabetes e doenças do

sistema cardiovascular. As hospitalizações custam US\$ 1.472.742.952, e os procedimentos de ambulatório, US\$ 679.353.348 (Bahia et al., 2012).

Dentre as comorbidades associadas ao sobrepeso e à obesidade estão: hipertensão arterial, dislipidemias, *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, doenças biliares, osteoartrite, apneia do sono e alguns tipos de câncer, principalmente pâncreas, cólon, seios e endometriose (Hernán-Daza, 2002; Sosa, 2004). Nos Estados Unidos, o impacto da obesidade relacionada a incidência de cânceres em 2007 representam cerca de 6% de todos os cânceres no país (Polednak, 2008).

1.2 Tratamento farmacológico para obesidade

Considerando os riscos inerentes à obesidade, é evidente a necessidade em tratar o paciente, não apenas com a finalidade estética, mas também, e principalmente, devido aos prejuízos causados à saúde (USP DI, 2005; Rang et al., 2007). De modo geral, o uso de medicamentos no tratamento da obesidade e sobrepeso é indicado quando houver falha do tratamento não farmacológico, em pacientes: com IMC igual ou superior a 30 kg/m²; com IMC igual ou superior a 25 kg/m² associado a outros fatores de risco, como a hipertensão arterial, DM2, hiperlipidemia, apneia do sono, osteoartrose, gota; ou quando a circunferência abdominal for maior ou igual a 102 cm (homens) e 88 cm (mulheres) (ABESO, 2010a).

Por muito tempo o tratamento farmacológico da obesidade foi visto como uma opção terapêutica controversa e sujeita a inúmeras críticas. Isso se deve a vários fatores; entre eles, erros no uso racional dos agentes disponíveis, generalização da prescrição de medicamentos, abusos na comercialização de cápsulas manipuladas, desvalorização da orientação do tratamento clássico (orientação dietética hipocalórica, aumento de atividade física programada ou não programada, técnicas de modificação comportamental) (Mancini e Halpern, 2002).

A anfepramona, femproporex, fluoxetina e sibutramina são fármacos conhecidos como anorexígenos. Sua pretensão terapêutica seria atuar sobre o centro de controle do apetite no hipotálamo e diminuir a fome mediante a alteração do controle químico da transmissão do impulso nervoso. Com isso, promover a sensação de saciedade e provocar o estímulo no gasto calórico. Estes medicamentos são indicados como coadjuvantes no tratamento da obesidade exógena em curto prazo, nas dietas de redução de peso baseadas em restrição

calórica, exercício físico e mudança no hábito alimentar (Fuchs et al., 2004).

Os fármacos anorexígenos são amplamente comercializados em todo o mundo. No Brasil há um consumo exagerado de anorexígenos em relação aos demais países. Segundo o relatório anual da International Narcotics Control Board, a população brasileira era a maior consumidora mundial per capita dos anorexígenos anfetamínicos com a finalidade de emagrecimento, 9,1 doses diárias para cada 1.000 habitantes (INCB, 2007). Os motivos para o elevado consumo de anorexígenos refletem não apenas o aumento da prevalência de obesidade e sobrepeso no país nos últimos 40 anos, mas também o uso descontrolado e largamente disseminado de anorexígenos (Noto et al., 2002). Havia cinco medicamentos registrados no Brasil para o tratamento da obesidade: anfepramona (dietilpropiona), femproporex, mazindol, sibutramina e orlistate (ABESO, 2010b).

Recentemente os anorexígenos foram questionados quanto à indicação clínica, reavaliados por estudos sobre eficácia e segurança, onde apresentaram resultados satisfatórios de redução de peso em curto prazo e insuficiente manutenção por longo tempo, além do aparecimento de vários efeitos adversos graves que dificulta seu uso clínico (Mancini e Halpern, 2002; Nadvorny e Wannmacher, 2004; Paumgarten, 2011).

Em nota técnica sobre Eficácia e Segurança dos Medicamentos Inibidores do Apetite, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alegou em 2011 que por serem estimulantes do SNC, os medicamentos tipo anfetamínicos são comumente desviados de seu uso clínico. O consumo elevado no Brasil pode demonstrar que suas indicações clínicas e seu acesso estão muito distantes das preconizadas pela OMS e pelos órgãos sanitários, o que pode indicar um uso irracional. Além disso, relatam no mesmo documento que a ausência de estudos sobre a eficácia e segurança no controle da obesidade, foi um dos grandes problemas regulatórios destes medicamentos no Brasil.

A proibição, determinada pela Diretoria Colegiada da ANVISA em outubro de 2011, entrou em vigor no Brasil em dezembro de 2011, e consta sob a Resolução RDC 52/2011 onde fica instituído que os fármacos femproporex, mazindol e anfepramona não podem mais ser comercializados no Brasil. Seus registros foram cancelados, ficando proibida a produção, o comércio, a manipulação e o uso destes produtos no país. A norma da ANVISA também apresenta novas restrições para medicamentos a base de sibutramina.

A anfepramona, femproporex, fluoxetina e sibutramina são inibidores do apetite que se dividem em três grupos principais de acordo

com as suas formas de ação: (i) atuando sobre o SNC, modificando o apetite ou a conduta alimentar, (ii) sobre o metabolismo, (iii) sobre o sistema gastrointestinal, diminuindo a absorção de gorduras e atuando como estimulante da saciedade (Grahame-Smith e Aronson, 2004).

Todos os fármacos anorexígenos de ação central, exceto o mazindol, são derivados da β -fenetilamina. A estrutura de β -fenetilamínico é também a de neurotransmissores como dopamina (DA), noradrenalina (NA) e adrenalina (monoaminas). Esses neurotransmissores são sintetizados a partir da tirosina em terminações nervosas, armazenado em grânulos e liberado na fenda sináptica para agir em receptores pós-sinápticos. Após agir nesses receptores, as monoaminas podem ser inativadas pela catecol-o-metiltransferase (COMT) ou ser recaptadas pela terminação nervosa (Rossner, 1992). Sendo aminas simpatomiméticas, os efeitos da maioria dos anorexígenos são semelhantes às anfetaminas (AMPH), incluindo estimulação do SNC e elevação da pressão arterial. Muitos desses fármacos possuem um efeito principal sobre o centro de controle do apetite no hipotálamo, onde a redução da ingestão de alimentos ocorre por alteração no controle químico da transmissão do impulso nervoso (Goodman et al., 2006)

Modificações da estrutura química da AMPH α -metil- β -fenetilamina levaram à síntese de uma gama de compostos, com diversas ações e respostas farmacológicas. De um lado situam-se derivados β -fenetilamínicos que influenciam a neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica (podendo agir estimulando a liberação e/ou bloqueando a recaptção), como dietilpropiona e fentermina, que estimulam a liberação de NA da terminação nervosa aumentando a quantidade de NA que interage com receptores pós-sinápticos (Samanin e Garattini, 1993). De outro lado encontram-se as substâncias que atuam na liberação e recaptção de serotonina, como a dexfenfluramina e seu isômero levógiro, a *l*-fenfluramina ou fenfluramina (Garattini, 1995). No meio, situa-se a sibutramina, que bloqueia a recaptção de NA e serotonina (Heal et al., 1992).

Estimulantes, como as AMPH, são pouco recomendados para tratamentos de longo prazo devido aos seus efeitos potenciais aditivos. Essa classe de fármacos apresenta efeitos colaterais importantes sob o ponto de vista cardiovascular e em nível de SNC (USP DI, 2005; Goodman et al., 2006).

1.2.1 Anfetaminas

A AMPH é uma droga sintética psicoestimulante com estrutura química da feniletilamina substituída com um grupo CH_3 no carbono α (Goodman et al., 2006). Dentro da classe de AMPH estão todas as substâncias derivadas da estrutura fenilisopropilamina com múltiplas variações (Utrilla, 2000). A estrutura original de d-AMPH foi sintetizada pela primeira vez em 1887 pelo romeno Lazăr Edeleanu na Alemanha. Nenhum uso farmacológico havia sido descrito, em 1927 o pesquisador Gordon Alles, procurando um descongestionante nasal mais potente que a efedrina, sintetizou novamente a AMPH. Suas propriedades psicoestimulantes foram então descritas por Alles, ele verificou que quando inalada ou administrada por via oral, a AMPH reduzia expressivamente a fadiga, aumentava o alerta e causava sensação de euforia (Rasmussen, 2006).

