

---

---

# **Cardiotoxicidade e Hepatotoxicidade da “*Ecstasy*” e “*Flatliner*”**

**- Efeitos na Bioenergética e Permeabilidade Transitória Mitocondrial -**

---

---

Dália Isabel Reis Gonçalves

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias do Medicamento na área de Bioquímica

**VII Curso de Mestrado em Tecnologias do Medicamento**

**Universidade de Coimbra**

**Faculdade de Farmácia**

**2005**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra sob orientação do Professor Doutor José B.A. Custódio.

## Agradecimentos

“Porque a vida não se vive sózinha” e consciente de que sózinha teria sido impossível levar esta tarefa a bom porto, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que me apoiaram, tornando possível a realização de mais uma etapa deste meu percurso.

Agradeço, especialmente, ao meu orientador Professor Doutor José Custódio, pela oportunidade da realização deste trabalho, por toda a orientação científica e empenho, pela disponibilidade dos meios necessários à realização, pela opinião e revisão crítica.

À Professora Doutora Leonor Almeida, pela oportunidade de integração no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ainda pelas suas frequentes manifestações de interesse neste trabalho.

À Fundação para a ciência e Tecnologia pela bolsa de iniciação à Investigação (POCTI/36075/FCB/2000) indispensável à realização da parte experimental deste trabalho.

Aos elementos da “Irmandade da Bioquímica” gostaria de agradecer o apoio, a ajuda laboratorial, a amizade, o companheirismo e a boa disposição que sempre demonstraram, proporcionando no dia-a-dia um bom ambiente de trabalho. Um especial obrigado à Carla Cardoso pelo seu apoio e optimismo.

A todos os meus amigos agradeço a palavra de incentivo no momento certo mas também os conselhos oportunos e partilha de todas as coisas boas e menos boas. Agradeço, especialmente, às minhas companheiras de casa pela imensa paciência e boa disposição.

Agradeço ainda, a todos aqueles que de alguma forma deram a sua contribuição para a realização deste trabalho mesmo que sem o saberem...

E por fim, aos únicos e sempre presentes: aos meus pais, ao meu irmão, ao Natal e restante família, agradeço o apoio incansável, a imensa compreensão e paciência com que sempre pude contar em todos os momentos. Um muito, muito obrigada!

---

## ÍNDICE

---

---

---

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>1</b>
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>1- A Mitocôndria, estrutura e funções</b> .....	<b>7</b>
1.1- Ultra estrutura e fisiologia .....	7
1.2- Funções metabólicas das mitocôndrias.....	8
1.3- O sistema de transporte de electrões e a fosforilação oxidativa.....	9
1.4- Importância da mitocôndria na homeostase do Ca <sup>2+</sup> celular.....	11
1.5- Permeabilidade transitória mitocondrial.....	13
1.6- Envolvimento do stresse oxidativo na indução da permeabilidade transitória mitocondrial.....	16
1.7- Mecanismos mitocondriais de morte celular.....	17
1.7.1- A mitocôndria e a necrose .....	18
1.7.2- A mitocôndria e a apoptose.....	19
1.8- Proteínas dissociadoras.....	21
1.9- As mitocôndrias como um alvo de toxicidade.....	23
<b>2- Derivados Anfetamínicos como drogas de abuso</b> .....	<b>25</b>
2.1- Pastilhas de <i>ecstasy</i> .....	25
2.2- História e química da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA).....	26
2.3- A 4-metiltioanfetamina ( <i>Flatliner</i> -MTA) como um contaminante <i>da ecstasy</i> .....	27
2.4- Farmacocinética da MDMA e da MTA.....	28
2.5- Farmacodinâmica da MDMA e da MTA.....	31
2.6- Toxicidade da MDMA e MTA.....	32
2.6.1- Efeitos físicos, psicológicos e adversos da MDMA e da MTA.....	32
2.6.2- Hepatotoxicidade .....	33
2.6.3- Cardiotoxicidade.....	34
2.6.4- Hipertermia .....	35
<b>3- Objectivo e plano geral da tese</b> .....	<b>36</b>

---

---

<b>II – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
<b>1- Reagentes</b> .....	39
<b>2- Preparação das suspensões mitocondriais</b> .....	39
2.1- Isolamento das mitocôndrias de coração .....	39
2.2- Isolamento das mitocôndrias de fígado .....	40
2.3- Determinação da concentração de proteína.....	43
<b>3- Avaliação dos efeitos da MDMA e da MTA na bioenergética mitocondrial</b> .....	43
3.1- Determinação do consumo de oxigénio associado à fosforilação de ADP.....	43
3.2- Determinação do consumo de oxigénio na presença de ADP saturante e na presença de FCCP.....	44
3.3- Avaliação do potencial eléctrico transmembranar das mitocôndrias ( $\Delta\Psi$ ).....	45
3.4- Determinação em simultâneo do $\Delta\Psi$ e da actividade respiratória.....	46
3.5- Avaliação de efeitos das drogas na integridade das mitocôndrias.....	47
<b>4- Avaliação dos efeitos da MDMA e da MTA na permeabilidade transitória mitocondrial</b> ....	47
4.1- Determinação do $\Delta\Psi$ associado ao transporte de cálcio .....	47
4.2- Determinação do consumo de oxigénio associado ao transporte de cálcio.....	48
4.3- Determinação do intumescimento mitocondrial.....	48
4.4- Determinação dos fluxos de cálcio.....	49
4.5- Determinação do estado redox do NAD(P)H mitocondrial .....	50
<b>5- Análise dos dados e estatística</b> .....	50
<b>III – RESULTADOS</b> .....	52
<b>1- Efeitos da MDMA e da MTA na bioenergética de mitocôndrias de coração e fígado</b> .....	52
1.1- Efeitos da MDMA e da MTA no consumo de oxigénio.....	52
1.2- Efeitos da MDMA e da MTA no potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) .....	56
1.3- Efeitos da MTA no $\Delta\Psi$ associado ao estado 4 da respiração.....	59
1.4- Efeitos da MTA na eficiência fosforilativa (estado 3 da respiração mitocondrial).....	61
1.5- Efeitos da MTA na cadeia respiratória em mitocôndrias de coração quando dissociadas por FCCP.....	62
1.6- Efeitos da MTA e MDMA na integridade membranal das mitocôndrias.....	63

---

---

<b>2- Efeitos da MDMA e da MTA na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) induzida por Ca<sup>2+</sup> e Pi em mitocôndrias de coração e fígado.....</b>	<b>65</b>
2.1- Efeito da MDMA e da MTA no potencial membranar das mitocôndrias associado ao transporte de Ca <sup>2+</sup> .....	65
2.2- Efeito da MDMA e da MTA na respiração mitocondrial estimulada por Ca <sup>2+</sup> .....	69
2.3- Efeito da MDMA e da MTA no intumescimento mitocondrial dependente de Ca <sup>2+</sup> .....	71
2.4- Efeito da MDMA e da MTA nos fluxos mitocondriais de cálcio.....	75
<b>3- Efeitos da MDMA e da MTA na permeabilidade transitória mitocondrial induzida por t-BuOOH na presença de Ca<sup>2+</sup> .....</b>	<b>79</b>
3.1- Efeito da MDMA e da MTA no intumescimento mitocondrial induzido por t-BuOOH.....	79
3.2- Efeito da MDMA e MTA na despolarização do potencial transmembranar devido à MPT.....	81
3.3- Efeito da MDMA e da MTA na oxidação dos nucleótidos de pirimidina .....	84
<b>IV – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
1- Efeito da MDMA e MTA na bioenergética mitocondrial.....	87
2- Efeito da MDMA e MTA na permeabilidade transitória mitocondrial.....	92
<b>V – BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>97</b>

---

## ABREVIATURAS

---



---

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-MeDa</b>	$\alpha$ -metildopamina
<b>Abs</b>	Absorvência
<b>ADP</b>	Adenosina 5' – difosfato
<b>ADP/O</b>	Quociente entre as nanomoles de ADP fosforiladas e os nanoátomos grama de oxigénio consumidos
<b>AIF</b>	Factor indutor da apoptose (do inglês, <i>Apoptosis Inducing Factor</i> )
<b>AMP</b>	Adenosina 5'-monofosfato
<b>ANT</b>	Transportador dos nucleótidos da adenina
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>Bcl-2</b>	Produto do gene bcl-2 (do inglês, <i>B cell leukemia-2</i> )
<b>BPR</b>	Receptor periférico das benzodiazepinas
<b>BSA</b>	Albumina bovina sérica
<b>CK</b>	Creatina cinase
<b>CoQ</b>	Coenzima Q
<b>CphD</b>	Ciclofilina D
<b>Cu/Zn SOD</b>	Cobre/zinco superóxido dismutase
<b>CyA</b>	Ciclosporina A
<b>Cyt c</b>	Citocromo c
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenoglicoltetracético
<b>F1</b>	Subunidade catalítica da ATP sintase
<b>FCCP</b>	Carbonildiciano-p-trifluoro-metoxifenil-hidrazona
<b>Fo</b>	Subunidade da ATP sintase inibida por oligomicina
<b>GPx</b>	Glutatião peroxidase
<b>GR</b>	Glutatião redutase
<b>GSH</b>	Glutatião
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanossulfónico
<b>HK</b>	Hexocinase
<b>ICR</b>	Índice de controlo respiratório (definido como o quociente entre o estado 3 e 4 da respiração)
<b>MAO</b>	Monoamina oxidase

---

<b>MDA</b>	3,4-metilenodioxianfetamina
<b>MDEA</b>	3,4-metilenodioxi-N-etilamfetamina
<b>MDMA</b>	3,4-metilenodioximetamfetamina
<b>min</b>	Minutos
<b>Mn-SOD</b>	Manganésio superóxido dismutase
<b>MPT</b>	Permeabilidade transitória mitocondrial
<b>MTA</b>	4-metiltioamfetamina
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma oxidada)
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma reduzida)
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (forma oxidada)
<b>NADPH</b>	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (forma reduzida)
<b>nAtg</b>	Nano átomos grama
<b>N-Me-<math>\alpha</math>-MeDa</b>	N-metil- $\alpha$ -metildopamina
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>PMA</b>	Para-metoxianfetamina
<b>PMPT</b>	Poros de permeabilidade transitória mitocondrial
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SD</b>	Desvio padrão
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>-SH</b>	Grupo tiol
<b><i>t</i>-BuOOH</b>	Hidroperóxido de <i>tert</i> -butilo
<b>TPP<sup>+</sup></b>	Catião tetrafenilfosfónio
<b>Tris</b>	2-amino-2-hidroximetil-1,3 propanodiol
<b>u.a</b>	Unidades arbitrárias
<b>UCPs</b>	Proteínas dissociadoras (do inglês, <i>uncoupling proteins</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VDAC</b>	Canal aniónico dependente da voltagem
<b><math>\Delta p</math></b>	Força protomotriz
<b><math>\Delta\mu\text{H}^+</math></b>	Gradiente electroquímico de H <sup>+</sup>
<b><math>\Delta\text{pH}</math></b>	Gradiente de pH
<b><math>\Delta\Psi</math></b>	Potencial eléctrico transmembranar



**RESUMO**



## RESUMO

O consumo crescente de substâncias ilegais, como a 3,4- metilendioxi metanfetamina (MDMA) na forma de pastilhas, constitui uma situação preocupante, com repercussão na saúde pública e na própria sociedade. Este tipo de droga recreacional, vulgarmente conhecida por *ecstasy*, é considerada pelos consumidores como uma droga inócua e daí o seu elevado consumo. Todavia, há inúmeras descrições de mortes relacionadas com a sua ingestão e do aparecimento, a curto e médio prazo, de distúrbios psíquicos e neuropsiquiátricos, hipertermia, falência hepática e renal aguda, rabdomiólise, hiponatremia e outras complicações cardiovasculares. Contudo e à semelhança de outras drogas clandestinas, muitos destes efeitos tóxicos podem dever-se a diferentes contaminantes presentes nas pastilhas de *ecstasy*. De entre os diferentes contaminantes destaca-se a 4-metiltoanfetamina (MTA), um derivado anfetamínico recentemente introduzido no mercado e potencialmente tóxico, o qual é também comercializado sob a designação de *ecstasy* e de *flatliner*.

Os mecanismos de neurotoxicidade da *ecstasy* têm sido alvos de inúmeros estudos. Porém, e à semelhança dos mecanismos responsáveis pela sua hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, bem como os mecanismos responsáveis pela hipertermia, uma complicação frequentemente observada em jovens após o consumo das pastilhas de *ecstasy*, não estão ainda esclarecidos. Por outro lado, muito pouco se sabe também acerca dos efeitos tóxicos da MTA. A mitocôndria pela sua actividade multifacetada fundamental à viabilidade celular é um alvo primário da toxicidade celular. Além da sua função bioenergética, a mitocôndria têm funções relevantes na regulação osmótica, no estado redox, no desenrolar da morte celular por apoptose e por necrose e na regulação celular de  $Ca^{2+}$ . Assim, a interferência de um composto nas múltiplas funções da mitocôndria pode conduzir a uma alteração celular ou, conseqüentemente, determinar a morte da célula. De facto, nos últimos anos verificou-se que compostos que alteram a permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) podem por mecanismos diferentes conduzir à morte da celular por apoptose ou necrose.

Assim, o objectivo deste trabalho foi estudar os efeitos da MDMA e da MTA na mitocôndria, nomeadamente na sua função bioenergética e na MPT, no sentido de esclarecer alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e hipertermia induzida nos consumidores de *ecstasy*. Os estudos foram realizados em mitocôndrias de fígado e de coração de rato, tendo sido avaliados os efeitos da MDMA e da MTA na bioenergética mitocondrial, nomeadamente, na cadeia respiratória, no potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ), no sistema de fosforilação

oxidativa e na cadeia respiratória dissociada do sistema fosforilativo. No sentido de clarificar os mecanismos responsáveis por alguns efeitos das drogas estudámos também a sua acção na integridade das membranas mitocondriais.