A AMPH tornou-se disponível como medicamento Benzedrina® um descongestionante nasal, em 1932, nos Estados Unidos, sendo vendida sem necessidade de prescrição médica. Porém, logo foram descritos relatos do uso abusivo devido a suas propriedades estimulantes (Hanson et al., 2004; Rasmussen, 2006). Após várias décadas de uso abusivo, a *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu a venda de Benzedrina® e a partir de 1965 passou a limitar a venda de anfetamínicos.

Vendidos sem restrições, os produtos anfetamínicos eram utilizados para o tratamento de várias doenças como obesidade, alcoolismo, depressão e esquizofrenia (Hanson et al., 2004). Os anorexígenos à base de AMPH citados no catálogo de especialidades farmacêuticas, publicado pelo Conselho Geral das Faculdades de Farmácia, estão presentes em seis especialidades. Em 1977 tais fármacos estavam em 80 especialidades (Cami et al., 1977). Tal comparação fornece uma imagem clara da evolução deste grupo de substâncias, antes consideradas úteis, seguras e com várias aplicações terapêuticas. No entanto, hoje são questionadas quanto aos efeitos adversos que surgem a médio e longo prazo (Utrilla, 2000).

Em geral, todos os derivados de AMPH são bem absorvidos por via oral, distribuindo-se bem por todo organismo, principalmente rim, pulmão e cérebro (Utrilla, 2000). As AMPHs atravessam facilmente a barreira hemato-encefálica para atingir os seus principais sítios de ação no cérebro. A administração aguda de AMPH produz uma vasta gama de alterações comportamentais dose-dependentes, incluindo aumento na excitabilidade ou vigília, anorexia, hiperatividade, e, em especial, um

estado agradável de entusiasmo e euforia, que podem conduzir ao uso abusivo (Berman et al., 2009). Um dos principais efeitos sistêmicos da AMPH é uma súbita elevação da pressão sanguínea (Heye e Hankey, 1996; Logan et al., 1998; Yen et al., 1994).

A AMPH é um dos fármacos simpatomiméticos mais potentes, produzindo os seus efeitos através do aumento dos níveis sinápticos de aminas como a DA, NA e serotonina, através de diversos mecanismos (Madras et al., 2005; Goodman et al., 2006). Seu mecanismo de ação é complexo principalmente devido às semelhanças estruturais com os neurotransmissores e a capacidade de atuar em diferentes áreas do cérebro (Utrilla, 2000). Embora AMPH se ligue a todos os transportadores da monoamina, os seus efeitos estimulantes comportamentais são mediados principalmente através da DA e dependem do transportador de dopamina (DAT) (Boutrel et al., 2004).

A AMPH bloqueia a capacidade de DAT na retirada dos neurotransmissores da fenda sináptica além de facilitar o movimento inverso da DA através da membrana celular (a DA citoplasmática é transportada para o espaço extracelular e participando de sinapses). A AMPH também interfere no armazenamento vesicular de DA, desse modo a DA acumula-se no citoplasma, o que acaba por inibir as enzimas de degradação monoamina oxidase A e B (MAO-A, MAO-B) (Berman et al., 2009). Evidências sugerem que os níveis elevados de DA citoplasmática associados com a interrupção no armazenamento vesicular mediado por AMPH conduz a um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) o que leva ao estresse oxidativo (Tata et al., 2007), que por sua vez contribui para o dano nos terminais nervosos dopaminérgicos.

Em específico, a ação terapêutica anorexígena pode ser consequência de dois mecanismos distintos: i) aumento na liberação de DA nas áreas do hipotálamo lateral, responsável pela regulação da sensação de apetite de forma dose-dependente. Sendo que esta maior concentração de neurotransmissor na fenda sináptica ocorre tanto pelo bloqueio na recaptação quanto por aumento na liberação. Isto porque a d-AMPH pode penetrar no neurônio e deslocar a DA de seus depósitos citoplasmáticos não granulares, com consequente depleção do neurotransmissor (Liang e Rutledge, 1982), ii) inibição na recaptação de serotonina agindo no seu transportador pré-sináptico específico. Além disso, há o mecanismo de aminas simpatomiméticas caracterizada por uma estimulação direta (estimulação dos receptores adrenérgicos) e indireta (liberação aumentada) do sistema nervoso autônomo simpático. Esse mecanismo explicaria os efeitos centrais, como o aumento da

atividade motora, diminuição da fadiga, e os efeitos periféricos tais como taquicardia, sudorese e dificuldade em urinar (Utrilla, 2000).

O desaparecimento do efeito anorexígeno se deve ao desenvolvimento de tolerância, onde é necessário aumentar a dose para alcançar os mesmos efeitos, conseqüentemente aumenta o risco de aparecerem efeitos secundários de natureza estimulante sobre o SNC (Utrilla, 2000). Esta tolerância pode se instalar de forma crônica ou aguda. O mecanismo proposto para a tolerância é a dessensibilização consiste na fosforilação do receptor que induz o desacoplamento entre a proteína G e o receptor propriamente dito (Goodman et al., 2006).

1.2.2 Femproporex

O femproporex foi sintetizado a partir da AMPH, em laboratórios franceses em 1965, no intuito de aumentar o efeito anorexígeno e reduzir o efeito estimulante central (Fogliatto, 1998; Balíková, 2005). O femproporex é quimicamente conhecido como (\pm) N-2-cianoetilanfetamina ou (\pm) 3-[(1-metil-2-fenil)amino]-propionitrila, é um anorexígeno com atuação catecolaminérgica no SNC, e assim como outros fármacos derivados de AMPH possui efeito estimulante no SNC. É amplamente utilizado no tratamento em curto prazo de obesidade moderada a grave desde a década de 70 (Bell et al., 2001; Moffat et al., 2004).

A redução da ingestão de alimentos, promovida pelo femproporex, ocorre por alteração no controle químico da transmissão do impulso nervoso. O efeito do femproporex no SNC é semelhante ao da AMPH, incluindo estimulação do SNC, onde age bloqueando a recaptação de NA e DA, com isso eleva os níveis destes neurotransmissores na fenda sináptica (Coutts et al., 1986; Mattei e Carlini, 1996).

A biotransformação do femproporex é pré-sistêmica e extensa, o efeito de primeira passagem ocorre no fígado e a via de degradação enzimática é pela flora intestinal (Kraemer et al., 2000). O femproporex é biotransformado em 14 metabólitos, sendo a AMPH o principal (Figura 1).

A dose usual de femproporex varia de 20 a 25 mg/dia, sendo preconizada a administração antes da refeição (Bell et al., 2001). A administração de femproporex resulta em uma quantidade considerável de AMPH através da N-dealquilação, em geral cerca de 27 a 56% da dose oral de femproporex (Cody e Valtier, 1996; Musshoff, 2000). Uma pequena quantidade do fármaco é excretada por um período de cerca de

que ocorre espontaneamente pelo metabolismo celular e dano de origem externa, que ocorre através de um agente químico ou por radiação (Rao, 2007).

Há muitas discordâncias em estudos relacionados com a segurança de fármacos anti-obesidade (Engelhardt, 2006). Embora seja recomendado testes específicos de toxicidade por agências reguladoras em todo o mundo, muitos medicamentos anti-obesidade comercializados ainda não foram investigadas quanto à seu possível efeito genotóxico (Snyder e Green, 2001).

Moreira et al. (2007) avaliou os efeitos teratogênicos em fetos de camundongos provenientes de pais que foram expostos ao femproporex (15 mg/kg) durante o desenvolvimento intra-uterino, do 0 ao 19º dia de gestação. O femproporex alterou significativamente o peso dos fetos da 2ª geração, tal achado é uma evidência dos efeitos tóxicos de uma substância recebida durante a gravidez. Um estudo realizado por Buttar e colaboradores (1996) também demonstraram uma redução significativa do peso de fetos expostos à AMPH, durante sua vida intra-uterina e Acuff- Smith e colaboradores (1996) observaram uma redução no peso de ratos quando expostos à m-AMPH no período tardio da gestação. Uma vez que muitos anorexígenos são derivados de AMPH, há uma grande possibilidade de apresentarem os mesmos riscos descritos para outros derivados de AMPH (Colman, 2005).

Alvarenga e colaboradores (2010) avaliaram o potencial genotóxico da cocaína e de metilenedioximetanfetamina (MDMA) através do ensaio de cometa em sangue periférico, cérebro e fígado de camundongos. Uma hora após uma única administração da droga por via intraperitoneal, verificaram dano ao DNA no sangue em todas as doses analisadas (1,25; 2,5 e 5,0 mg/kg), no cérebro houve dano somente nas doses mais altas e no fígado somente na mais alta.

Muitos estudos têm avaliado a eficácia dos fármacos na redução de massa corporal, sem muito interesse nos seus possíveis efeitos adversos. O uso indiscriminado destes fármacos, associado a longos períodos de uso terapêutico, sugerem que o padrão de utilização pode aumentar as taxas de lesões gênicas. Como o aumento no dano genético é comumente correlacionado com a carcinogênese (Fenech, 2000; Krishna e Hayashi, 2000), sendo que fármacos anorexígenos podem elevar o índice de câncer da população exposta. Neste caso a situação se agrava, pois evidências mostram que adultos com sobrepeso ou obesos apresentam maior incidência de câncer do que em indivíduos com um IMC normal (Gunter e Leitzmann 2006; Halford, 2006).

Um dos testes mais utilizados para verificar a potencial genotoxicidade de uma substância é o Ensaio Cometa ou SCGF (*Single Cell Gel Eletrophoresis Assay*) ele é capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (Silva et al., 2003). Esse teste não detecta mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Tais lesões são passíveis da correção e, dessa maneira, esse teste também pode ser utilizado para estudos de reparo no DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (Gontijo e Tice, 2003; Gameiro, 2005).

Esse ensaio vem sendo amplamente utilizado na avaliação de genotoxicidade de novos fármacos, monitoramento ambiental, biomonitoramento humano (Faust et al., 2004; Brendler-Schwaab et al., 2005; Kumaravel e Jha, 2006; Moller, 2006; Burlinson et al., 2007; Güerci et al., 2007) e pesquisas sobre danos e reparação de DNA (Speit e Hartmann, 1999; Hartmann et al., 2003; Collins, 2004; Moller, 2006; Burlinson et al., 2007; Collins, 2007; Gaivão et al., 2007; Güerci et al., 2007).

O aumento de danos genéticos é positivamente correlacionado com a carcinogênese (Fenech, 2000; Krishna e Hayashi, 2006). Sendo assim, sabendo que diversas condições patológicas podem aparecer em decorrência de qualquer tipo de dano ao DNA, e que atualmente há poucas pesquisas avaliando a toxicidade do femproporex, o presente estudo pretende verificar os efeitos da administração aguda e crônica de femproporex em ratos jovens e adultos, para melhor compreender os efeitos do femproporex no organismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de femproporex sobre parâmetros de dano ao DNA em ratos jovens e adultos.

2.2 Específicos

Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de femproporex sobre os parâmetros de índice de dano ao DNA em sangue periférico de ratos jovens e adultos.

Avaliar o efeito da administração aguda e crônica de femproporex sobre os parâmetros de frequência de dano ao DNA em sangue periférico de ratos jovens e adultos.

3 METODOLOGIA

Todos os experimentos foram realizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC – no Laboratório de Bioenergética e Laboratório de Biologia Celular.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996), além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo número 43/2009.

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados 80 ratos machos (n=5) da linhagem Wistar, jovens (30 dias) e adultos (60 dias) obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (claro das 7:00-19:00h) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.2 Diluição do medicamento

O femproporex utilizado nos testes é o mesmo vendido na clínica com o nome de Desobesi[®] da Aché. As cápsulas foram moídas em um gral de porcelana com auxílio de pistilo e diluídas em Tween 2%, em volume proporcional a dose testada, e administrado segundo a premissa de 1mL/kg de peso corporal do animal. O grupo controle recebeu apenas a solução veículo, tween 2%.

3.3 Desenho experimental

O trabalho foi desenvolvido em 4 etapas: (a) administração aguda de femproporex em ratos jovens; (b) administração crônica de femproporex em ratos jovens; (c) administração aguda de femproporex em ratos adultos e (d) administração crônica de femproporex em ratos adultos. Cada etapa foi realizada da seguinte forma: os animais foram divididos em 4 grupos: (1) controle; (2) femproporex 6,25 mg/kg; (3)

femproporex 12,5 mg/kg e (4) femproporex 25 mg/kg. Cada grupo composto por 5 animais. Desta forma utilizamos um *n* mínimo necessário para avaliação de dano em DNA (*n*=5 por grupo) sendo assim, 20 animais para cada etapa, e um total de 80 animais ao fim das 4 etapas concluídas.

3.3.1 Administração aguda de femproporex

Os animais receberam uma única administração de femproporex (6,25; 12,5 ou 25 mg/kg, intraperitoneal) ou tween a 2%. Duas horas após a administração, os ratos foram mortos por decapitação e o sangue periférico coletado.

3.3.2 Administração crônica de femproporex

Os animais receberam uma única administração diária de femproporex (6,25; 12,5 ou 25 mg/kg, intraperitoneal) ou tween a 2% durante 14 dias. Duas horas após a última administração, os ratos foram mortos por decapitação e o sangue periférico coletado.

3.4 Ensaio Cometa

Um protocolo padrão para a preparação e análises do teste cometa foi adotado (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Os esfregaços foram preparados pela mistura de 5µL de sangue (com tampão PBS) com 90µL de agarose LMP (0,75%). A mistura (células/agarose) foi adicionada a uma lâmina revestida com uma camada de 300µL de agarose NMP.

Após a solidificação, as lâminas foram postas em soluções lise (NaCl 2.5M, EDTA 100mM e Tris 10mM, pH 10,0 – 10,5), adicionadas a Triton X-100 1% e sulfóxido dimetil (DMSO) 10%. Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH 12,6) por 20min. O DNA foi submetido à eletroforese 15min 25 V (0.90 V/cm) e 300mA, o tampão foi então neutralizado com Tris 0.4M (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com brometo de etídio e as lâminas serão analisadas em microscópio óptico de fluorescência com aumento de 200 a 400x.

3.5 Análise Estatística

Para as análises dos parâmetros de danos ao DNA, todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística para o índice e a frequência de dano, avaliada pelo ensaio de cometa, foi

realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA), com distribuição anormal; comparações foram realizadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis, com teste de Dunn como post hoc. Considerou-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

A administração aguda de 25 mg/kg de femproporex em ratos jovens revelou aumento nos níveis de ambos os parâmetros analisados em sangue periférico, índice de dano (Figura 2) e frequência de dano ao DNA (Figura 3) ($p < 0,05$).

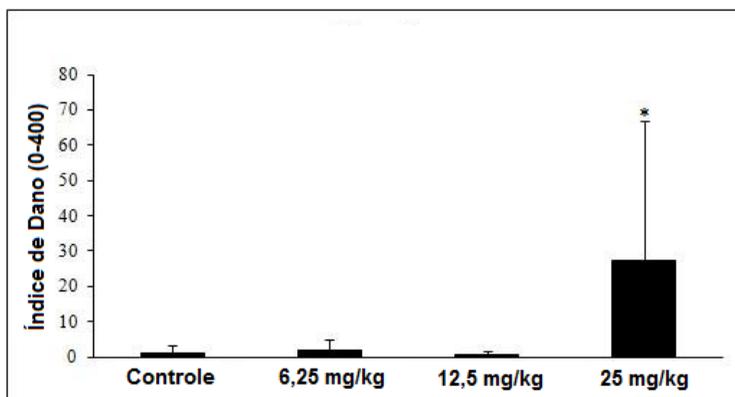


Figura 2. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$). *Diferente do grupo controle $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

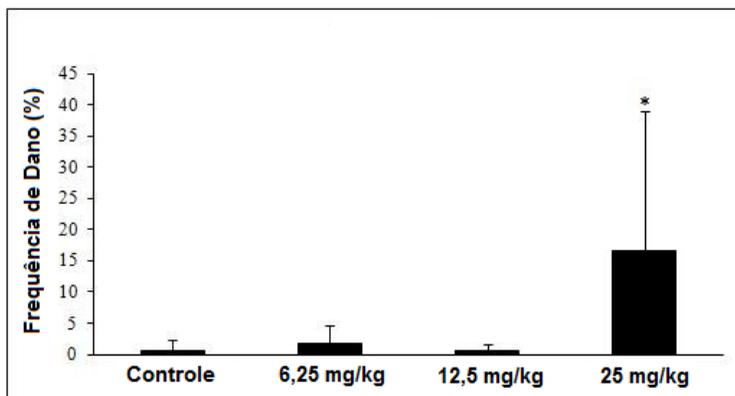


Figura 3. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$). *Diferente do grupo controle $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

A administração aguda de 12,5 mg/kg e 25 mg/kg do femproporex em ratos adultos também apresentou níveis mais elevados de danos no DNA em sangue periférico, em ambos os parâmetros, índice de dano (Figura 4), e frequência de dano (Figura 5) ($p < 0,05$).