A MDMA pré-incubada em diferentes concentrações com as mitocôndrias de fígado e de coração não afecta significativamente os parâmetros mitocondrais relacionados com a sua função bioenergética, sugerindo que a *ecstasy* em mitocôndrias energizadas com succinato não altera os níveis energéticos da célula. A MTA, ao contrário da MDMA, causa despolarização do  $\Delta\Psi$ , estimula o estado 4 e diminui o estado 3 da respiração, significando que a MTA tem um efeito dissociador da cadeia respiratória mitocondrial e do sistema fosforilativo. A eficiência fosforilativa da mitocôndria na presença de MTA é claramente afectada como se pode concluir pelo decréscimo do ICR e do ADP/O, bem como pelas alterações nas flutuações associadas ao ciclo fosforilativo induzido pelo ADP. Deste modo, para além dos efeitos da MTA na cadeia respiratória, esta anfetamina afecta a síntese de ATP como consequência da despolarização do  $\Delta\Psi$ , possivelmente devida a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons. Estes resultados demonstram que a MTA ao diminuir os níveis de ATP na célula, provavelmente devido à indução de alterações na integridade da membrana mitocondrial, poderá contribuir para a morte das células e para a hipertermia e rabdomiólise desenvolvida após o consumo deste tipo de drogas. Assim, a MDMA não tem efeito dissociador nas mitocôndrias e por conseguinte não induz alterações significativas na carga energética celular quando comparada com a MTA. Por outro lado, a hipertermia induzida pela *ecstasy* não será devida a um efeito dissociador com dissipação de  $\Delta\Psi$  na forma de calor, mas à presença de contaminantes, ou os seus efeitos *in vivo* poderão resultar da acção dos seus metabolitos, nomeadamente a N-metil- $\alpha$ -metildopamina (N-Me- $\alpha$ -MeDa) e  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDa). Em adição aos estudos na bioenergética mitocondrial, estudámos também os efeitos da MDMA e da MTA na MPT dado as suas múltiplas funções nos processos de regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  celular, defesa da célula e regulação da morte celular. Verificámos que a MDMA, à semelhança do observado com a MTA, previne o intumescimento mitocondrial dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a despolarização do  $\Delta\Psi$  e a libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado quando a MPT foi induzida *in vitro* por  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfato inorgânico (Pi). Adicionalmente, a MDMA e a MTA quando adicionadas no decorrer destes processos, conferem às mitocôndrias a capacidade para inibirem a progressão do intumescimento mitocondrial, recuperarem o  $\Delta\Psi$  e reacumularem o  $\text{Ca}^{2+}$  libertado em consequência da indução de MPT, de modo idêntico ao observado com a ciclosporina A (CyA), um potente e específico inibidor da MPT. A MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de um prooxidante como o hidroperóxido de *tert*-

butilo (t-BuOOH), um análogo de cadeia curta dos hidroperóxidos lipídicos formados durante peroxidação lipídica, é também inibida pela MDMA e MTA dado que inibem a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$ , a despolarização do  $\Delta\Psi$  e o intumescimento mitocondriais associados à indução de MPT. Uma vez que ambas as drogas revertem o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\Delta\Psi$  associados à indução da MPT, a sua inibição por estas drogas não é devida a alterações no sistema de transporte de electrões ou no uniporta de  $\text{Ca}^{2+}$  mas sim a efeitos nos constituintes do poro de MPT. Adicionalmente, a oxidação dos nucleótidos NAD(P)H mitocondriais associada à indução de MPT é também inibida por incubação das mitocôndrias com MDMA e com a MTA, embora e à semelhança do observado na prevenção da MPT, a MTA apresenta uma maior capacidade de inibição da MPT e de inibição da oxidação do NAD(P)H.

Assim, estes resultados sugerem que a MTA pode induzir alterações significativas na carga energética celular como consequência da dissociação da cadeia respiratória e do sistema fosforilativo, tornando as mitocôndrias incapazes de responder às necessidades energéticas da célula, devido a alterações na membrana mitocondrial interna, contribuindo deste modo para os mecanismos de morte celular de hepatotoxicidade e cardiotoxicidade. Por outro lado, a MTA ao dissociar a cadeia respiratória mitocondrial do sistema fosforilativo pode provocar a dissipação do gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) sob a forma de calor e contribuir para os mecanismos responsáveis pela hipertermia, rabdomiólise e morte celular observada nos consumidores de pastilhas de *ecstasy*. Dado que a MPT tem sido implicada na homeostase mitocondrial e celular do  $\text{Ca}^{2+}$ , na defesa celular e nos mecanismos de toxicidade, a inibição de uma das funções da MPT poderá estar na base da morte celular induzida pelo consumo de pastilhas de *ecstasy* contendo MDMA ou MTA. Considerando que aberturas reversíveis parciais do poro de MPT nas células podem desempenhar um papel essencial na sua actividade vital, a inibição da MPT pela MDMA e mais fortemente pela MTA poderá estar implicada nos seus mecanismos de morte celular por necrose e apoptose e contribuir para a hepatotoxicidade e cardiotoxicidade provocada pelo consumo destas drogas. Por outro lado, a MDMA e MTA ao inibirem a MPT levam à perda da homeostase celular do cálcio, uma vez que causam distúrbios nas interacções de  $\text{Ca}^{2+}$  entre retículo endoplasmático e a mitocôndria. Este desequilíbrio entre os mecanismos de influxo e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial poderá causar toda uma série de alterações ao nível mitocondrial com consequente libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol. Como a regulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  celular e a manutenção os níveis de ATP é essencial para o funcionamento normal da célula, nomeadamente do miocárdio, as alterações na homeostase deste ião podem explicar as arritmias e as paragens cardíacas que têm

sido associadas ao consumo de pastilhas de ecstasy. Contudo, o estudo dos efeitos dos principais metabolitos da MDMA, a N-metil- $\alpha$ -metildopamina (N-Me- $\alpha$ -MeDa) e a  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDa) ao nível mitocondrial será essencial para o esclarecimento dos efeitos da ecstasy *in vivo* e constituem uma perspectiva futura na continuação deste trabalho.

---

## I – INTRODUÇÃO

---



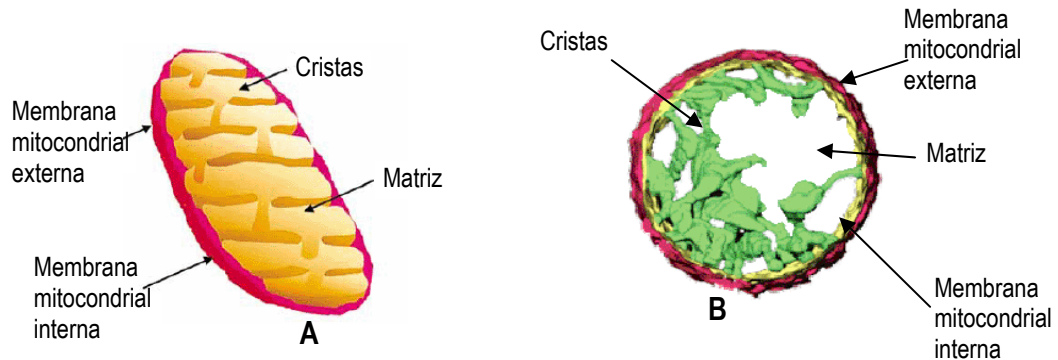
## 1- A mitocôndria, estrutura e funções

### 1.1- Ultra estrutura e fisiologia

As mitocôndrias são organitos intracelulares ( $1 \times 2 \mu\text{m}$ ) existentes nas células eucarióticas e o seu número por célula encontra-se relacionado com as necessidades energéticas das células. Os órgãos metabolicamente activos, como o fígado, o cérebro e o músculo cardíaco contêm um maior número de mitocôndrias e apresentam maior susceptibilidade ao efeito de xenobióticos e ao desenvolvimento de determinadas patologias, designadas por patologias mitocondriais (Szewczyk e Wojtczak, 2002). De acordo com a imagem clássica, a estrutura da mitocôndria (Fig. 1.1- A) apresenta: 1) a membrana mitocondrial externa, que constitui uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citosol maiores que 1500 Da e separa o espaço intermembranar do citosol; 2) o espaço intermembranar, cuja composição iónica é semelhante à do citosol e contém um distinto grupo de proteínas envolvidas no transporte e regulação celular destacando-se o citocromo c; 3) a membrana mitocondrial interna, paralela à membrana externa, permeável apenas ao oxigénio, dióxido de carbono e água apresentando pequenas porções desta membrana que se prolongam para o interior da matriz designadas por cristas mitocondriais, onde está localizado o sistema de transporte de electrões, o sistema fosforilativo e os transportadores membranares; 4) a matriz mitocondrial que contém as enzimas metabólicas, o DNA e RNA mitocondrial. Este genoma tem unicamente genes que codificam para algumas proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (Lesnefsky et al., 2001). No entanto, e segundo estudos mais recentes utilizando a tomografia microscópica electrónica, a estrutura mitocondrial não é assim tão simples (Mannella, 2000) tendo sido demonstrado que as cristas não são simples invaginações da membrana mitocondrial interna, mas sim estruturas independentes que podem ou não estar ligadas à membrana mitocondrial interna (Fig.1.1-B). Assim, verificou-se que a área da superfície topologicamente contínua da membrana interna se encontra dividida em dois domínios distintos. Um deles encontra-se intimamente justaposto à membrana externa e estabelece contactos íntimos com a membrana externa em numerosos locais. O segundo domínio forma as cristas, estruturas tubulares ou lamelares contínuas à membrana mitocondrial interna e ligadas através de pequenas estruturas tubulares denominadas de *crista junctions* (Manella et al., 2001)

As mitocôndrias não têm uma forma única e podem ter diferentes formas de acordo com o tecido onde se localizam (Collins *et al.*, 2002). Todo o sistema é muito dinâmico e dependerá do estado fisiológico da mitocôndria e do tipo de célula (Scheffler, 2000). O comportamento dinâmico das mitocôndrias na célula, o seu movimento e a sua morfologia são hoje reconhecidos como sendo

o resultado de interacções complexas de proteínas da sua superfície externa com vários componentes do citoesqueleto da célula, que incluem filamentos de actina, microtubulos e filamentos intermediários (Scheffler, 1999).



**Figura 1.1 – Comparação entre a perspectiva estrutural antiga e a mais recente da mitocôndria.** (A)- Modelo clássico da mitocôndria, a mitocôndria é constituída pela membrana externa; pela membrana interna que forma invaginações para o espaço intermembranar, originando as cristas e pela matriz mitocondrial. (B)- Mitocôndria visualizada por tomografia electrónica em que as cristas são estruturas internas que podem ou não estar ligadas à membrana mitocondrial interna (Adaptado de Lesnefsky *et al.*, 2001; Mannella *et al.*, 2001)

## 1.2- Funções metabólicas das mitocôndrias

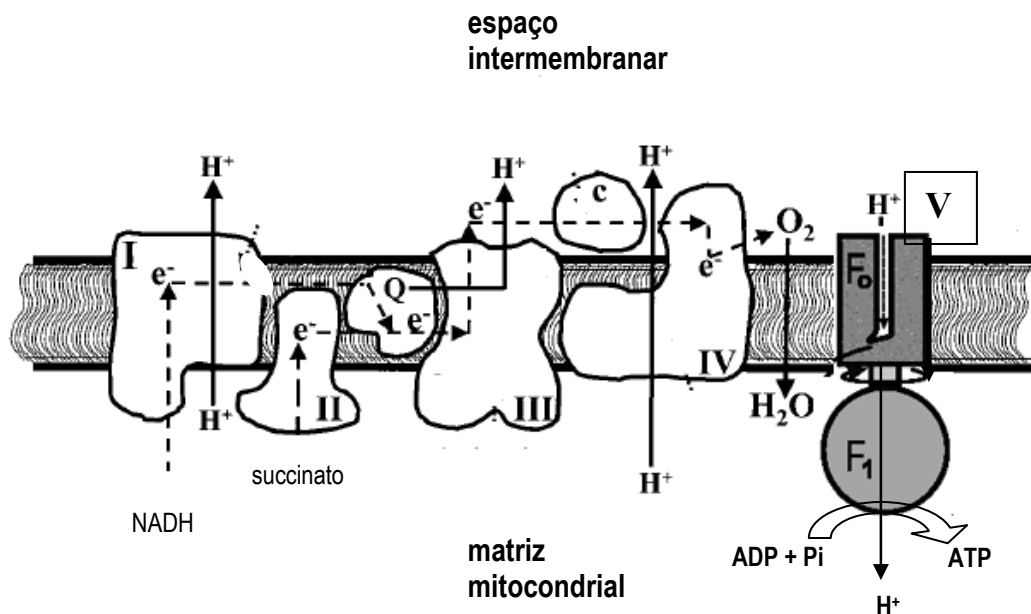
As mitocôndrias produzem a maior parte do ATP (aproximadamente 95%) que a célula necessita, sendo por isso, conhecidas como as centrais energéticas da célula. Nas mitocôndrias ocorrem vários processos e vias metabólicas: 1) a conversão do piruvato a acetil-CoA, processo este catalizado pelo complexo da desidrogenase do piruvato; 2) o ciclo do ácido cítrico; 3) fosforilação oxidativa que resulta do funcionamento conjunto da cadeia respiratória associada à síntese de ATP; 4) a  $\beta$ -oxidação (degradação dos ácidos gordos); 5) parte do ciclo da ureia; 6) o fornecimento de intermediários metabólicos ao resto da célula; 7) o armazenamento de cálcio, de forma a manter a concentração de cálcio citoplasmático a um nível baixo e constante; 8) a síntese de DNA, RNA e proteínas; 9) a reparação do DNA; 10) a formação de espécies reactivas de oxigénio e 11) nalguns casos a regulação da termogénese (Pedersen, 1999). A função mais importante das mitocôndrias consiste na degradação de substractos energéticos (ácidos gordos, piruvato, aminoácidos) provenientes do citoplasma e a síntese de ATP. As reacções do ciclo do ácido cítrico levam à oxidação dos compostos de carbono, com formação de  $\text{CO}_2$  e também fornecem equivalentes redutores, temporariamente ligados a coenzimas. A maioria destes

processos ocorre ao nível da matriz mitocondrial. A cadeia respiratória utiliza compostos redutores (NADH e ubiquinol), dadores de electrões, para reduzir o  $O_2$  a  $H_2O$ . A esta reacção está associado o transporte de protões ( $H^+$ ) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, processo que origina a formação do gradiente electroquímico de  $H^+$  ( $\Delta\mu H^+$ ) através da membrana mitocondrial interna. Pelo facto de a membrana mitocondrial interna ser impermeável a protões, ocorre a sua acumulação no espaço intermembranar gerando a formação  $\Delta\mu H^+$  o qual é utilizado pela mitocôndria para sintetizar ATP a partir de ADP e  $P_i$ , pela ATPsintase. (Koolman e Röhm, 1996).