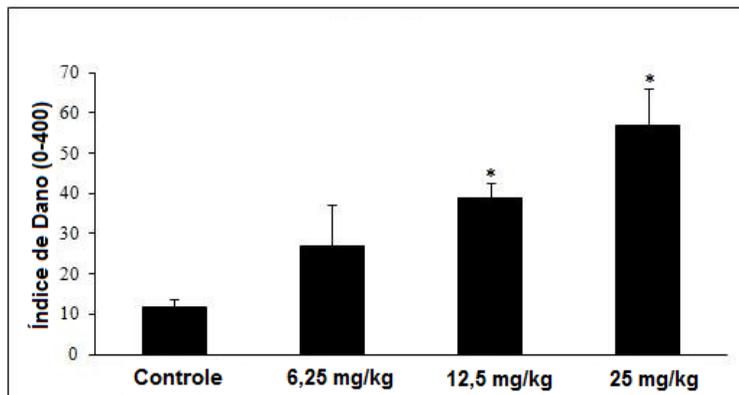


Figura 4. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos adulto sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$). *Diferente do grupo controle $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

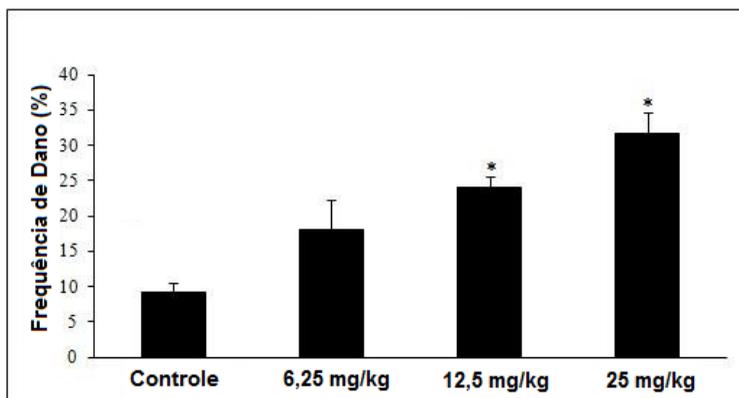


Figura 5. Efeito da administração aguda de femproporex em ratos adulto sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$). *Diferente do grupo controle $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

No entanto, a exposição crônica ao femproporex em ratos jovens (Figuras 6 e 7) parece não alterar de modo significativo no índice de dano e frequência de dano ao DNA em sangue periférico, quando comparado ao grupo controle.

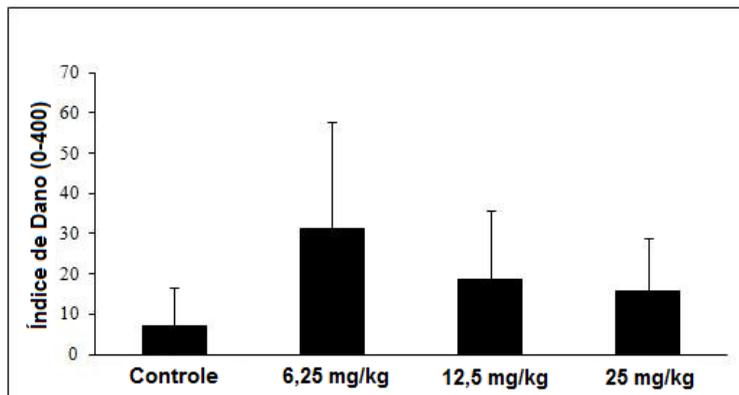


Figura 6. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

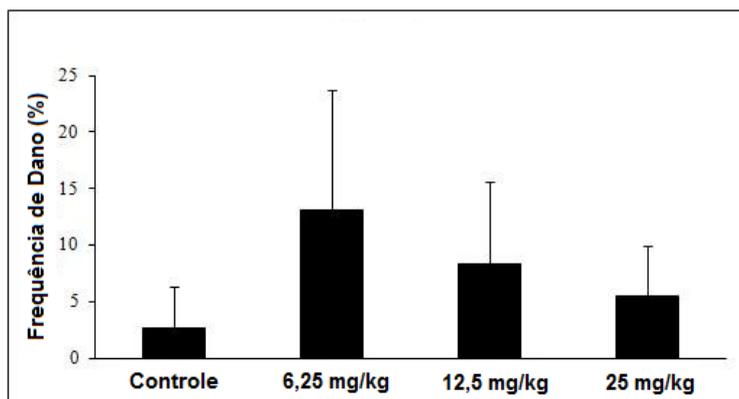


Figura 7. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos jovens sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

O mesmo se observa com ratos adultos quando recebem femproporex em regime crônico (Figuras 8 e 9), não houve alteração significativa no índice de dano e frequência de dano ao DNA em sangue periférico, quando comparado ao grupo controle.

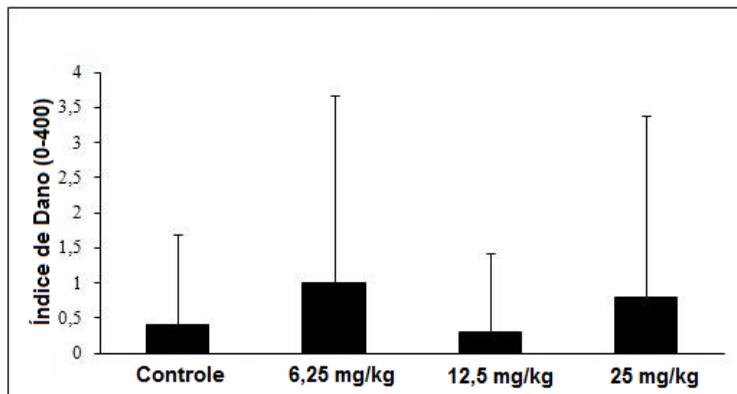


Figura 8. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos adultos sobre o parâmetro de índice de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

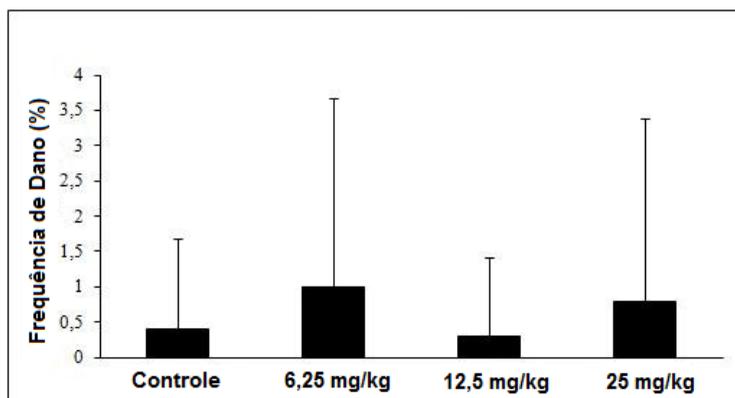


Figura 9. Efeito da administração crônica de femproporex em ratos adultos sobre o parâmetro de frequência de dano ao DNA em sangue periférico. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

5 DISCUSSÃO

O femproporex é um anorexígeno derivado de AMPH utilizado no tratamento da obesidade (Coutts et al., 1986; Mattei e Carlini, 1996), ele é rapidamente convertido *in vivo* em AMPH (Cody, 1999). A AMPH atinge o pico máximo no plasma de 2-4 horas após a administração, o seu efeito dura 6-8 horas, e é excretada na urina 48 horas após a administração. A AMPH tem uma meia-vida de 7-14 horas e a m-AMPH de 4-5 horas (Behar, 2002; Sweetman, 2005).