### 1.3- O sistema de transporte de electrões e a fosforilação oxidativa

Na maioria dos tecidos 90-95% do ATP é gerado pelas mitocôndrias através da fosforilação oxidativa que ocorre na membrana mitocondrial interna. Nas células animais o processo de fosforilação oxidativa requer numerosas proteínas, verificando-se que mais de 60 proteínas estão associadas ao sistema de transporte de electrões, 16 com o complexo da sintase de ATP e 2 proteínas constituem os transportadores do ADP/ATP e do  $H^+/P_i$ . O sistema de transporte de electrões é constituído por quatro complexos enzimáticos transmembranares designados por complexo I (NADH-desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (citocromo redutase) e complexo IV (citocromo oxidase) (Fig. 1.2). Os dinucleótidos de nicotinamida adenina (NADH) e o succinato conduzem os electrões para os complexos I e II da cadeia respiratória, respectivamente, resultando na ejeção de protões do compartimento mitocondrial interno para o espaço intermembranar e na transferência de electrões para o transportador mais próximo na cadeia respiratória, a Coenzima Q (CoQ), que transfere os electrões entre estes dois complexos e o complexo III. Posteriormente, os electrões são transferidos para o citocromo c e finalmente para o complexo IV onde ocorre mais ejeção de protões. É no complexo IV que o  $O_2$ , fornecido na respiração pelo sistema circulatório, funciona como receptor de electrões e se liga aos protões existentes na matriz levando à formação de  $H_2O$  (Fig. 1.2). Assim, o transporte de electrões através dos complexos respiratórios tem como finalidade a transferência de energia dos substratos energéticos existentes na matriz mitocondrial para uma forma de energia ( $\Delta\mu H^+$ ) que poderá ser utilizada para fosforilar o ADP. As mitocôndrias produzem ATP através da associação entre o gradiente de protões, gerado pela respiração, e a fosforilação oxidativa do ADP pelo complexo V ( $F_0F_1$ ATPase ou ATPsintase). O complexo V é constituído por duas subunidades (Fig 1.2), a subunidade  $F_0$ , correspondente a um segmento hidrofóbico que atravessa a membrana mitocondrial interna e que funciona como canal a protões do complexo, e a subunidade  $F_1$ , que corresponde à cabeça esférica do complexo virada para o lado da matriz e possui uma função catalítica na síntese

de ATP (Fig. 1.2). Entre estas duas subunidades existe uma proteína que confere sensibilidade à oligomicina (OSCP “oligomycin sensibility conferring protein”), fazendo com que a ATP sintase seja inibida por este composto. Quando o ADP e o  $P_i$ , componentes necessários à síntese de ATP, estão disponíveis na matriz mitocondrial, eles ligam-se à fracção catalítica do complexo V, permitindo a abertura da fracção  $F_o$  e a consequente entrada de prótons para o interior da matriz. A energia libertada no influxo de prótons através da fracção  $F_o$  é usada na fosforilação do ADP para sintetizar ATP pela fracção  $F_1$  (Fig. 1.2).



**Figura 1.2 – Representação esquemática da membrana mitocondrial interna com os quatro componentes da cadeia respiratória (complexos I, II, III, IV) e o sistema fosforilativo (complexo V).** É representada a entrada de equivalentes redutores da NADH e succinato na cadeia respiratória para os complexos I e II respectivamente, o fluxo de electrões segue via coenzima Q (Q) sequencialmente através do complexo III, citocromo c (c) e complexo IV. O complexo V utiliza o gradiente de prótons para a síntese de ATP. Fluxo de prótons representado pelas setas a cheio, e o fluxo de electrões representado pelas setas a tracejado.  $F_o$  = fracção inibida pela oligomicina;  $F_1$  = fracção catalítica da ATPsintase. (Adaptado de de Lesnefsky, et al., 2001)

A associação entre a oxidação de substratos pela cadeia respiratória e a fosforilação designa-se por *teoria quimiosmótica* e foi proposta por Peter Mitchell (Mitchell, 1961). Na cadeia respiratória, o fluxo de electrões gera energia redox suficientemente elevada que é utilizada para ejectar prótons do compartimento mitocondrial interno, para o espaço intermembranar. O gradiente electroquímico de prótons assim gerado, também designado por força protomotriz ( $\Delta p$ ), constitui a força motriz capaz de fazer o retorno dos prótons através do complexo ATPsintase. Este gradiente é composto de um componente eléctrico, o potencial transmembranar ( $\Delta\Psi$ ) e de um gradiente químico, o gradiente de pH ( $\Delta pH$ ). Como resultado, as mitocôndrias são organelos celulares únicos

que conseguem desenvolver um  $\Delta\Psi$  de cerca de 180 mV (negativo no interior) e cujo meio interno mantém um valor de pH de cerca de 8. Em consequência disto, as mitocôndrias conseguem não só acumular compostos de carácter catiónico, que sejam capazes de atravessar as membranas, como também internalizar ácidos fracos na sua forma aniónica. (Szewczyk e Wojtczak, 2002).

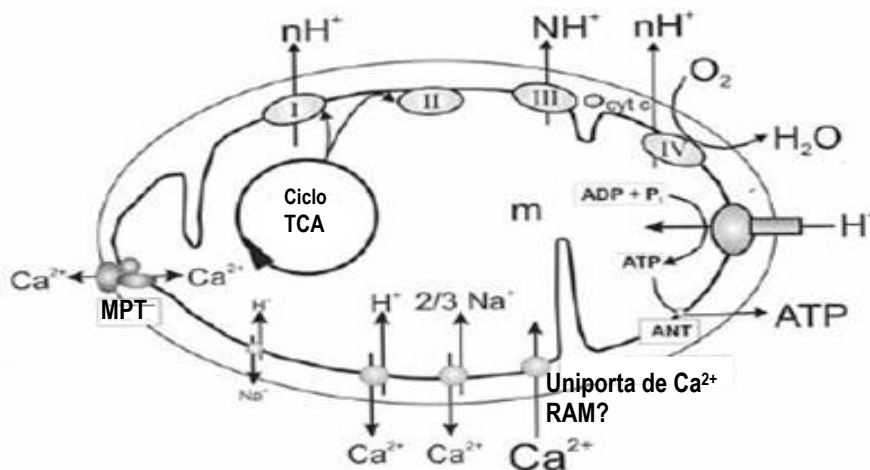
#### 1.4- Importância da mitocôndria na homeostase do $\text{Ca}^{2+}$ celular

A mitocôndria, para além do seu papel na bioenergética tem também um papel activo na regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  celular possuindo várias proteínas envolvidas na sua captação e libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  e podendo funcionar como um reservatório de  $\text{Ca}^{2+}$ . Adicionalmente, a mitocôndria fornece a maior parte do ATP usado pelas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases do retículo endoplasmático e da membrana plasmática (Saris e Carafoli, 2005). Além do mais, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  a uma suspensão de mitocôndrias energizadas resulta na estimulação da cadeia respiratória, efluxo de prótons da matriz e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da mitocôndria. As mitocôndrias são capazes de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  para a matriz através do gradiente electroquímico sem que ocorra hidrólise do ATP ou ocorra cotransporte com qualquer outro ião, ou seja o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é um processo puramente electrogénico movido pela componente eléctrica, o  $\Delta\Psi$ , da força protomotriz ( $\Delta p$ ) (Carafoli, 1987; Chakraborti et al., 1999). A proteína responsável pela acumulação de cálcio é o *uniporta de cálcio* que usa o  $\Delta\Psi$  (Fig. 1.3). No entanto, em mitocôndrias isoladas a sua constante de afinidade para o  $\text{Ca}^{2+}$  é baixa, o que sugere que este não será o único mecanismo de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  quando as mitocôndrias são expostas a rápidos e intensos pulsos de cálcio intracelular. Além do mais, o sistema uniporta de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser inibido por policatões como o vermelho de ruténio (Duchen e Jobson 2004). Uma via alternativa de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é o designado por *RAM* (do inglês *rapid mode uptake*), através do qual ocorrerá a rápida captação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1.3) Este mecanismo foi já identificado em mitocôndrias de fígado e de coração e em muito menor extensão nas de cérebro (Sparagna et al., 1995; Gunter et al., 2000; Buntinas et al., 2001) e permite à mitocôndria acumular rapidamente quantidades limitadas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Apesar de a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias ser apontada essencialmente como um dispositivo de segurança em situações de sobrecarga intracelular transitória de  $\text{Ca}^{2+}$ , os fluxos mitocondriais de  $\text{Ca}^{2+}$  fazem parte da sinalização celular do  $\text{Ca}^{2+}$  (Orrenius et al., 2003; Smaili et al., 2003). Uma vez dentro da mitocôndria, o  $\text{Ca}^{2+}$  têm vários efeitos, nomeadamente a estimulação de desidrogenases na matriz mitocondrial sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , que por sua vez são locais de produção de NADH para a cadeia respiratória e como tal para a estimulação do metabolismo energético mitocondrial (Orrenius et al., 2003). Todavia, as mitocôndrias não

conseguem captar quantidades ilimitadas de  $\text{Ca}^{2+}$ , tendo por isso de o libertar a uma velocidade comparável à do influxo (Fig.1.3). O efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  da mitocôndria para o citosol pode ocorrer através de diferentes mecanismos. Assim, o efluxo pode ocorrer através de um mecanismo de *antiporta* com  $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$ , isto é, de um transporte dependente de  $\text{Na}^+$  ou de outro independente de  $\text{Na}^+$ , que troca  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$  ou por  $\text{H}^+$ , respectivamente (Gunter e Pfeiffer, 1990; Packer, 1994) por reversão do uniporta de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nicholls, 1978; Chakraborti et al., 1999). O efluxo pode ainda ocorrer por alterações na fase lipídica da membrana (Gunter e Pfeiffer, 1990) e através de vias de libertação mediadas por canais (Kinnally et al., 1992) ou pela combinação de dois ou mais destes mecanismos. Adicionalmente, a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  da mitocôndria pode também ocorrer por oxidação de nucleótidos de nicotinamida adenina da matriz a ADP-ribose nicotinamida (Richter e Kas, 1991; Richter, 1993) ou por oxidação de grupos -SH de proteínas membranares que se encontram associados com a regulação da dinâmica de  $\text{Ca}^{2+}$  da mitocôndria (Fagian et al., 1990). Outro mecanismo independente de sódio e fundamental no efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , é a formação de um poro de permeabilidade transitória mitocondrial o (PMPT), cujo estado de baixa condutância é responsável pela “descarga” de  $\text{Ca}^{2+}$  para valores de concentração abaixo dos limites fisiológicos (Icha et al., 1997). No entanto em estados mais avançados dá origem a um megacanal designado de permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) (Fig. 1.3), que constitui igualmente um mecanismo importante para a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  da mitocôndria como se descreverá mais adiante.

Em conclusão, apesar de a mitocôndria poder não ter um papel determinante na homeostase de cálcio celular em condições de repouso, ela é determinante na forma e na duração de um pico concentracional de cálcio após estimulação celular. Por sua vez, o posicionamento da mitocôndria junto do retículo endoplasmático pode ser condicionante da sua capacidade tamponizante. Além do mais, a acumulação excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  é deletéria para a função mitocondrial e celular tendo sido proposto que o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico desempenha um papel importante na estimulação de sinais apoptóticos, através da regulação de enzimas específicas que, uma vez activadas, conduzem à morte celular, como por exemplo, as endonucleases. (McConkey e Orrenius, 1997). Adicionalmente ao nível das células musculares esqueléticas e cardíacas o desenvolvimento da contracção muscular depende criticamente da elevação dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  na vizinhança das proteínas contrácteis o designado “ $\text{Ca}^{2+}$  activador”. A esse nível o  $\text{Ca}^{2+}$  favorece a contractibilidade muscular por um duplo mecanismo: a) activando a ATPase miofibrilar e aumentando a quantidade de ATP necessário à contracção; b) a interacção entre as proteínas contrácteis actina e miosina e pela sua fixação inactivadora ao complexo troponina-tropomiosina (Berridge 2003). Apesar de a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do espaço extracelular ser indispensável

para iniciar a contracção das células musculares cardíacas, estima-se que cerca de 80% do “Ca<sup>2+</sup> activador” provêm da mobilização secundária a partir de reservatórios intracelulares, nomeadamente do retículo endoplasmático e da mitocôndria. Por outro lado, o relaxamento é por sua vez assegurado pela remoção do “Ca<sup>2+</sup> activador”, por recaptação activa para as estruturas intracelulares de depósito onde se destaca a mitocôndria (Smali et al., 2003).

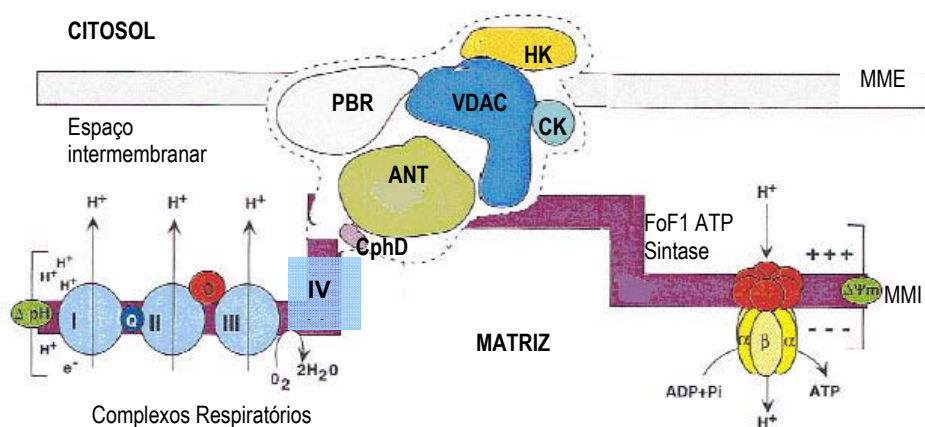


**Figura 1.3 – Esquema simplificado de uma mitocôndria ilustrando os principais elementos do sistema de transporte de electrões e possíveis vias de influxo e efluxo de Ca<sup>2+</sup>.** O potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) é gerado através da ejeção de protões pelos complexos enzimáticos do sistema de transporte de electrões. O  $\Delta\Psi$  constitui a força motriz para a fosforilação do ADP pela F1Fo ATPase. Adicionalmente, a captação de Ca<sup>2+</sup> através do uniporta de Ca<sup>2+</sup> é dependente do  $\Delta\Psi$  e a dissipação deste potencial anula a captação de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial. A composição molecular exacta do uniporta não é conhecida e pensa-se que pode existir uma configuração alternativa para o poro e que será o responsável pela rápida captação de Ca<sup>2+</sup> (RAM) através da qual a mitocôndria pode rapidamente acumular quantidades limitadas de Ca<sup>2+</sup>. O efluxo de Ca<sup>2+</sup> ocorre através do antiporta Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> que troca 2 iões de Na<sup>+</sup> por cada Ca<sup>2+</sup>. Em alguns tipos de células pode também existir um transportador de Ca<sup>2+</sup> e de H<sup>+</sup>. A permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) é um mega canal constituído por várias proteínas mitocondriais que podem ser induzidas pela acumulação excessiva de Ca<sup>2+</sup>, pelo stress oxidativo. Uma vez induzido o poro de MPT, este permite a passagem de todas as moléculas superiores a 1500 Da. Contudo, ocorrem aberturas rápidas e reversíveis da MPT e estas podem ter um papel primordial no controlo do Ca<sup>2+</sup> mitocondrial. O influxo de Ca<sup>2+</sup> associado à sua libertação mediada pelos sistemas de troca constitui um ciclo de Ca<sup>2+</sup> dissipador de energia mitocondrial. (Adaptado de Duchon e Jacobson 2004)

### 1.5- Permeabilidade transitória mitocondrial

A MPT consiste na abertura de uma via de permeabilidade inicialmente reversível e que permite a difusão de solutos até 1500 Da, da matriz mitocondrial para o espaço extramitocondrial e vice-versa. Trata-se de um processo complexo do qual se conhecem vários indutores moduladores e inibidores, como referiremos a seguir. A MPT é causada pela formação e abertura de poros proteicos na membrana interna mitocondrial e designados por poros transitórios de permeabilidade

mitocondrial (PMTP). Apesar de ainda ser um assunto muito discutido na literatura, existe algum consenso sobre o que poderá iniciar a condição de MPT. É sabido que a entrada maciça de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da mitocôndria está associada a um incremento da geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) no interior daquele organelo levando à formação dos PMPT e rompendo a barreira de impermeabilidade característica da membrana interna mitocondrial (Zoratti *et al.*, 2005). A abertura dos PMTP provoca a despolarização mitocondrial, dissociação da fosforilação oxidativa, libertação de solutos intramitocondriais perdendo este organelo a capacidade de produção de energia e a capacidade de acumulação de cálcio. (Zoratti e Szabo, 1995). A MPT está também associada a um aumento de volume mitocondrial, causando um rompimento da membrana externa e podendo mesmo levar à apoptose por libertação de factores apoptóticos, como o citocromo c ou em última análise conduzir à necrose da célula, (Kroemer e Reed 2000). Os PMPT são complexos multiproteicos que se formam nas zonas de união entre a membrana externa e interna da mitocôndria e apesar da identidade molecular deste complexo multiproteico não se encontrar ainda completamente definida, alguns dos seus componentes centrais foram já identificados (Fig. 1.4).



**Figura 1.4. Representação esquemática dos complexos respiratórios, FoF1Sintase e dos componentes do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PMTP) na membrana mitocondrial interna (MMI) e membrana mitocondrial externa (MME).** O potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) é gerado através da ejeção de prótons pelos complexos enzimáticos do sistema de transporte de electrões. O  $\Delta\Psi$  constitui a força motriz para a fosforilação do ADP pela F1Fo ATP Sintase. O PMTP é constituído ou influenciado por componentes da MMI e MME incluindo a hexocinase (HK), a creatina cinase (CK), o canal de voltagem dependente de aniões (VDAC), o transportador de nucleótidos de adenina (ANT), o receptor periférico de benzodiazepinas (PER) e a ciclofilina D (CphD) da matriz mitocondrial. (Adaptado de Gross *et al.*, 1999).

De entre eles destacam-se proteínas citoplasmáticas como a hexocinase (HK) e a creatina cinase (CK), que se encontra localizada no espaço intermembranar, proteínas da membrana externa, o canal aniónico dependente de voltagem (VDAC) e o receptor das benzodiazepinas (BPR), proteínas

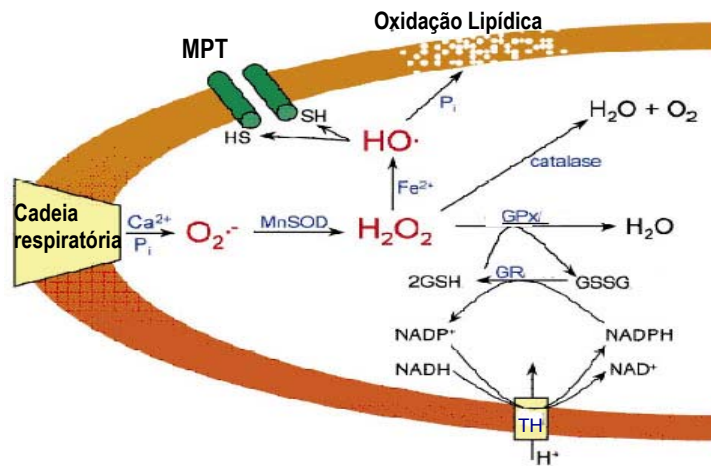


da membrana interna, o transportador dos nucleótidos da adenina (ANT) e proteínas da matriz mitocondrial, a ciclofilina D (Cph D) (Duchen, 1999; Crompton, 1999; Carmody e Cotter, 2001). Em condições fisiológicas, o poro permanece fechado até que o  $\text{Ca}^{2+}$  aumente substancialmente. A MPT é especificamente inibida por ciclosporina A (CyA) (Broekemeier et al., 1989) que se liga à CphD impedindo a ligação destas às restantes proteínas constituintes do poro e como tal, a sua formação (Zoratti e Szabo, 1995). A CphD é uma peptidilprolil *cis-trans* isomerase da matriz mitocondrial que em situações de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  e de stresse oxidativo se liga às proteínas constituintes do poro induzindo a sua activação e abertura, conferindo-lhe sensibilidade à inibição pela CyA. A indução da MPT é modulada por diferentes factores, sendo favorecida em condições de elevada acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria (Hunter et al., 1976), pelo aumento do quociente  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , por prooxidantes (Byrne et al., 1999), pelo pH elevado ( Bernardi et al., 1998; Fontaine e Bernardi, 1999; Halestrap, 1999), pelo o stresse oxidativo devido às ROS e/ou à depleção mitocondrial de glutatião (GSH) e outros antioxidantes como o NADPH. (Chernyak e Bernardi, 1996; Garcia-Ruiz et al., 1997, 2000). A MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser estimulada por uma grande variedade de compostos com diferentes características químicas, incluindo o Pi, agentes oxidantes, reagentes ditiólicos, protonóforos e ligandos do ANT (Zoratti e Szabo, 1995), quando acompanhada por concentrações matriciais elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nestas condições, ocorre oxidação de grupos -SH de proteínas específicas da membrana mitocondrial, do NAD(P)H, do GSH matricial e depleção dos nucleótidos de adenina (Packer et al., 1997; Halestrap et al., 2002). Todavia, existe uma alternância entre um estado de baixa condutância do PMPT, que resulta de aberturas transitórias do poro e um estado de alta condutância, que resulta de aberturas de longa duração e que conduzem ao estado completamente aberto do poro ( Ichas e Mazat em 1998). A alternância entre os dois estados é controlada pela ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  ao poro conduzindo ao intumescimento e consequente disfunção mitocondrial, o que ocorre perante situações de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . A abertura transitória do poro de MPT resulta na dissipação temporária do gradiente de protões e na despolarização mitocondrial (Ichas et al., 1994, 1997) e é dependente do pH. O estado de alta condutância permite a difusão não selectiva de grandes moléculas, com aberturas estáveis, que conduzem à dissipação do  $\Delta\Psi$  e à ruptura da estrutura mitocondrial. Contudo, em condições patológicas, um ou vários dos factores reguladores da MPT podem contribuir para alterar a susceptibilidade à sua indução. A MPT constitui assim um elemento chave no controlo da viabilidade da célula independentemente do fenótipo da morte celular ( Kroemer e Reed, 2000; Vieira et al., 2000) verificando-se que agentes que previnem ou induzem a MPT regulam a vida ou morte da célula (Green e Reed, 1998; Brenner e Kroemer, 2000 ; Zoratti M et al., 2004).

### 1.6- Envolvimento do stresse oxidativo na indução da permeabilidade transitória mitocondrial

O principal mecanismo responsável pela produção mitocondrial de ROS é a cadeia respiratória (Cadenas e Davies, 2000; Raha e Robinson, 2000) na membrana interna e a monoaminoxidase na membrana mitocondrial externa. A cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial interna, constitui um mecanismo essencial para a geração de energia celular. Porém a respiração mitocondrial gera activa e continuamente ROS (Fig. 1.5), com consequente indução de stresse oxidativo. As ROS são continuamente produzidas e mantidas a um nível relativamente elevado nas mitocôndrias e resultam da auto-oxidação dos componentes da cadeia respiratória, com produção de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o péroxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), que na presença de ferro pode produzir o radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), altamente reactivo (Fig. 1.5), (Turrens e Boveris, 1980; Kirkinezos e Moraes, 2001). As mitocôndrias, sendo o principal local de produção de ROS, são também o seu principal alvo de acção tóxica, o que resulta no dano da cadeia respiratória mitocondrial e como consequência, num aumento considerável na geração de ROS. Forma-se assim um “ciclo vicioso” (Lenaz *et al.*, 2000) que pode ser um factor indutor de um elevado número de disfunções associadas ao envelhecimento e também um dos mecanismos indutores de morte celular programada. Por outro lado, a disfunção mitocondrial resultante do processo de stresse oxidativo conduz a um decréscimo nos níveis intracelulares de ATP, o que pode desencadear um processo necrótico (Chandra *et al.*, 2000; Lee e Wei, 2000).

As ROS são normalmente decompostas ou os seus produtos de peroxidação neutralizados por sistemas de defesa naturais constituídos principalmente por enzimas mitocondriais e citosólicas (Ursini *et al.*, 1986; Augustin *et al.*, 1997). Todavia, quando a produção de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, o dano oxidativo nas proteínas membranares mitocondriais leva à indução da MPT. O NADPH tem um papel central na defesa da mitocôndria contra o stress oxidativo, pois é o efeito redutor do NADPH no GSH que mantêm a funcionalidade da principal enzima responsável pela remoção de  $H_2O_2$ , a glutatião peroxidase (GPx) (Fig. 1.5). Sabe-se também que a MPT ocorre quando os grupos tiólicos das proteínas da membrana interna são oxidados, resultando em mudanças conformacionais que de algum modo conduzem à formação de um poro membranar não selectivo (Fig. 1.5) (Kowaltowski A.J *et al.*, 2001).



**Figura 1.5.- A acumulação mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS) induz permeabilidade transitória mitocondrial (MPT).** A cadeia respiratória inserida na membrana mitocondrial interna gera constantemente pequenas quantidades de radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Estes radicais são normalmente removidos através da manganésio – supéroxido dismutase (MnSOD), que origina  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é então reduzido a água pela glutatíon peroxidase (GPx). O glutatíon (GSH) é regenerado pela glutatíon redutase (GR), que usa o NADPH como dador de electões. O NADH, está disponível em quantidades reguladas pela respiração mitocondrial e é reduzido a NADP<sup>+</sup>, usando a NADP transhidrogenase (TH). Quando a produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  aumenta na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{P}_i$ , e/ou as vias de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  são inativadas. Ocorre acumulação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ , origina o radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) extremamente reactivo. O  $\text{HO}^{\cdot}$  oxida os grupos tiólicos (-SH) do complexo proteico MPT, conduzindo à abertura do poro. Alternativamente, o  $\text{HO}^{\cdot}$  pode também promover a permeabilização da membrana através da oxidação lipídica processo este fortemente induzido pelo  $\text{P}_i$ . (Adaptado de Vercesi *et al.*, 2001).

### 1.7- Mecanismos mitocondriais de morte celular

Nos últimos anos um número elevado de trabalhos tem demonstrado que a mitocôndria desempenha diferentes funções na morte e na vida da célula. De um modo geral, a permeabilização da membrana mitocondrial constitui o principal factor indicador de morte celular e precede o processo de morte celular por apoptose ou necrose. A permeabilização é dependente do estímulo indutor de morte da célula ou do tipo de célula. De facto, existe um número elevado de efectores pró-apoptóticos que actuam a nível da membrana mitocondrial induzindo a permeabilização da membrana e que, por sua vez, activam os compostos anti-apoptóticos da família Bcl-2 a interagir com proteínas da membrana mitocondrial evitando a sua permeabilização. Outro facto que reforça o envolvimento da mitocôndria na morte celular é a existência de intervenções farmacológicas específicas, isto é, através de compostos que actuam a nível das proteínas mitocondriais que evitam ou retardam a morte celular (Loeffler e Kroemer, 2000).

A *necrose* ou morte accidental pode ser desencadeada por um profundo dano celular ou por stresse, como acontece na isquémia (Lemasters, 1999). Ocorre um rápido colapso da homeostase interna sendo acompanhada de lise da membrana citoplasmática e das membranas internas com libertação de restos celulares para o espaço extracelular (Fig. 1.6), promovendo um processo inflamatório. É caracterizada morfologicamente pela formação de protuberâncias na membrana

plasmática seguida pela eventual ruptura de algumas delas e a consequente libertação de componentes citosólicos (Pedersen, 1999).

A *apoptose* é um tipo de morte celular programada e trata-se de um processo fisiológico essencial, necessário ao desenvolvimento normal e à manutenção da homeostase dos tecidos (Vaux e Korsmeyer, 1999). No entanto, a apoptose está também envolvida em diversos processos patológicos dos quais se destacam as doenças neurodegenerativas, doenças imunológicas e processos cancerígenos. Assim, após um sinal apoptótico as células sofrem uma série de alterações que culminam na sua morte, sem que ocorra a libertação dos seus conteúdos celulares (Pedersen, 1999). Este tipo de morte celular funcionará como uma espécie de triagem da população celular eliminando as células danificadas, mutadas, envelhecidas ou potencialmente perigosas, tendo também um papel importante na regulação de programas de crescimento e diferenciação celular e tecidual (Bishopic *et al.*, 2001; Ravagnan *et al.*, 2002). A apoptose é caracterizada por uma diminuição do volume da célula acompanhada da formação de protuberâncias na membrana plasmática, estas acabam por se desprender da membrana originando fragmentos membranares que são fagocitados pelas células vizinhas.