No presente estudo, verificou-se que a administração aguda de femproporex promoveu um aumento nos parâmetros de dano ao DNA, medido pelo índice de dano e frequência de dano, em ratos jovens e adultos. Por outro lado, não houve alteração nos mesmos parâmetros de dano ao DNA após a administração crônica de femproporex. Os danos no DNA podem incluir modificações químicas e estruturais para bases de purina e pirimidina, 2'-desoxirribose, e a formação de rupturas simples e de cadeia dupla. Quebras na cadeia de DNA podem ocorrer diretamente, devido a danos causados por exposição às ERO, ou indiretamente, devido à clivagem da cadeia do DNA durante a reparação de excisão de bases de DNA (Emerit, 1994; El-Khamisy e Caldecott, 2006). O dano ao DNA produzido por oxidação é avaliado como o mais relevante dano oriundo do metabolismo celular. Estima-se que aproximadamente 2×10^4 lesões oxidativas ao DNA ocorram no genoma humano por dia (Ames e Shigenoga, 1992).

Todos os tecidos são vulneráveis ao estresse oxidativo, porém o SNC é particularmente sensível (Mahadik et al., 2001). Esta situação pode ser desenvolvida por alguns fatores: (1) alta taxa de consumo de oxigênio; (2) elevados níveis de lipídios poliinsaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica; (3) uso extensivo do glutamato como neurotransmissor - o glutamato ao se ligar no seu receptor N-metil D-Aspartato (NMDA) proporciona o influxo de Ca^{2+} que estimula a ativação da óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), levando a produção de óxido nítrico (NO^{\cdot}) (Schulz et al., 1996; 1997); (4) auto-oxidação de alguns neurotransmissores podem levar a formação de ERO (Obata, 2002). Já é bem estabelecido que o metabolismo da DA produz radicais livres sob condições fisiológicas normais. Diferentes rotas metabólicas da DA levam à formação de radical hidroxila. A DA é, sobretudo suscetível à auto-oxidação quando o sistema de defesa antioxidante é ineficiente (Cohen, 1994).

O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significante

dano oriundo do metabolismo celular. Muitas evidências sugerem que danos cumulativos ao DNA causados pelas ERO contribuam para diversas condições clínicas como câncer (Rajeswari et al., 2000; Palyvoda et al., 2003). Dentro da célula, é nas mitocôndrias onde há a maior geração de ERO principalmente nos complexos da cadeia de transporte de elétrons (Mattiasson et al., 2003). Durante a respiração celular sob condições fisiológicas normais, os elétrons podem escapar da cadeia respiratória e reagir com o oxigênio, formando ERO (Brand et al., 2004). Uma mudança no equilíbrio antioxidante/pró-oxidante (estresse oxidativo) pode inibir complexos da cadeia de transporte de elétrons.

Os mecanismos de neurotoxicidade induzida por m-AMPH são mediados por mecanismos múltiplos, incluindo a geração de radicais livres e óxido nítrico, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, e a indução de genes precoces imediatos, bem como os fatores de transcrição (Wilson et al., 1996; Frost e Cadet, 2000; Harvey et al., 2000; Davidson et al., 2001; Guilarte, 2001; Cadet e Krasnova, 2009; Thrash et al., 2009). Estudos demonstram que a administração de d-AMPH e m-AMPH em ratos é capaz de inibir enzimas do metabolismo energético em diversas regiões do cérebro (Valenzuela et al., 1987; Valvassori et al., 2010; Bachmann et al., 2009; Feier et al. 2012). Até mesmo, uma única administração de d-AMPH ou m-AMPH causa estresse oxidativo na amígdala, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos (da-Rosa et al., 2012).

Sugere-se que os danos observados após a administração aguda de femproporex em ratos jovens e adultos sejam de fato devido ao aumento de ERO desencadeadas pelos efeitos da AMPH. Em um estudo anterior, nosso laboratório mostrou um aumento do metabolismo energético cerebral em ratos jovens após administração aguda e crônica de femproporex (Rezin et al., 2011). Sabe-se que uma disfunção na cadeia respiratória mitocondrial conduz a um aumento da geração de radicais livres e que estas ERO inibem a cadeia respiratória mitocondrial (conduzindo a diminuição da produção de ATP e disfunção celular), resultando na geração de mais espécies reativas, formando um fenômeno cíclico (Calabrese et al., 2001; Adam-Vizi, 2005; Navarro e Boveris, 2007).

Um estudo realizado por da Silva e colaboradores (2010) verificou que após 3 e 24 horas da administração de 40 mg/kg de femproporex é possível haver dano no DNA em sangue periférico de camundongos. No tempo de 48 horas há uma redução significativa deste dano, a média se assemelha ao grupo controle. Os autores sugerem que

o dano genotóxico causado pelo femproporex é resultado de sua ação no sistema nervoso simpático. Este efeito provoca alterações no metabolismo oxidativo que rompe o equilíbrio entre a geração de ERO e detoxificação, permitindo que os radicais livres possam interagir com macromoléculas vitais como proteínas e DNA (da Silva et al., 2010).

Outros estudos demonstraram potencial genotóxico em diversas substâncias psicoestimulantes. Andrezza e colaboradores (2008) mostraram que a AMPH aumentou o dano de DNA periférico. Bengel e colaboradores (1998) observou efeito citotóxico de d-fenfluramina sobre o transportador de serotonina, uma vez que causou a fragmentação de DNA e apoptose. Frenzilli e colaboradores (2007) demonstraram que a administração de MDMA, em doses muito baixas pode induzir estresse oxidativo e quebras de cadeia simples e de cadeia dupla no DNA em hipocampo. Outro estudo com MDMA avaliou danos genéticos em vários órgãos. Todas as doses testadas foram capazes de induzir dano ao DNA das células do sangue, bem como relevantes danos genotóxicos nas células do fígado e do cérebro de camundongos (Alvarenga et al., 2010).

Muito dos efeitos comportamentais atribuídos às AMPHs observados em seres humanos podem ser demonstrado em animais de laboratório. Estes incluem a excitação, hiperatividade, movimentos estereotipados, depressão psicomotora, déficit cognitivo, comportamentos tipo alucinógenos, e auto-administração crônica. As evidências indicam que os efeitos da AMPH sobre os neurotransmissores DA e NA desempenham papéis críticos na indução destes efeitos. Após a exposição crônica a AMPHs, animais exibem ou tolerância (uma resposta atenuada) ou sensibilização (uma resposta aumentada) durante a administração posterior de drogas, indicando adaptações nos substratos neurobiológicos destes comportamentos (Berman et al., 2009).

Sabe-se que a estimulação excessiva dos receptores de DA durante exposição à psicoestimulantes induz diversas mudanças moleculares adaptativas na via dopaminérgica mesolímbica (White e Kaliva, 1998; Nestler, 2005). Tal fato poderia estar relacionado com os resultados encontrados, onde verificamos que após a administração crônica os ratos jovens e adultos não apresentam mais danos no DNA, sugerindo um mecanismo de adaptação a uma possível dessensibilização dos efeitos do femproporex após o uso contínuo. Além da adaptação neurobiológica sugere-se ativação de um sistema eficiente de reparo, visto que a modulação da expressão gênica ocorre em longo prazo. Moreira e colaboradores (2005) em um estudo administraram uma dose

diária de 15 mg/kg de femproporex em ratos, e concluíram que o fármaco nesta concentração, apresenta potencial teratogênico baixo. Os dados do presente trabalho indicam que na administração aguda de femproporex na dose de 12,5 mg/kg em ratos adultos (menor que a dose utilizada por Moreira e colaboradores, 2005) induziu um aumento significativo no dano e que se segue de modo dose-dependente na dose de 25 mg/kg. Da Silva e colaboradores (2010) também verificaram que 48 horas após a administração de 40 mg/kg de femproporex há uma redução significativa no dano ocorrido, quando comparados com os tempos de 3 horas e 24 horas. Estes achados levam a crer que os efeitos genotóxicos do femproporex ocorrem nas primeiras horas de exposição. Após esse período, provavelmente ocorre uma neuromodulação com ativação dos sistemas de reparo ao DNA.

Dados da literatura sugerem que o sistema dopaminérgico mesencefálico, que inclui corpos celulares na substância nigra e na área tegmental ventral e em grande parte no estriado dorsal, o núcleo accumbens e córtex pré-frontal, é um componente fundamental do circuito neural que sustenta a sensibilização tanto comportamental e como a dependência (Robinson e Berridge, 2000). Os estudos de Romanova e colaboradores (2012) demonstram que a sensibilização comportamental frente a AMPH está associada com adaptações químicas complexas no circuito de recompensa do cérebro em vias que regulam a energia/metabolismo, neurotransmissão, apoptose, neuroproteção e neuritogênese, bem como a integridade do citoesqueleto e da morfologia neuronal.