Outra das grandes diferenças entre a necrose e a apoptose reside a nível da bioenergética, verificando-se que em células necróticas os níveis de ATP baixam drasticamente e esta perda das reservas energéticas será a principal causa deste tipo de morte celular (Lemasters *et al.*, 1999). Contrariamente, as células em apoptose mantêm, parcialmente, as suas reservas de ATP, necessárias para o controlo dos mecanismos de apoptose, sendo um processo totalmente dependente de energia (Liu *et al.*, 1996). Deste modo, a mitocôndria é um elemento fundamental nos processos de morte celular por apoptose e/ou necrose e poderá determinar o tipo de morte celular.

### **1.7.1- A mitocôndria e a necrose**

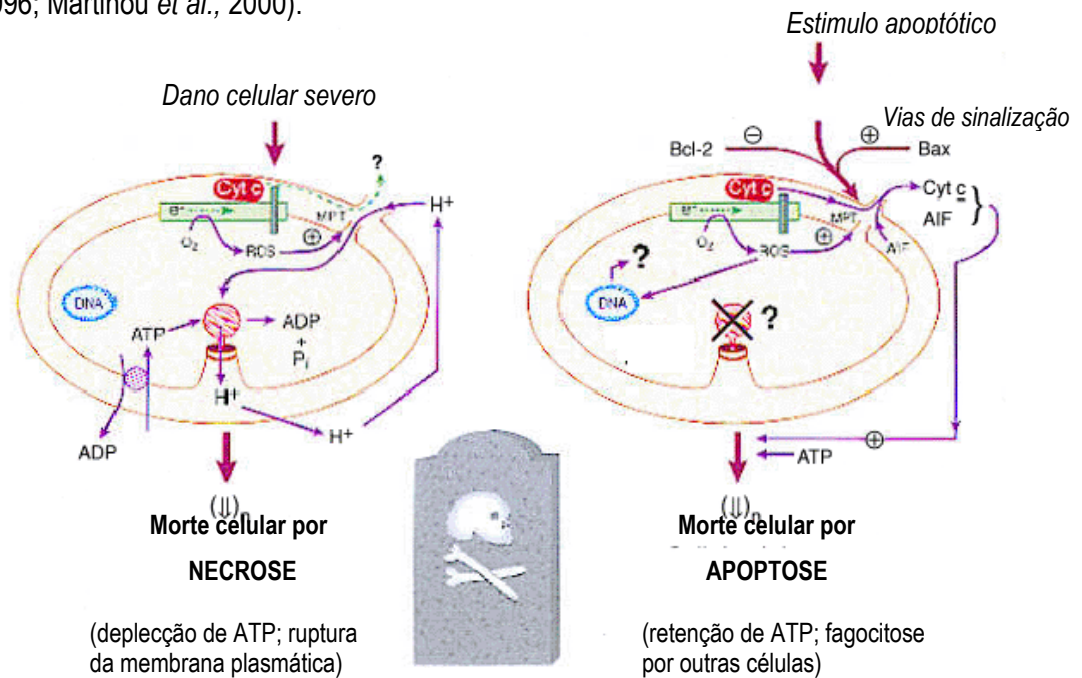
Durante este tipo de morte celular, as células, as mitocôndrias e outros organitos aumentam de volume, como consequência da perda da integridade física da membrana plasmática e mitocondrial, não sendo, no entanto, observadas quaisquer modificações nucleares no decorrer deste processo. (Desagher e Martinou, 2000). Como referimos, a mitocôndria é responsável pela maior parte da síntese de ATP através da fosforilação oxidativa, que usa a energia resultante da respiração mitocondrial. Assim, factores que alterem a associação do sistema fosforilativo com o sistema de transporte de electrões, constituem mecanismos responsáveis pela diminuição da

eficiência fosforilativa das mitocôndrias e conseqüentemente, por um abaixamento dos níveis de ATP necessários à viabilidade celular. Para além das alterações dos mecanismos quimiosmóticos responsáveis pela síntese mitocondrial de ATP estarem subjacentes à necrose celular, a indução da MPT constitui também uma causa deste tipo de morte celular. A MPT é acompanhada por um intumescimento e a mitocôndria perde a sua capacidade para manter estáveis o  $\Delta\Psi$  e o gradiente de prótons (isto é ocorre uma dissociação total ou parcial da fosforilação oxidativa). Ao ocorrer a permeabilização membranar passiva, não síntese de ATP e ocorre a hidrólise contínua do ATP pela ATPase o que promove o esgotamento das reservas energéticas celulares e conduz à morte celular por necrose (Fig. 1.6). Adicionalmente, há perturbação contínua dos equilíbrios iónicos, especialmente do  $\text{Ca}^{2+}$ , que exacerbará os danos devido à activação de enzimas degradativas como as fosfolipases, proteases e nucleases. A activação da MPT é facilitada na presença de oxidantes (Zoratti e Szabo 1995) e por sua vez a acumulação ROS facilita a MPT (Pedersen, 1999).

### 1.7.2- A mitocôndria e a apoptose

A mitocôndria tem um papel importante no controlo dos mecanismos de indução da apoptose (Lemasters *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 1998; Li e Yuan, 1999), sendo hoje aceite que em muitas células apoptóticas a libertação de proteínas do espaço intermembranar constitui um dos primeiros eventos da apoptose. Perante um estímulo apoptótico (danos no DNA, isquémia, radiações ultravioletas e o stress oxidativo) a mitocôndria é “desviada” do seu papel original, que é o da manutenção da vida celular, para um papel oposto, o de facilitar a morte celular (Fig. 1.6). Existem vários factores responsáveis por esta alteração, nomeadamente, o  $\text{Ca}^{2+}$ , a ceramida, o óxido nítrico (NO), as caspases (proteínas cisteínicas que actuam em resíduos de aspartato), as ROS e membros da família Bcl-2 (Susin *et al.*, 1998). O efeito final de muitos destes factores é a libertação de duas proteínas do espaço intermembranar, o citocromo c e o factor indutor de apoptose (AIF). Estas duas proteínas participam em eventos pós-mitocondriais necessários para completar o programa de morte celular. A forma como estes factores “forçam” a mitocôndria a participar no programa de morte celular ainda não é inteiramente claro, contudo a hipótese mais provável envolve a MPT. De acordo com numerosos dados experimentais são vários os factores que induzem a MPT, entre eles os membros da família das proteínas Bcl-2 (Reed *et al.*, 1997). A proteína Bcl-2 é um oncogene que tem um efeito inibitório da MPT, enquanto que a Bax pode formar complexos com a Bcl-2 anulando desta forma o efeito inibitório exercido por Bcl-2 na MPT e quando atinge determinadas concentrações, estimula a MPT (Korsmeyer *et al.*, 1999). A MPT é seguida da perda do  $\Delta\Psi$  (pelo menos temporariamente), intumescimento da mitocôndria e finalmente, ruptura

da membrana mitocondrial externa com libertação do citocromo c e do AIF. A proteína cuja libertação parece ser mais crítica para a iniciação dos processos de apoptóticos é o citocromo c (Liu *et al.*, 1996; Martinou *et al.*, 2000).



**Figura 1.6- Possíveis eventos mitocondriais que ocorrem durante a morte celular.** Na morte celular por necrose, ocorre depleção de ATP e há ruptura da membrana plasmática. Este tipo de morte celular é induzido por graves danos celulares. A outra via de morte celular é por apoptose, sendo os níveis de ATP da célula mantidos parcialmente. A apoptose é caracterizada por uma diminuição do volume da célula acompanhada da formação de protuberâncias da membrana plasmática. (Adaptado de Pedersen, 1999)

No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre a sua libertação da mitocôndria não se encontra ainda perfeitamente esclarecido, podendo ocorrer de um modo controlado através de poros na membrana externa ou por ruptura física desta membrana. De acordo com alguns autores (Petit *et al.*, 1998), a libertação de citocromo c é precedida por um intumescimento mitocondrial que conduz à ruptura da membrana externa. Mais recentemente, tem sido indicado que o citocromo c seja libertado da mitocôndria por mecanismos que preservam a integridade da membrana externa (Doran e Halestrap, 2000). O citocromo c na presença de ATP, forma um complexo com o apaf-1 e a procaspase 9. A formação deste complexo designado por apoptossoma cliva a procaspase 9 com libertação da caspase 9 activa que cliva e activa a procaspase 3. Por sua vez, a caspase 3 activa induz a clivagem proteolítica de uma série de proteínas alvo no citosol, núcleo e membrana plasmática responsáveis pela morfologia característica da apoptose (Li e Yuan, 1999; Parone *et al.*, 2002). A mitocôndria está também envolvida na indução da apoptose por mecanismos independentes das caspases. Durante este processo, ocorre libertação de AIF e endonuclease G do

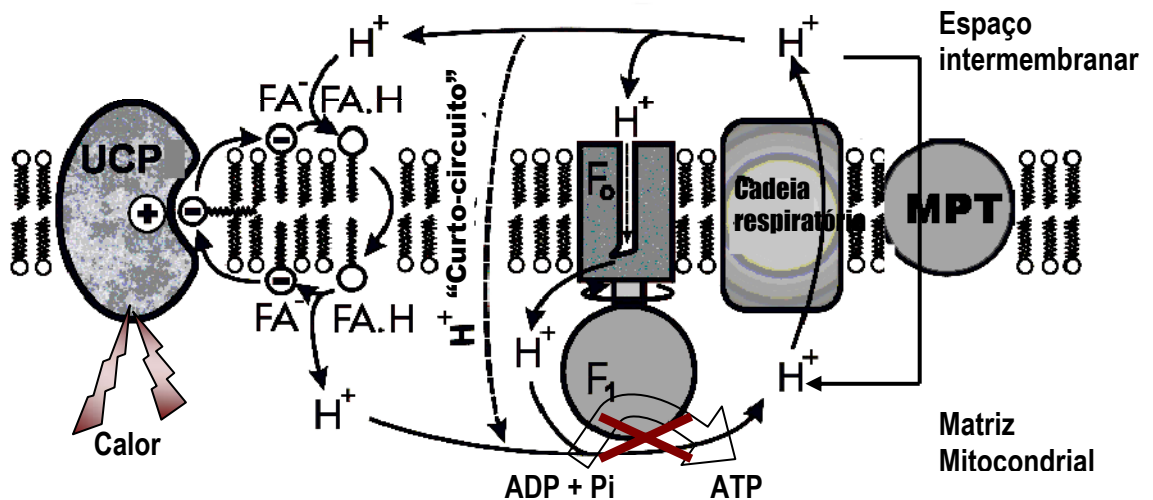
espaço intermembranar mitocondrial para o citosol, desencadeando este tipo de morte celular sem activar a cascata apoptótica. Durante a apoptose, o AIF desloca-se da membrana mitocondrial externa para o citosol e, posteriormente, para o núcleo onde induz condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Daugas *et al.*, 2000). Adicionalmente, o AIF induz a exposição da fosfatidilserina na monocamada externa (geralmente localizada na monocamada interna), facto que possibilita o reconhecimento e posterior remoção das células apoptóticas por células vizinhas (Susin *et al.*, 1999). Do mesmo modo, a endonuclease G, cuja função está implicada na replicação do DNA mitocondrial, induz a fragmentação do DNA nuclear após ser libertado do espaço intermembranar durante a apoptose.

### 1.8- Proteínas dissociadoras

Como foi demonstrado pela *teoria quimiosmótica* de Mitchell, a associação entre a respiração mitocondrial e a síntese de ATP é controlada por um gradiente de prótons gerado ao longo da cadeia respiratória e dissipado através da ATPsintase. De facto, esta associação entre reacções exotérmicas e endotérmicas nunca pode alcançar os 100% pelo que ocorre a libertação de energia sobe a forma de calor. A alteração ao nível da associação da respiração e do sistema de síntese de ATP modifica a produção de calor. Este mecanismo existe por exemplo em células especializadas na produção de calor como por exemplo os adipócitos (Pecqueur *et al.*, 2001) que apresentam um elevado número de mitocôndrias. Foi nestas mitocôndrias que pela primeira vez foi identificada um tipo de proteína dissociadora (UCP) tendo-se designado de UCP1 ou termogenina (Rousser. *et al.*, 2004). O papel fisiológico da UCP1 é regular a produção de calor dependente de ácidos gordos nas células do tecido adiposo castanho, desempenhando assim uma resposta fisiológica ao stresse provocado pelo frio (Nicholls e Locke, 1984; Enerback *et al.*, 1997). A acção da UCP1 permite que os ácidos gordos se comportem como protonóforos (Jezek e Garlid, 1998), na medida em que cataliza o movimento de *flip-flop* do ácido gordo protonado (Fig. 1.7). Nestas condições ocorre a dissipação do gradiente de prótons através da membrana interna e como tal a dissociação do transporte de electrões, do sistema de síntese de ATP com produção de calor. (Nicholls, 1977; Mattson e Liu 2003). Assim, as UCPs fazem o “*curto-circuito*” da força protomotriz conduzindo à perda de energia e à produção de calor (Raha e Robinson, 2001) (Fig. 1.7).

Na década de 90 foram identificados mais dois membros da família das proteínas dissociadoras, a UCP2 e a UCP3 (Boss *et al.*, 1997). A UCP2 é expressa em células de diferentes órgãos, encontrando-se no coração, rins, pulmões, placenta, linfócitos, tecido adiposo branco e neurónios no cérebro (Fleury *et al.*, 1997; Jezek e Garlid, 1998), enquanto que a UCP3 existe no

músculo-esquelético e no tecido adiposo castanho (Boss et al., 1997). Estes dois tipos de proteínas dissociadoras estão envolvidas no metabolismo dos ácidos gordos e nas respostas fisiológicas ao jejum pelo que têm sido alvo de um intenso estudo como potenciais alvos para o tratamento da obesidade (Pecqueur *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2001; Garvey, 2003). Mais recentemente, foram também identificados os genes da UCP4 e UCP5, estas duas proteínas dissociadoras apresentam poucos aminoácidos em comum com a UCP1 (30 a 40%) e são principalmente expressas no cérebro (Sanchis *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1999). Para além de desempenharem um papel crucial na regulação da produção celular de calor (Fig. 1.7) as UCPs regulam a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pela cadeia respiratória através da sua actividade dissociadora pelo que influenciam a produção de ROS pela mitocôndria. Dado o seu mecanismo de acção, as UCPs podem influenciar a homeostase do  $Ca^{2+}$  uma vez que diminuem o  $\Delta\Psi$  e a produção de ROS (Mattson e Liu, 2003). Em geral, a actividade das UCPs resulta no decréscimo da produção do  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  (Vidal-Puig *et al.*, 2000). Ao reduzirem a produção de ROS nas células sob stress, as UCPs desempenham um papel citoprotector (Mattson e Liu, 2003).



**Figura 1.7 – Modelo da dissipação do gradiente de prótons pelas proteínas dissociadoras (UCP) com consequente perda de energia e produção de calor.** A UCP cataliza o transporte em *flip flop* das cabeças polares aniônicas do ácido gordo (FA) do espaço intermembranar para a matriz. Esta acção da UCP permite aos ácidos gordos portarem-se como protonóferos cíclicos. O circuito dos ácidos gordos promovido pela UCP resulta no “curto-circuito” dos prótons gerados ao longo da cadeia respiratória o que conduz à perda de energia e à produção de calor (Adaptado de Jezek e Garlid, 1998)



### 1.9- As mitocôndrias como um alvo de toxicidade

A mitocôndria desempenha um papel fundamental na vida da célula e no desenvolvimento dos tecidos devido à sua importância no metabolismo energético e nos mecanismos de morte celular. As mitocôndrias são as principais fornecedoras de ATP e as reguladoras dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  celular. Deste modo, elas têm uma importância central na vida da célula, uma vez que a disfunção mitocondrial conduz à perda de ATP e da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , o que inevitavelmente conduz à destruição e morte da célula. Consequentemente, alterações nas características estruturais e funcionais das mitocôndrias constituem mecanismos de acção tóxica induzida por xenobióticos e consequente morte celular (Wallace e Starkov 2000).

As alterações nas funções mitocondriais contribuíram já para explicar os efeitos secundários tóxicos de vários compostos (Szewczyk e Wojtczak 2002; Wallace e Starkov, 2000), desde fármacos a toxinas, ou mesmo simples substâncias usadas no quotidiano. No grupo de compostos com actividade terapêutica, de salientar os fármacos anti-cancerígenos, como por exemplo o etopósido (Cutódio et al., 2002) a doxorubicina (Decaudin et al., 1997), que induzem apoptose nas células malignas através da indução da MPT ou afectando de outro modo a membrana mitocondrial. Outro citostático que também afecta as funções mitocondriais é a cisplatina. Este fármaco diminuiu a eficiência fosforilativa da mitocôndria e torna a membrana mitocondrial permeável a prótons, simultaneamente inibe a cadeia respiratória e induz a MPT, o que pode levar à libertação e activação dos factores apoptóticos retidos no espaço intermembranar, desencadeando a morte da célula por apoptose e necrose (Gomes, 2003). O tamoxifeno, um anti-estrogénio usado na terapêutica e prevenção do carcinoma da mama e o seu metabolito 4-hidroxitamoxifeno diminuem a eficiência fosforilativa da mitocôndria devido ao facto de tornarem a membrana mitocondrial permeável a prótons e inibem a MPT o que pode constituir um dos seus mecanismos de acção/toxicidade responsáveis pela sua acção anti-cancerígena (Cardoso, 2004). Outros exemplos de fármacos que têm como alvo de toxicidade a mitocôndria são o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno, ambos interagem negativamente com a capacidade de acumulação de cálcio em mitocôndrias isoladas (Al-Nasser, 1999; 2000). A mitocôndria é também afectada por várias toxinas (Wallace e Starkov, 2000), especialmente as que interagem com as funções respiratórias e de geração de ATP, como exemplo de toxinas de referir o pesticida 2,4-dinitrofenol, um agente protonóforo que dissocia a cadeia respiratória da síntese de ATP, pela indução de uma fuga (leak) a prótons ao longo da membrana mitocondrial interna para a matriz mitocondrial (Skulachev, 1998). A mitocôndria é também alvo da toxicidade de compostos presentes no nosso quotidiano como por exemplo a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), um composto presente no chá e café e que em elevadas

concentrações é cardiotoxic (Wink *et al.*, 1999; Sardão *et al.*, 2002). Foi demonstrado que o dano induzido pela cafeína inclui um efeito negativo na cadeia respiratória e diminuição da capacidade de acumulação de cálcio (Sardão *et al.*, 2002). A bioenergética mitocondrial é também afectada pelo etanol (Bayley *et al.* 1999; Pastorino *et al.*, 1999).

Devido ao facto de a mitocôndria constituir um importante alvo de toxicidade de vários compostos e de ter um papel primordial na célula, o estudo da interacção de vários xenobióticos ao nível mitocondrial é fundamental para clarificar os mecanismos de citotoxicidade. O estudo *in vitro* com mitocôndrias isoladas pode permitir obter uma ideia preliminar sobre a toxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e da 4-metiltioanfetamina (MTA), antes de avançar para estudos mais complexos *in vivo*. As funções mitocondriais como a actividade respiratória ou a geração de potencial de membrana são pontos facilmente mensuráveis e possibilitam a avaliação de efeitos tóxicos destes compostos. Por sua vez a avaliação da capacidade de acumulação de cálcio dependente ou não da indução de MPT é igualmente outro parâmetro mensurável e de extrema importância no estudo da toxicidade mediada por determinados xenobióticos. Assim, uma vez que as interferências com a bioenergética mitocondrial constituem processos de dano celular induzidos por xenobióticos, conduzindo à depleção de ATP e à morte celular é de grande interesse avaliar as perturbações induzidas pela MDMA e MTA. A identificação da mitocôndria como alvo primário ou secundário da acção destas drogas pode ajudar a entender melhor os seus mecanismos de acção.

## 2- Derivados anfetamínicos como drogas de abuso

### 2.1- Pastilhas de *Ecstasy*

O aparecimento das pastilhas de *ecstasy* constituiu uma importante novidade entre as drogas de abuso e o seu crescente consumo têm uma elevada repercussão na saúde pública e na sociedade. Trata-se de uma droga muito ligada a ambientes recreativos, com uma via de administração cómoda e aceitável, com um potencial de abuso e dependência menor que o de outras substâncias, pelo que esta droga é consumida por diferentes grupos sociais. A ideia inerente à *ecstasy* difere radicalmente das imagens de doença, marginalidade e delinquência associadas a outras drogas como a heroína. Tendo em conta o número de doses que se consomem por ano na Europa e EUA, a incidência de toxicidade grave e aguda associada à *ecstasy* pode considerar-se escassa até ao momento e a mortalidade associada é inferior à induzida por outras drogas ilegais. (McKenna, 2002). Estes dados podem transmitir aos consumidores a falsa ideia que a *ecstasy* é uma droga segura. No entanto, é importante considerar que a sua toxicidade não depende só das características farmacológicas da substância, mas também de atitudes do consumidor, nomeadamente, do seu estado físico e psicológico, frequência e ambiente de consumo, da mistura com outras drogas e de circunstâncias derivadas da sua ilegalidade, como dificuldade em determinar quantitativamente a dose e a presença de contaminantes. Segundo o observatório europeu da droga e toxicodependência (relatório anual de 2003), a seguir à *cannabis*, a droga mais consumida nos países da União Europeia é, normalmente a *ecstasy* ou as anfetaminas, com taxas de experiência ao longo da vida entre a população adulta que variam geralmente entre 0,5% e 5%. Todavia, o consumo destas substâncias ilícitas atinge valores mais elevados entre jovens adultos ou seja entre os 15 e os 34 anos. Um dos factores para que tal suceda poderá estar relacionado com o baixo preço e facilidade de obtenção. De acordo com o relatório de 2003, as anfetaminas são vendidas em média, ao preço de 12 a 40 euros por grama, enquanto o preço dos comprimidos de *ecstasy* varia entre 6 e 20 euros em média. Por outro lado, os contaminantes presentes poderão baixar também o seu custo. A maioria dos comprimidos vendidos como *ecstasy* contém, de facto metilendioximetanfetamina (MDMA- *ecstasy*), tendo sido encontrados frequentemente outras substâncias psicoactivas, nomeadamente, 3,4-metilendioxi-N-etilamfetamina (MDEA), a 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), a 4-metiltioanfetamina (4-MTA) e a para-metoxianfetamina (PMA) entre outras.

## 2.2-História e química da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)

A MDMA foi sintetizada pela primeira vez em 1912 (Milroy, 1999; Rochester, 1999) por químicos alemães e patenteada em 1914 pelo laboratório Merck, na Alemanha, como anorexígeno e moderador do apetite. A MDMA foi testada inicialmente, mas foi pouco utilizada e nunca comercializada devido aos seus efeitos colaterais. Foi utilizada pelos soldados durante a 1ª guerra mundial com a finalidade de aumentar os tempos de permanência no campo de batalha através da supressão da sensação de apetite (Schuckit, 1994), ficando depois esquecida e sem uso por décadas. Em 1965, o bioquímico norte-americano Alexander Shulgin relatou ter sintetizado e consumido MDMA no seu laboratório, tendo descrito o efeito como agradável. Contudo, o bioquímico só voltou a interessar-se pela droga no início dos anos 70, quando tomou conhecimento de relatos de outros pesquisadores muito entusiasmados com o uso terapêutico da MDMA (Schwartz, 1997). A comunidade científica só veio a ser formalmente informada sobre a MDMA em 1978, através de uma publicação de Shulgin e Nichols, a qual sugere que a droga poderia ser utilizada como auxiliar psicoterapêutico (Laranjeira, 1996) na medida em que aumentava a empatia e confiança no terapeuta e a autoconfiança, convidando à auto-análise e favorecendo a introspecção (Grinspoon, 1986).

Paralelamente, a MDMA, já então conhecida com o nome comercial de *ecstasy* foi popularizada progressivamente e passou a estar associada a movimentos culturais enquanto droga recreativa. No início dos anos 80 a MDMA tornou-se popular entre os círculos alternativos e universitários (Peroutka, 1987). A popularização do uso de MDMA, o alerta pelos média e a publicação de um artigo sobre o potencial neurotóxico do seu análogo MDA encerrou a fase legal de uso da *ecstasy* e em 1985 a agência de controlo de drogas dos Estados Unidos (DEA) ilegalizou a MDMA enquadrando-a na categoria 1 de substâncias controladas, que inclui substâncias com alto potencial de abuso, sem benefício terapêutico/médico e cujo uso é inseguro mesmo sob supervisão médica (McClain *et al.*, 1989). Devido à sua ilegalidade nem todas as pastilhas vendidas e consumidas como *ecstasy* contém necessariamente a MDMA e assim, os consumidores não sabem exactamente o que estão a ingerir.

A MDMA e substâncias análogas às quais se fará referência ao longo deste trabalho são feniletilaminas, cuja estrutura consiste num grupo fenil ao qual está ligado um grupo radical etil (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) e uma amina (-NH<sub>2</sub>-). A partir desta molécula e modificando os radicais obtêm-se diferentes compostos com distintas propriedades psicoactivas. A MDMA é sintetizada em laboratório a partir de metanfetamina diferindo desta por ter um grupo metilenodioxi (O-CH<sub>2</sub>-O) ligado à posição 3 e 4 do anel aromático, neste aspecto faz lembrar a estrutura da mescalina um alucinógeno (Fig.

1.8). Porém, há precursores químicos naturais contidos em óleo de plantas, como a noz-moscada, açafraão, canela e sementes da salsa (Elk, 1996). A sua estrutura química é muito parecida com as anfetaminas e com a mescalina, sendo os seus efeitos uma mistura dos efeitos estimulantes das anfetaminas e alucinogénicos da mescalina.

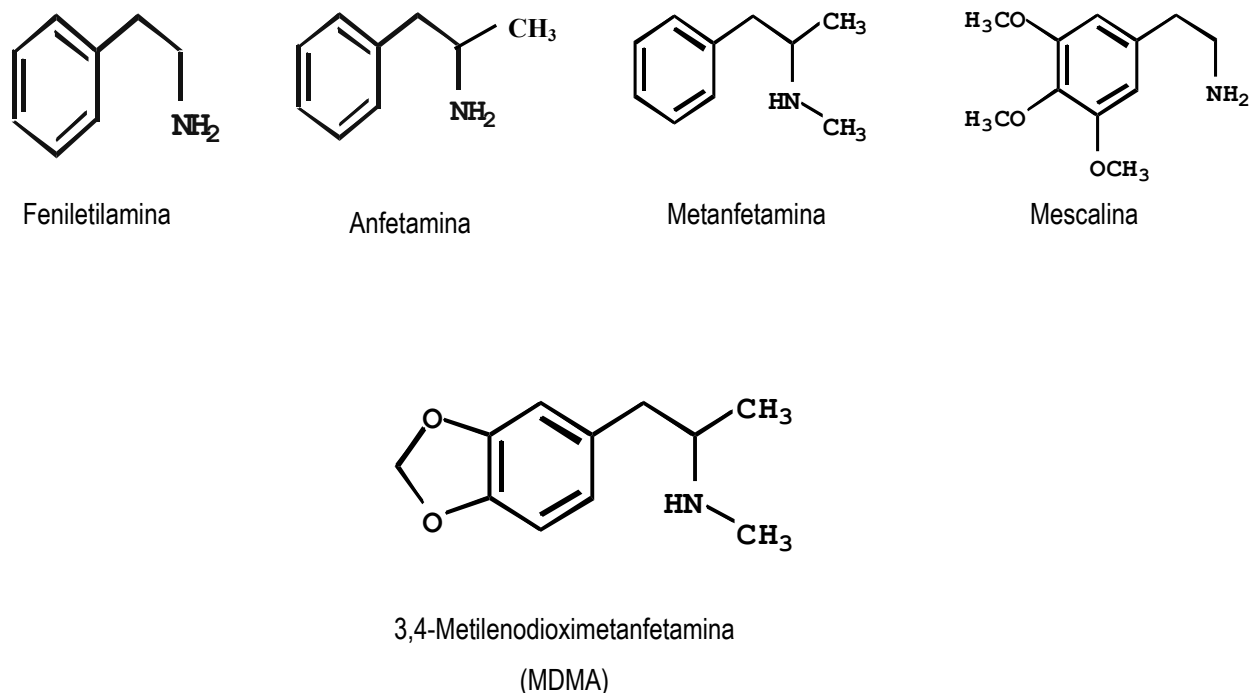


Figura 1.8 – Estruturas químicas da feniletilamina, anfetamina, metamfetamina, mescalina e metilenodioximetanfetamina (MDMA).