Os efeitos de AMPH/femproporex no SNC são amplamente estudados, tais efeitos desencadeiam respostas sistêmicas que afetam todo organismo. O principal efeito periférico dos derivados de AMPH é aumento da pressão arterial, sabe-se que tal sintoma está intimamente ligado ao estresse oxidativo. Isto se deve porque o estresse oxidativo desencadeia efeitos na função celular e tecidual, levando à disfunção endotelial, aumento da contratilidade, crescimento do músculo liso vascular, apoptose, migração de monócitos, peroxidação lipídica e inflamação (Uemura et al., 2001; Kadoglou et al., 2005). Também foi demonstrado que a hipertensão está associada com a diminuição da capacidade antioxidante e liberação aumentada de ERO (Prabha et al., 1990; Russo et al., 1998). Além disso, o dano ao DNA causado por ERO ocorre mais comumente em pacientes hipertensos do que em normotensos (Lee et al., 2005). Sabe-se que lesões no DNA ocorrem frequentemente em células expostas a estresse oxidativo (Halliwell e Aruoma, 1991). Não só o tecido epitelial é lesionado, as células

sanguíneas são diretamente afetadas, é o que mostra o estudo de Yildiz e colaboradores (2008), pacientes com hipertensão sustentada apresentam aumento de danos ao DNA acompanhado por uma diminuição considerável nos níveis de antioxidantes totais em linfócitos. Uzun e colaboradores (2004) demonstraram um aumento no índice de marcadores de estresse oxidativo no grupo de "síndrome da hipertensão do jaleco branco". Além disso, Yildiz e colaboradores (2008) demonstraram que há diminuição no nível médio de antioxidantes totais em pacientes com tal síndrome. No entanto, ainda não é claro se o aumento do estresse oxidativo ocorre antes ou após o desenvolvimento de "síndrome da hipertensão do jaleco branco".

Os resultados mostraram que a administração aguda de femproporex promoveu danos ao DNA em sangue periférico de ratos jovens e adultos. Os dados encontrados são consistentes com outros estudos da literatura que mostraram que alguns medicamentos derivados de AMPH são capazes de causar danos ao DNA. Sugere-se como principal efector de dano ao DNA as ERO, visto que diversas pesquisas tem relacionado a AMPH ao aumento de ERO. Além disso, os sintomas periféricos, como o aumento da pressão arterial, podem potencializar o dano ao DNA em células sanguíneas. Quando administrado de forma contínua, o femproporex parece não causar tais danos. Sugere-se que tenha ocorrido um mecanismo adaptativo em resposta a dessensibilização dopaminérgica, outra hipótese seria a ativação de um mecanismo eficiente de reparo do DNA que atua após a exposição crônica ao femproporex.

Conclusões

O aumento no índice e frequência de dano ao DNA em ratos jovens e adultos indicam que o femproporex apresenta potencial genotóxico em sangue periférico após exposição aguda. Os danos são reparados após a exposição crônica ao femproporex. Mais estudos são necessários a fim de investigar os mecanismos envolvidos na exposição crônica ao femproporex.

Perspectivas

A fim de melhor compreender os mecanismos decorrentes do dano observado, é interessante investigar os efeitos do femproporex em cérebro de ratos jovens e adultos após administração aguda e crônica do fármaco, além de verificar marcadores de estresse oxidativo através de

parâmetros de dano oxidativo e sistema antioxidante em ratos submetidos ao mesmo protocolo experimental.

REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileira de Obesidade. 2010a.
- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Atualização das Diretrizes para o Tratamento Farmacológico da Obesidade e do Sobrepeso. 2010b.
- Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(9-10):1140-9.
- Alcantara LMA, Planeta CS, Delucia R. Envolvimento do sistema dopaminérgico na sensibilização comportamental ao femporex. *Ver Ciênc Farm*. 2002; 23:59-70.
- Alvarenga TA, Andersen ML, Ribeiro DA, Araujo P, Hirotsu C, Costa JL, Battisti MC, Tufik S. Single exposure to cocaine or ecstasy induces DNA damage in brain and other organs of mice. *Addict Biol*. 2010; 15(1):96-9.
- Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N Y Acad Sci*. 1992; 663:85-96.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Stertz L, Zanotto C, Ribeiro L, Giasson K, Valvassori SS, Réus GZ, Salvador M, Quevedo J, Gonçalves CA, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2008; 33(6):516-24.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica sobre eficácia e segurança dos medicamentos inibidores de apetite. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c53fdd0045d07478be65bfe99fa014e7/Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+efic%C3%1cia+e+seguran%C3%A7a+dos+medicamentos+inibidores+do+apetite+Final.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: nov/2012.
- Ávila AL. Obesidade. In: Isosaki M, Cardoso E. Manual de Dietoterapia e Avaliação Nutricional do Serviço de Nutrição e Dietética do Instituto do Coração. São Paulo: Atheneu, 2004.
- Bachmann RF, Wang Y, Yuan P, Zhou R, Li X, Alesci S, Du J, Manji HK. Common effects of lithium and valproate on mitochondrial functions: protection against methamphetamine-induced mitochondrial damage. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009; 12(6):805-22.

- Bahia L, Coutinho ES, Barufaldi LA, Abreu Gde A, Malhão TA, de Souza CP, Araujo DV. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2012; 12:440.
- Balíková M. Nonfatal and fatal DOB (2,5-dimethoxy-4-bromomphetamine) overdose. *Forensic Sci Int*. 2005; 153(1):85-91.
- Beckett AH, Shenoy EV, Salmon JA. The influence of replacement of the N-ethyl group by the cyanoethyl group on the absorption, distribution and metabolism of (plus or minus)-ethylamphetamine in man. *J Pharm Pharmacol*. 1972; 24(3):194-202.
- Behar AR. Anorexígenos: indicaciones e interacciones. *Rev Chil de Neuro- psiquiatría*. 2002; 40(2):21-36.
- Bell RR, Crookham SB, Dunn WA, Grates KM, Reiber TM. A contemporaneous finding of fenproporex in a polydrug suicide. *J Anal Toxicol*. 2001; 25(7):652-6.
- Bengel D, Isaacs KR, Heils A, Lesch KP, Murphy DL. The appetite suppressant d-fenfluramine induces apoptosis in human serotonergic cells. *Neuroreport*. 1998; 9(13):2989-93.
- Berman SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. Potential Adverse Effects of Amphetamine Treatment on Brain and Behavior: A Review. *Mol Psychiatry*. 2009; 14(2):123-42.
- Boutrel B, Koob GF. What keeps us awake: the neuropharmacology of stimulants and wakefulnesspromoting medications. *Sleep*. 2004; 27(6):1181-94.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biol Med*. 2004; 37(6):755-67.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2005; 20:245-54.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res*. 2007; 627:31-35.
- Buttar HS, Moffatt JH, Foster BC. Developmental toxicity of 4-substituted amphetamines in mice. *Reprod Toxicol*. 1996; 10(4):301-10.

- Cadet JL, Krasnova IN. Molecular bases of methamphetamine-induced neurodegeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 88:101-19.
- Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida Stella AM, Bates TE, Clark JB. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res.* 2001; 6(6):739-64.
- Camí J, Laporte J, Gutierrez R, Laporte JR. Estudio de los preparados que contienen anfetaminas existentes en el mercado farmacéutico nacional. *Med Clin (Barc).* 1977; 68:57-62.
- Clausen-Schaumann H, Rief M, Tolksdorf C, Gaub H. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophys.* 2000; 78(4):1997-2007.
- Cody JT, Valtier S, Stillman S. Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. *J Anal Toxicol.* 1999; 23(3):187-94.
- Cody JT, Valtier S. Detection of amphetamine following administration of fenproporex. *J Anal Toxicol.* 1996; 20(6):425-31.
- Cohen PA. Imported fenproporex-based diet pills from Brazil: a report of two cases. *J Gen Intern Med.* 2009; 24(3):430-3.
- Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res.* 2007; 681(1):24-32.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26:249-61.
- Colman E. Anorectics on trial: a half century of federal regulation of prescription appetite suppressants. *Ann Intern Med.* 2005; 143:380-5.
- Comiran E, Souza DZ, Boehl PO, CássiaMariottiKd, Pechansky F, Duarte Pdo C, De Boni RB, Fröhlich PE, Limberger RP. Fenproporex and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid after controlled oral administration of fenproporex. *Ther Drug Monit.* 2012; 34(5):545-53.
- Coutts RT, Nazarali AJ, Baker GB, Pasutto FM. Metabolism and disposition of N-(2-cyanoethyl)-amphetamine (fenproporex) and amphetamine: study in the rat brain. *Can J Physiol Pharmacol.* 1986; 64(6):724-8.
- da Silva CJ, dos Santos JE, Satie Takahashi C. An evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of the anti-obesity drugs sibutramine and fenproporex. *Hum Exp Toxicol.* 2010; 29(3):187-97.

- da-Rosa DD, Valvassori SS, Steckert AV, Arent CO, Ferreira CL, Lopes-Borges J, Varela RB, Mariot E, Dal-Pizzol F, Andersen ML, Quevedo J. Differences between dextroamphetamine and methamphetamine: behavioral changes and oxidative damage in brain of Wistar rats. *J Neural Transm.* 2012; 119(1):31-8.
- Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH. Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001; 36:1-22.
- Duarte ACG, Faillace GBD, Wadi MT, Pinheiro RL. Síndrome Metabólica – Semiologia, Bioquímica e Prescrição Nutricional. 1ª Ed. São Paulo: Axcel Books do Brasil Editora Ltda, 2005.
- El-Khamisy SF, Caldecott KW. TDP1-dependent DNA singlestrand break repair and neurodegeneration. *Mutagenesis.* 2006; 21(4):219-24.
- Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1994; 16(1):99-109.
- Engelhardt G. In vivo micronucleus test in mice with 1-phenylethanol. *Arch Toxicol.* 2006; 80:868-72.
- Epel ES, McEwen B, Seeman T, Matthews K, Castellazzo G, Brownell KD, Bell J, Ickovics JR. Stress and body shape: stress-induced cortisol secretion is consistently greater among women with central fat. *Psychosom Med.* 2000; 62(5):623-32.
- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004; 566:209-29.
- Feier G, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Varela RB, Bavaresco DV, Scaini G, Morais MO, Andersen ML, Streck EL, Quevedo J. Behavioral changes and brain energy metabolism dysfunction in rats treated with methamphetamine or dextroamphetamine. *Neurosci Lett.* 2012; 530(1):75-9.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000; 455(1-2):81-95.
- Fogliatto MR. Ecstasy-aspectos gerais da MDMA e outras anfetaminas de anel substituído. *Revista do IGP, Porto Alegre;* 1998.

- Frenzilli G, Ferrucci M, Giorgi FS, Blandini F, Nigro M, Ruggieri S, Murri L, Paparelli A, Fornai F. DNA fragmentation and oxidative stress in the hippocampal formation: a bridge between 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) intake and long-lasting behavioral alterations. *Behav Pharmacol.* 2007; 18(5-6):471-81.
- Frost DO, Cadet JL. Effects of methamphetamine-induced neurotoxicity on the development of neural circuits: a hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 34:103-18.
- Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MBC. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional.* 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- Gaivão I, Piasek A, Brevik A, Shapohnikov S, Collins AR. Comet assay-based methods for measuring DNA repair *in vitro*; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 25(1):45-52.
- Gameiro PH. Efeito antimutagênico do extrato aquoso de *agaricus brasilienses* em cultura de linfócitos humanos [Trabalho de Conclusão de Curso]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, 2005.
- Garattini S. Biological actions of drugs affecting serotonin and eating. *Obes Res.* 1995; 3:463-70.
- García O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y, Piloto J, Gonzalez JE, Alvarez A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res.* 2004; 556(1-2):25-34.
- Gaytan O, al-Rahim S, Swann A, Dafny N. Sensitization to locomotor effects of methylphenidate in the rat. *Life Sci.* 1997; 61(8):101-7.
- Glazer G. Long-term pharmacotherapy of obesity 2000: a review of efficacy and safety. *Arch Intern Med.* 2001; 161(15):1814-24.
- Gontijo AMMC, Tice R. Teste de Cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR; Salvadori DMF; Marques EK. *Mutagênese Ambiental.* Canoas, RS: Ulbra. 2003; 247-71.
- Goodman LS, Gilman AB, Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 11^a ed. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2006.
- Grahame-Smith DG, Aronson JK. *Tratado de Farmacologia Clínica Farmacoterapia.* 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

- Güerci A, Liviac D, Marcos R. Detection of excision repaired DNA damage in comet assay by using Ara-C and hydroxyurea in three different cell types. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 25(1):73-80.
- Guilá MVM. Obesidad: interrelación genética ambiental. *Rev Méd Clín Condes.* 2003; 14(3):119-24.
- Guilarte TR. Is methamphetamine abuse a risk factor in parkinsonism? *Neurotoxicology.* 2001; 22:725-31.
- Gunter MJ, Leitzmann MF. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(3):145-56.
- Halford JCG. Pharmacotherapy for obesity. *Appetite.* 2006; 46: 6-10.
- Hanson GR, Rau KS, Fleckenstein AE. The methamphetamine experience: a NIDA partnership. *Neuropharmacology.* 2004; 47:92-100.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V and Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay: 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis.* 2003; 18:45-51.
- Harvey DC, Lacan G, Tanious SP, Melega WP. Recovery from methamphetamine induced long-term nigrostriatal dopaminergic deficits without substantia nigra cell loss. *Brain Res.* 2000; 871:259-70.
- Heal DJ, Frankland AT, Gosden J, Hutchins LJ, Prow MR, Luscombe GP, Buckett WR. A comparison of the effects of sibutramine hydrochloride, bupropion and methamphetamine on dopaminergic function: evidence that dopamine is not a pharmacological target for sibutramine. *Psychopharmacology (Berl).* 1992; 107(2-3):303-9.
- Hernán-Daza CH. La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud. *Colomb Med.* 2002; 33(1):72-80.
- Heye N, Hankey GJ. Amphetamine-associated stroke. *Cerebrovasc Dis.* 1996; 6:149-55.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), 2008-2009. 2010.
- INCB. International Narcotics Control Board (US). Report of the International Narcotics Control Board for 2007. Disponível em: <<http://www.incb.org/pdf/annualreport/2007/en/annual-report-2007.pdf>>. Acessado em: abr/2012.

- Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiol.* 2005; 56:173-89.
- Kankaanpää A, Meririnne E, Lillsunde P, Seppälä T. The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rats nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 59(4):1003-9.
- Kraemer T, Theis GA, Weber AA. Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic fenproporex in human urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000; 738(1):107-18.
- Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000; 455(1-2):155-66.
- Kumaravel TS, Jha AN. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. *Mutat Res.* 2006; 605:7-16.
- Lee J, Lee M, Kim JU, Song KI, Choi YS, Cheong SS. Carvedilol reduces plasma 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in mild to moderate hypertension: a pilot study. *Hypertension.* 2005; 45:986-90.
- Lewin B. *Genes VII*, 7^a ed. Inglaterra: Oxford University Press; 1999.
- Lian, NY, Rutledge CO. Comparison of the release of (H3) dopamine from isolated striatum by amphetamine, fenfluramine and unlabelled dopamine. *Biochem Pharmacol.* 1982; 31(6):983-92.
- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature.* 2000; 404(6778):613-7.
- Luz P. Resultados terapêuticos do femproporex no obeso ambulatorial. *A Folha Médica.* 1974; 68:351-4.
- Madras BK, Miller GM, Fischman AJ. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2005; 57(11):1397-409.
- Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001; 25(3):463-93.
- Mancini MC, Halpern A. Pharmacological treatment of obesity. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online].* 2006; 50(2):377-89.