### 2.3- A 4-metiltioanfetamina (*Flatliner* -MTA) como um contaminante *da ecstasy*

À semelhança de outras drogas clandestinas, são várias as substâncias contaminantes encontradas nas pastilhas de *ecstasy* como, por exemplo, as anfetaminas, MDA, MDEA, PMA, a efedrina, a cafeína, a ketamina, o dextrometorfano e o paracetamol (Bagoott et al., 2000; Milroy et al., 1996; O'Connell e Heffron 2000). Por sua vez, a mistura que os consumidores fazem com outras drogas, nomeadamente outros estimulantes, opiáceos e álcool é preocupante. De entre os diferentes contaminantes destaca-se a 4-metiltioanfetamina (MTA) um derivado anfetamínico recentemente introduzido no mercado e potencialmente tóxico, e também comercializado sob a designação de *ecstasy* e de *flatliner* (Adam et al., 2002, Poortman e Lock, 1999). A MTA é uma análoga sulfúrica da anfetamina, com um grupo tiol (-SCH<sub>3</sub>-) ligado à posição 4 do anel aromático

da molécula de anfetamina) com propriedades psicoactivas (Fig. 1.9). A MTA foi inicialmente sintetizada em 1992 como antidepressivo e potencial substituto do Prozac<sup>®</sup> (Huang et al., 1992) embora nunca tenha sido comercializada. Foi utilizada em estudos farmacológicos em animais (Scorza *et al.*, 1999; Gobbi, *et al.*, 2002) e tem sido usada como droga de abuso sob a forma de pastilhas. A MTA foi pela primeira vez detectada e apreendida na Europa em 1997 (Groombridge, 1998) sendo referida como a causa de várias mortes e responsável por intoxicações graves (Centro Europeu de monitorização para as drogas e toxicoddependência [EMCDDA] 1999; De Letter et al., 2001), pelo que em 2001 a Organização Mundial de Saúde recomendou o controlo internacional da MTA.

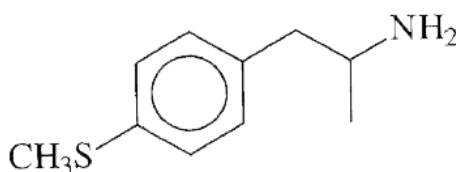


Figura 1.9 – Estrutura química da 4-metilitionfetamina (MTA; *Flatliner*)

#### 2.4- Farmacocinética da MDMA e MTA

A *ecstasy* é apresentada usualmente sob a forma de pastilhas com diferentes formas e cores contendo numa das faces desenhos alusivos (Fig. 1.10) ao nome pelo qual são conhecidos e na outra uma linha de quebra para meias-doses. Actualmente, estão identificados e descritos mais de 500 espécies diferentes de pastilhas. O consumo faz-se quase sempre por via oral e salvo raríssimas excepções, por via endovenosa, aspiração nasal (*snifado*) ou administração anal, na forma de supositório, sendo a dose habitual por pastilha entre 75 e 150 mg. A MDMA é absorvida no tracto gastrointestinal e alcança a sua concentração máxima no plasma duas horas depois da ingestão (Mas *et al.*, 1999). As doses de 50 mg, 75 mg e 125 mg em humanos voluntários saudáveis originaram picos de concentração sanguínea de cerca de 106 ng/ml, 131 ng/ml e 236 ng/ml respectivamente. Estas concentrações sanguíneas são relativamente baixas quando comparadas às tecidulares, uma vez que a MDMA passa facilmente para os tecidos e grande parte liga-se aos constituintes celulares. Os efeitos da MDMA fazem-se sentir aproximadamente 20 a 60 minutos após a ingestão do comprimido e prolongam-se durante 4-6 horas (De la Torre *et al.*, 2000a). A MDMA é metabolizada a nível hepático, fundamentalmente através da enzima isomerase CYP2D6 do citocromo p-450 e a sua eliminação é feita por via renal. Contudo, existem várias enzimas implicadas na sua degradação e algumas delas inibidas em concentrações relativamente baixas de MDMA. Assim, ao aumentar a dose e ocorrendo inibição das enzimas de menor afinidade

podem verificar-se aumentos significativos da concentração da droga no sangue (De la Torre et al., 2000b). A vida média da MDMA é de 8 h (Mas et al., 1999), o que implica serem necessárias 5 vidas médias, isto é, cerca de 40 horas para eliminar 95% do composto da corrente sanguínea, explicando alguns dos efeitos residuais e o seu prolongamento em um ou dois dias após o consumo da MDMA.



**Figura 1.10 – Pastilhas de ecstasy** – 11x9 tipos pastilhas com diferentes formas e cores contendo numa das faces desenhos alusivos ao nome pelo qual são conhecidos e na outra uma linha de quebra para meias-doses (Adaptado de Errowig.org 2000).

Na figura 1.11 é apresentada uma possível via metabólica para a MDMA, que envolve a formação de metabolitos hepatotóxicos. A MDMA sofre N-desmetilação originando a 3,4-metilenoamfetamina (MDA). A MDMA e a MDA ao serem *o*-desmetiladas formam-se a N-metil- $\alpha$ -metildopamina (N-Me- $\alpha$ -MeDa) e  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDa), respectivamente, sendo ambos catecóis que podem sofrer oxidação e originar as correspondentes *o*-quinonas. As quinonas são compostos electrofílicos pelo que podem provocar o dano celular através da alquilação de proteínas e do DNA. Por serem moléculas redox muito activas, as quinonas podem originar radicais semiquinónicos e levar à formação de ROS, podendo também sofrer oxidação e formar aminocromas. A formação de *o*-quinonas pode provocar a deplecção de GSH devido à formação de aductos glutatiónicos (Carvalho *et al.*, 2004 a) e, conseqüentemente, aumentar os mecanismos de stresse oxidativo.

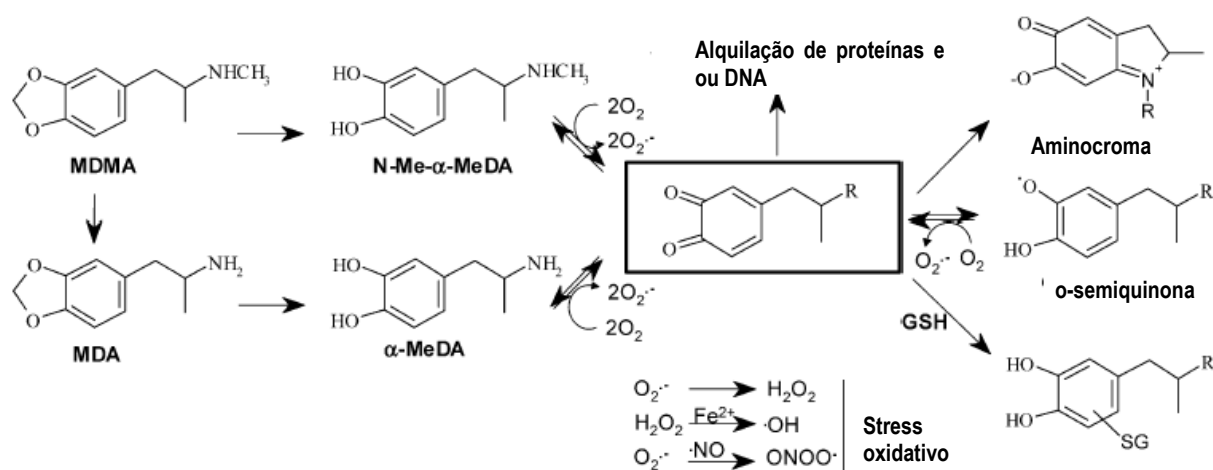


Figura 1.11 – Metabolismo proposto para a MDMA (Adaptado de Carvalho et al., 2004).

As pastilhas de MTA, também conhecidas como *flatliner*, assemelham-se às de *ecstasy*, apresentando uma linha de quebra e um odor pouco usual, contendo em média 100-140 mg de MTA e uma pequena percentagem de impurezas. O consumo é feito maioritariamente pela via oral e como a MTA têm um início de acção tardio leva frequentemente, os consumidores a tomarem mais pastilhas para obter os efeitos desejados (EMCDDA, 1999), resultando em overdoses acidentais. Com base nas fatalidades envolvendo a MTA, tem sido sugerido que uma toxicidade moderada possa estar associada a concentrações sanguíneas entre 0,20 e 0,60 µg/ml, uma toxicidade severa para concentrações superiores a 0,60 µg/ml e casos de morte quando as concentrações ultrapassam 1,50 µg/ml (Elliot, 2001). Em amostras recolhidas dois dias após a autópsia de um caso fatal de intoxicação com MTA (Decaestecker et al., 2001) detectaram-se níveis de MTA no fígado e bÍlis, aproximadamente, 6 a 7 vezes superiores aos encontrados no sangue periférico e no tecido cardíaco a ordem de superioridade foi cerca de 3,5 vezes. A MTA é fracamente metabolizada e o principal metabolito identificado em hepatócitos humanos, cão, coelho e ratinhos foi o ácido 4-metilbenzóico, (Fig. 1.12) não sendo, no entanto, encontrado em hepatócitos de rato (Carmo et al., 2004).

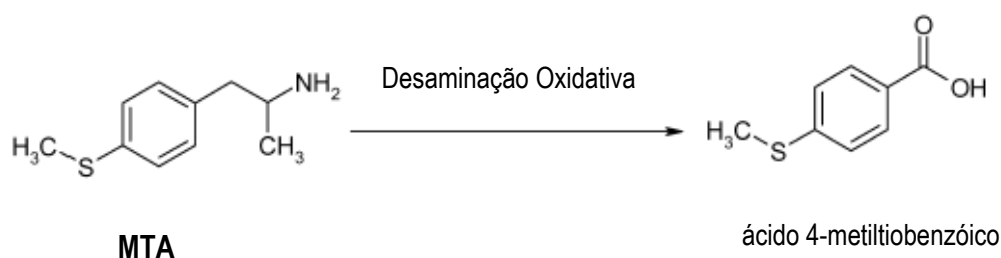


Figura 1.12 – Formação do principal metabolito da MTA o ácido 4-metilbenzóico por desaminação oxidativa.



## 2.5- Farmacodinâmica da MDMA e MTA

Diferentes estudos têm demonstrado que a MDMA actua sobre o sistema serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico, sendo o sistema serotoninérgico referido como o principal alvo de neurotoxicidade desta droga. No entanto, a administração de MDMA liberta preferencialmente serotonina, tanto *in vivo* como *in vitro* (Green *et al.*, 2003). A MDMA promove a libertação de serotonina por permuta com esta droga, a nível do seu transportador membranar, segundo um processo designado como difusão por permuta. Em consequência do transporte de MDMA para o interior do neurónio pelo sistema de captação neuronal, o transportador fica disponível na superfície interna da membrana para se ligar à serotonina livre e transportá-la para o espaço sináptico (Huether *et al.*, 1997). Por outro lado, a MDMA inibe a actividade da triptofano hidroxilase, enzima necessária à síntese de serotonina (Che *et al.* 1995). Como o descrito para outras anfetaminas análogas, a MDMA inibe a monoamina oxidase (MAO), enzima responsável pelo metabolismo da serotonina e dopamina no terminal nervoso, contribuindo assim para um aumento destes neurotransmissores (Leonardi e Azmitia 1994). A afinidade de MDMA para o local de captação serotoninérgico é cerca de 40 vezes superior à sua afinidade para o local de captação dopaminérgico (Schmidt, 1994) e provoca indução de libertação de noradrenalina com potência semelhante à de serotonina (Rothman *et al.*, 2001). Têm sido também referido que a MDMA induz a libertação de acetilcolina (Fischer *et al.*, 2000), embora o aumento dos níveis de serotonina e de dopamina constituam o principal mecanismo responsável pelos diferentes efeitos ao nível do foro psicológico, enquanto que o aumento da libertação de noradrenalina será o responsável pelos efeitos físicos. A MDMA induz ainda a libertação de cortisol, prolactina (Mas *et al.*, 1999), corticotropina (Grob *et al.*, 1996) e vasopressina (Henry *et al.*, 1998). A MDMA induz igualmente alterações no sistema imunológico provavelmente relacionados com a libertação de corticoesteróides e do seu efeito simpaticomimético. Por sua vez, o consumo de álcool associado à MDMA aumenta a duração das alterações no sistema imunitário (Pacifici *et al.*, 2001). De salientar que a MDMA induz tolerância farmacológica, de forma que muitos consumidores ingerem doses cada vez maiores para tentar obter os efeitos iniciais (Ochoa Mangado, 2002).

Os efeitos estimulantes induzidos pela MTA – *flatliner* são devidos ao aumento da libertação de serotonina, inibição da recaptção de serotonina dos terminais nervosos (Huang *et al.*, 1992) e também devido à inibição da MAO A (Scorza *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1996). Contudo, a MTA parece ser menos selectiva para o sistema noradrenérgico e dopaminérgico, pois apresenta uma menor afinidade para os receptores dessas duas monoaminas (Li *et al.*, 1996). A combinação das múltiplas acções da MTA no sistema serotoninérgico será a responsável pela indução do síndrome

serotoninérgico observado em ratos tratados com esta droga (Huang et al., 1992; Lane e Baldwin, 1997).