- Mancini MC, Halpern A. Tratamento farmacológico da obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(5):497-512.
- Mattei R, Carlini EA. A comparative study of the anorectic and behavioral effects of fenproporex on male and female rats. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29(8):1025-30.
- Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Wieloch T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nature.* 2003; 9:1062-8.
- Meririnne E, Kankaanpaa A, Seppala T. Rewarding properties of methylphenidate: sensitization by prior exposure to the drug and effects of dopamine D1- and D2-receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298(2):539-50.
- Marques-Lopes I, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez A. Aspectos genéticos da obesidade. *Rev Nutr.* 2004; 17(3):327-38.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, eds. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.* 3^a ed. London, United Kingdom: Pharmaceutical Press; 2004.
- Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006; 98:336-45.
- Moreira CCL, Faria MJSS, Moreira CQ. Avaliação da toxicidade e da teratogenicidade do femproporex em fetos de camundongos provenientes de pais expostos à droga durante a vida intra-uterina. *Semina: Ciên Biol Saúde.* 2007; 28(2):73-80.
- Moreira CQ, Faria MJ, Moreira EG. Behavioral neurotoxicity in adolescent and adult mice exposed to fenproporex during pregnancy. *Hum Exp Toxicol.* 2005; 24(8):403-8.
- Moreira RS, Gadani JA. The prevalence of use of amphetamines by truckers passing through Dourados-MS city. *Interbio.* 2009; 3:27-34.
- Nadvorny S, Wannmacher L. Fármacos em obesidade. In: *Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional*, 3^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Nascimento EC, Nascimento E, Silva JP. Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada. *Rev Saude Publica.* 2007; 41:290-93.
- Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(2):670-86.

- Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci.* 2005; 8(11):1445-9.
- Noto AR, Carlini EA, Mastroianni PC, Alves VC, Galduróz JCF, Kuroiwa W, Csizmar J, Costa A, Faria MA, Hidalgo SR, Assis D, Nappo SA. Analysis of prescription and dispensation of psychotropic medications in two cities in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Psiquiatr.* 2002; 24:68-73.
- Obata T. Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. *J Neural Transm.* 2002; 109(9):1159-80.
- Oga S. *Fundamentos de Toxicologia.* 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 2003.
- Palyvoda O, Polanska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50(1):181-90.
- Paumgarten FJR. Tratamento farmacológico da obesidade: a perspectiva da saúde pública. *Cad Saúde Pública.* 2001; 27(3):404.
- Planeta CS, Delucia R. Involvement of dopamine receptors in diethylpropioninduced conditioning place preference. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(4):561-4.
- Polednak AP. Estimating the number of U.S. incident cancers attributable to obesity and the impact on temporal trends in incidence rates for obesity-related cancers. *Cancer Detect Prev.* 2008; 32(3):190-9.
- Porras G, Di Matteo V, Fracasso C, Lucas G, DE Deurwaerdère P, Caccia S, Esposito E, Spampinato U. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C/2B} receptor subtypes modulate dopamine release induced in vivo by amphetamine and morphine in both the rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropsychopharmacology.* 2002; 26(3):311-24.
- Prabha PS, Das UN, Koratkar R, Sagar PS, Ramesh G. Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1990; 41(1):27-33.
- Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao KV, Khar A. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis.* 2000; 21(4):557-61.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia.* 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
- Rao KS. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3(3):162-72.

- Rasmussen N. Making the First Anti-Depressant: Amphetamine in American Medicine. *J Hist Med Allied Sci.* 2006; 61(3):288-323.
- Rezin GT, Jeremias IC, Ferreira GK, Cardoso MR, Morais MO, Gomes LM, Martinello OB, Valvassori SS, Quevedo J, Streck EL. Brain energy metabolism is activated after acute and chronic administration of fenproporex in young rats. *Int J Dev Neurosci.* 2011; 29(8):937-42.
- Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction.* 2000; 95:91-117.
- Rossner S. Factors determining the long-term outcome of obesity treatment. In: Björntorp P, Brodoff BN, editors. *Obesity.* New York: J.B. Lippincott Co; 1992.
- Romanova EV, Lee JE, Kelleher NL, Sweedler JV, Gulley JM. Comparative peptidomics analysis of neural adaptations in rats repeatedly exposed to amphetamine. *J Neurochem.* 2012; 123(2):276-87.
- Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, Corrocher R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 1998; 16(9):1267-71.
- Samanin R, Garattini S. Neurochemical mechanism of action of anorectic drugs. *Pharmacol Toxicol.* 1993; 73(2):63-8.
- Schulz JB, Henshaw DR, MacGarvey U, Beal MF. Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem Int.* 1996; 29(2):167-171.
- Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF. The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174(1-2):193-7.
- Shuster L, Hudson J, Anton M, Righi D. Sensitization of mice to methylphenidate. *Psychopharmacology (Berl).* 1982; 77(1):31-6.
- Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética Toxicológica.* Porto Alegre: Alcance; 2003.
- Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175:184-91.
- Smith, K. D. A.; Schilling, M. A.; Fisher, J. E.; Vorhees, C. V. Stage-specific effects of prenatal dmethamphetamine exposure on behavioral and eye development in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1996; 18(2):199-215.

- Snyder RD, Green JW. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat Res.* 2001; 488(2):151-69.
- Sosa RAB. ¿Cuál es el papel actual del tratamiento farmacológico de la obesidad en personas adultas? *Rev Endocrinol Nutr.* 2004; 12(Suppl 3):130-35.
- Souza DZ, Boehl PO, Comiran E, Prusch DS, Zancanaro I, Fuentefria AM, Pechansky F, Duarte PC, De Boni RB, Fröhlich PE, Limberger RP. Which amphetamine-type stimulants can be detected by oral fluid immunoassays? *Ther Drug Monit.* 2012; 34(1):98-109.
- Souza JC, Paiva T, Reimão R. Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005; 63(4):925-30.
- Speit G, Hartmann A. The comet assay (single cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Method Mol Biol.* 1999; 13:203-12.
- Sweetman SC. *Martindale: the complete drug reference.* 34^a ed. London: Pharmaceutical Press; 2005.
- Tata DA, Yamamoto BK. Interactions between methamphetamine and environmental stress: role of oxidative stress, glutamate and mitochondrial dysfunction. *Addiction.* 2007; 102(Suppl1):49-60.
- Thrash B, Thiruchelvan K, Ahuja M, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M. Methamphetamine-induced neurotoxicity: the road to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.* 2009; 61:966-77.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-21.
- Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res.* 2001; 88:1291-8.
- USP-DI. *Drug Information for the Health Care Professional.* 25^a ed. Greenwood Village: Thomson Micromedex; 2005.
- Utrilla P. Aspectos farmacológicos de las anfetaminas. *Ars Pharmaceutica.* 2000; 41(1):67-77.
- Uzun H, Karter Y, Aydin S, Curgunlu A, Simsek G, Yucel R, Vehiyd S, Ertürk N, Kutlu A, Benian A, Yaldiran A, Oztürk E, Erdine S. Oxidative stress in white coat hypertension; role of paraoxonase. *J Hum Hypertens.* 2004; 18(7):523-8.

- Valenzuela A, Pla A, Villanueva E. Effects of chronic administration of dextroamphetamine on enzymes of energy metabolism in regions of the rat brain, *Neuropharmacology*. 1987; 26(6):627-31.
- Valvassori SS, Rezin GT, Ferreira CL, Moretti M, Gonçalves CL, Cardoso MR, Streck EL, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. *J Psychiatr Res*. 2010; 44(14):903-9.
- Velloso LA. The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50(2):165-76.
- Vigitel. *Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- Wanmacher L. *Obesidade: evidências e fantasias. Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados [Periódico on-line]* 2004; 1(3):1-6. Disponível em URL: http://www.opas.org.br/medicamentos/temas_documentos_detalle.cfm?id=46&iddoc=266 [14 jul 2008].
- Wendler EA, Busato CR, Miyoshi E. Uso de anfetaminas por motoristas de caminhão para reduzir o sono. *Publ UEPG Ci Biol Saude (Ponta Grossa)*. 2003; 9:7-14.
- White FJ, Kalivas PW. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend*. 1998; 51(1-2):141-53.
- WHO. World Health Organization. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation*. G. World Health Organ Tech Rep Ser. Geneva: 2000; 894:1-253.
- WHO. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acessado em: nov/2012.
- WHO. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2012. (Fact sheet, n.311).Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em: nov/2012.
- Wilson JM, Kalasinsky KS, Levey AI, Bergeron C, Reiber G, Anthony RM, Schmunk GA, Shannak K, Haycock JW, Kish SJ. Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. *Nat Med*. 1996; 2:699-703.

- Yen DJ, Wang SJ, Ju TH, Chen CC, Liao KK, Fuh JL, Hu HH. Stroke associated with methamphetamine inhalation. *Eur J Neurol.* 1994; 34(1):16-22.
- Yildiz A, Gür M, Yılmaz R, Demirbağ R, Celik H, Aslan M, Koçyiğit A. Lymphocyte DNA damage and total antioxidant status in patients with white-coat hypertension and sustained hypertension. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2008; 36(4):231-38.