## **2.6- Toxicidade da MDMA e MTA**

### **2.6.1- Efeitos físicos, psicológicos e adversos da MDMA e MTA**

Os efeitos provocados pela MDMA variam de acordo com a dose, frequência e período de utilização. Geralmente os efeitos desejados pela maior parte dos utilizadores são os induzidos por baixas doses quando a droga é consumida esporadicamente. Nestas condições, o seu uso produz aumento da auto-estima, empatia, sensação de proximidade e intimidade com as pessoas em redor, melhorando a comunicação e a relação com as pessoas. Os consumidores sentem um aumento da energia emocional e física, manifestando estados de elevada euforia. (Cohen *et al.*, 1995). No entanto, em simultâneo ocorrem efeitos indesejáveis, tais como o aumento da tensão arterial e da frequência cardíaca acompanhada de midriase, observa-se tensão muscular, contractura mandibular, batimento de dentes e movimentos involuntários das pernas, apresentando um quadro típico de inquietude geral (Vollenweider *et al.*, 1998). O aumento da actividade muscular juntamente com o efeito da MDMA no sistema termoregulador leva a um aumento da temperatura corporal. A sensação de boca seca a perda de apetite e náuseas são também outros sintomas comuns durante e após o seu consumo. Nos 2-3 dias posteriores ao consumo de *ecstasy* é frequente os consumidores sentirem rigidez e dor muscular. Do ponto de vista psicológico, durante o período em que os consumidores estão sob efeito da droga podem surgir halucinações, sensação de separação do próprio corpo (despersonalização), comportamentos bizarros, ansiedade e agitação generalizada (Mørland, 2000). Ocasionalmente podem ocorrer ataques de pânico, delírios e mesmo episódios psicóticos (McCann *et al.*, 1996). Nos dias seguintes, os sintomas mais frequentes são a falta de concentração, a ansiedade/depressão e sensação de cansaço. No entanto, a maioria dos consumidores considera um balanço positivo da experiência, mas com a frequente repetição da experiência os efeitos negativos tendem a ser mais proeminentes que os considerados efeitos agradáveis.

Apesar de os efeitos específicos da MTA-*flatliner* em humanos não estarem extensivamente estudados, a OMS refere que os efeitos incluem euforia, aumento de energia durante um maior período de tempo e halucinações moderadas. Os consumidores apresentam sintomas do tipo simpaticomimético, como a taquicardia, os tremores, as dores de estômago e cabeça, bem como sudorese generalizada (Elliot, 2000; Decaestecker *et al.*, 2001).

### 2.6.2-Hepatotoxicidade

A hepatotoxicidade associada ao consumo de pastilhas de *ecstasy* varia desde alterações analíticas assintomáticas até casos de insuficiência hepática fulminante. A hepatotoxicidade pode surgir após ingestão de um só comprimido (Henry *et al.*, 1992; Dykhuizen *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1996) e em outros casos ocorre após o consumo regular de *ecstasy* durante meses (Andreu, *et al.*, 1998). As concentrações de MDMA encontradas em consumidores autopsiados é consideravelmente superior (cerca de 7.2 vezes maior) à encontrada na corrente sanguínea (Rohrig e Prouty, 1992). Na forma mais habitual de hepatotoxicidade, o quadro assemelha-se a uma hepatite viral com icterícia, hepatomegália, elevação das enzimas hepáticas e alterações da coagulação. Este quadro pode resolver-se em semanas ou meses de forma espontânea, mas ocorrem também alguns casos de fibrose hepática e insuficiência hepática aguda (Khakoo *et al.*, 1995) sendo necessário o transplante hepático. Diferentes factores contribuem para a hepatotoxicidade, nomeadamente, o metabolismo da MDMA, o aumento dos níveis de neurotransmissores e a hipertermia. Na fisiopatologia da hepatotoxicidade foram implicados os mecanismos de depleção do glutatião intracelular que actua como antioxidante e mecanismos do tipo imunitário e deficitário enzimático (Jones e Simpson., 1999). Uma outra possível explicação para os danos hepáticos é a metabolização da MDMA que leva à depleção do glutatião e a um decréscimo significativo da actividade da catalase (Beitia *et al.*, 2000; Varela-rey *et al.*, 1999), principalmente quando o consumo da MDMA é feito em ambientes com temperatura elevada (Carvalho *et al.*, 2002). Em simultâneo, a MDMA provoca o aumento da temperatura corporal e, nestas condições, o fígado ao estar desprovido das suas principais defesas contra o stresse oxidativo permite uma acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a níveis tóxicos. Por outro lado, as mitocôndrias hepáticas estão também mais vulneráveis ao stresse oxidativo uma vez que não possuem a catalase (Carvalho *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2002). Adicionalmente, outros estudos demonstram que a toxicidade hepática pode resultar de um moderado decréscimo de níveis de ATP (Beitia *et al.*, 2000) e de um aumento dos níveis do cálcio intracelular, como resultado do aumento da entrada de cálcio para a célula e sua libertação a partir dos reservatórios intracelulares (Beitia *et al.*, 1999). A apoptose dos hepatócitos pode também estar envolvida na hepatotoxicidade da MDMA uma vez que elevadas concentrações de MDMA induziram apoptose em hepatócitos de rato (Montiel-Duarte *et al.*, 2002) e de acordo com um estudo recente realizado pelos mesmos autores (Montiel-Duarte *et al.*, 2004) a apoptose induzida pela MDMA é acompanhada mas não causada pelo stresse oxidativo, sugerindo um mecanismo apoptótico independente do stresse oxidativo. Outra constatação importante deste estudo foi a potenciação da apoptose induzida por MDMA devido à

adição de GSH ou N-acetilcisteína. Além do mais o tratamento das células com quinina, um inibidor do citocromo P450 2D6 diminuiu a extensão da apoptose induzida pela MDMA. Os resultados deste estudo sugerem que um metabolito da MDMA, possivelmente após conjugação com a GSH, possa contribuir para a apoptose induzida por esta droga. Segundo Carvalho e colaboradores (2004) do metabolismo da MDMA resultam dois compostos reactivos a  $\alpha$ -MeDA e a N-Me- $\alpha$ -MeDa. A  $\alpha$ -MeDA induz hepatotoxicidade caracterizada pela depleção de glutatião, diminuição da actividade das enzimas antioxidantes e morte celular. Adicionalmente, a administração de antioxidantes como o ácido ascórbico e N-acetilcisteína previne a hepatotoxicidade sugerindo que o stresse oxidativo parece desempenhar um papel fundamental na toxicidade induzida pela N-Me- $\alpha$ -MeDa (Carvalho et al., 2004 b). Em consumidores de MTA – *flatliner* estão também descritos casos de descompensação hepática grave (EMCDDA 1999), embora os mecanismos responsáveis por esses efeitos continuem por esclarecer.

### 2.6.3- Cardiotoxicidade

Os consumidores de *ecstasy* apresentam vários efeitos adversos a nível cardiovascular, incluindo crises hipertensivas e arritmias. A hipertensão induzida pela *ecstasy* parece estar relacionada com disfunções em diferentes órgãos, nomeadamente a falha renal (Woodrow et al., 1995), as perfurações gástricas (Williams et al., 1998), a hemorragia da retina e a hemorragia cerebral (Selmi et al., 1995). Em autopsias de consumidores de *ecstasy* observou-se necrose dos cardiomiócitos quer localizada quer geral (Milroy et al., 1996) e hipertrofia do miocárdio (Patel et al., 2005). A repetição de doses de MDMA produz um aumento de alterações em mitocôndrias, observando-se a matriz mitocondrial menos densa e alterações estruturais das cristas, sendo que estas alterações são mais significativas quando a MDMA é administrada a ratinhos expostos a um ambiente mais ruidoso, no sentido de mimetizar as condições ambientais em que é feito o consumo da *ecstasy* (Gesi et al., 2002a; Gesi et al., 2002b). A administração continua de MDMA, pode alterar significativamente a função cardiovascular, observando-se um aumento de arritmias e problemas inflamatórios nos cardiomiócitos (Bandon et al., 2002). Num estudo recente realizado em cardiomiócitos isolados de rato (Carvalho et al., 2004) verificou-se que os metabolitos da MDMA, a N-Me- $\alpha$ -MeDa e a  $\alpha$ -MeDa, provocam hipercontractura das células caracterizada por uma perda da morfologia habitual em bastonete dos miócitos funcionais, ao contrário do que sucedeu com a exposição directa à MDMA, sugerindo que a metabolização da MDMA é necessária para a observação de cardiotoxicidade *in vitro* induzida pela MDMA. De salientar que as alterações na morfologia dos cardiomiócitos foi precedida pela perda da homeostase do GSH devido à conjugação

de GSH com a N-Me- $\alpha$ -MeDa e a  $\alpha$ -MeDa, por um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, sendo também observada a depleção de ATP e diminuição de actividade das enzimas antioxidantes.

Em relação à cardiotoxicidade mediada pela MTA-*flatliner* os únicos dados disponíveis são a diminuição do batimento cardíaco em ratos quando lhes foi administrado MTA (Li et al., 1996). Segundo a EMCDDA (EMCDDA 1999), pensa-se que a MTA poderá exercer uma primeira acção na vasculatura periférica que será seguida de acção central.

#### 2.6.4- Hipertermia

A hipertermia é um dos efeitos mais frequentes associados ao consumo de MDMA (Henry et al., 1992; Murphy et al., 1997; Walubo e Seger, 1999) podendo os consumidores chegar a temperaturas corporais de 42°C. Para prevenir o risco amplamente divulgado de desidratação, os consumidores costumam beber grandes quantidades de água. Em caso de hipertermia, o tratamento é sintomático e consiste num rápido arrefecimento do corpo, na infusão intravenosa de soluções salinas e na lavagem do estômago. Apesar do seu uso ser questionado, o dantroleno tem sido usado na clínica para combater as contracções musculares intensas associadas à hipertermia. A razão pela qual a MDMA afecta a termorregulação corporal não é clara, mas parece estar relacionada com o aumento de libertação de serotonina (Shankaran e Gudelsky, 1999) e de dopamina (Mechan et al. 2002). O exercício físico intenso em ambiente quente e a falta de hidratação aumentam consideravelmente o risco de hipertermia da *ecstasy*. A hipertermia pode causar desidratação, diminuição das proteínas musculares, rabdomiólise, coagulação intravascular disseminada, convulsões e morte. A hipertermia *per se* é uma condição pró-oxidante extremamente agressiva e pode levar ao dano hepatocelular *in vitro* (Carvalho et al., 1997). Estudos realizados por Mills e colaboradores (2003) demonstraram que ratos deficientes na proteína mitocondrial dissociadora 3 (UCP-3) têm uma resposta termogénica diminuída à MDMA pelo que estão mais protegidos contra a hipertermia, sugerindo que a UCP-3 é um mediador da resposta termogénica pois ao provocar a dissociação da mitocôndria leva à dissipação da energia gerada pelo metabolismo sob a forma de calor. Esta dissipação de energia pode também ser provocada por compostos que actuem directamente na mitocôndria dissociando a cadeia respiratória do sistema fosforilativo (Ruszniak, 2004). A hipertermia é igualmente sentida pelos consumidores de A MTA – *flatliner*. A hipertermia induzida pela MTA é altamente influenciada pela activação dos receptores catecolaminérgicos e serotoninérgicos e também devido à inibição da MAO-A envolvida na catabolização das monoaminas (Carmo, et al., 2003).

### 3– Objectivos e plano geral da tese

O consumo de pastilhas de *ecstasy* é considerado pelos consumidores como inócuo, apesar das inúmeras descrições de mortes relacionadas com a sua ingestão e do aparecimento a curto e a médio prazo, de distúrbios psíquicos e neuropsiquiátricos, hipertermia, falência hepática e renal aguda, rabdomiólise, hiponatremia e complicações cardiovasculares. Contudo, à semelhança de outras drogas clandestinas, muitos destes efeitos tóxicos podem dever-se a diferentes contaminantes presentes nas pastilhas de *ecstasy*. De entre os diferentes contaminantes destaca-se a 4-metiltoanfetamina (MTA), um derivado anfetamínico recentemente introduzido no mercado e potencialmente tóxico, comercializado sob a designação de *ecstasy* e de *flatliner*.

No entanto, muito pouco se sabe acerca dos mecanismos responsáveis pela hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e pela hipertermia, uma complicação frequentemente observada em jovens após o consumo das pastilhas de *ecstasy*. A toxicidade hepática pode resultar de um moderado decréscimo de níveis de ATP e de um aumento dos níveis do cálcio intracelular. Uma outra possível explicação para os danos hepáticos é a metabolização da MDMA que leva à depleção do glutationa e a um decréscimo significativo da actividade da catalase, pelo que as mitocôndrias hepáticas ficam mais vulneráveis ao stresse oxidativo uma vez que não possuem a catalase. Em relação à cardiotoxicidade foi demonstrado que, a repetição de doses de MDMA produz um aumento de alterações no número de mitocôndrias, observando-se a matriz mitocondrial menos densa e alterações estruturais das cristas e um aumento de arritmias e problemas inflamatórios nos cardiomiócitos. A termorregulação corporal é também afectada pelo consumo de pastilhas de *ecstasy* e pode ser devida à acção directa da MDMA e da MTA na mitocôndria, dissociando a cadeia respiratória do sistema fosforilativo originando a dissipação de energia sob a forma de calor.

Assim, a mitocôndria pela sua actividade multifacetada fundamental à viabilidade celular poderá ser um alvo primário da toxicidade celular da MDMA e da MTA, pelo que o objectivo deste trabalho foi estudar a potencial indução de disfunções mitocondriais por estes dois derivados anfetamínicos, nomeadamente por alterações nas funções bioenergéticas e na permeabilidade transitória mitocondrial no sentido de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de cardiotoxicidade e hepatotoxicidade. Estes estudos foram iniciados com a avaliação dos efeitos da MDMA e da MTA na bioenergética mitocondrial. Assim, foram avaliados os efeitos da MDMA e da MTA na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa, através da determinação do consumo de

oxigénio e eficiência fosforilativa. Este estudo foi ainda complementado com a avaliação dos efeitos da MDMA e da MTA na integridade membranar através da análise de alterações na integridade membranar das mitocôndrias. Devido à relevância da MPT na participação dos processos de morte celular, regulação dos níveis de cálcio intracelular e na defesa da célula, estudámos a acção destas duas drogas na MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Pi}$ , avaliando para isso vários parâmetros que permitem caracterizar a indução de MPT, como o intumescimento mitocondrial, o potencial de membrana, os fluxos de cálcio, a dissociação da cadeia respiratória consumo de NAD(P)H. No sentido de tentar esclarecer os mecanismos responsáveis pelos efeitos da MDMA e MTA na inibição da MPT, os efeitos destas drogas foram também estudados na MPT induzida com um prooxidante, o hidroperóxido de *tert*-butilo ( *t*-BuOOH), na presença de cálcio.

---

## **II – MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1- Reagentes

Albumina sérica bovina (BSA), ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanossulfônico (Hepes), ciclosporina A (CyA), o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido 3-(N-Morfolino)propano-sulfônico (Mops), o hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BuOOH), a oligomicina e a protease tipo VIII foram obtidos na Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO). Tetrafenilfosfônio (TPP<sup>+</sup>), Tris-hidroximetil-aminoetano (Tris), o dodecilsulfato de sódio (SDS), o ácido etileno-glicol-tetraacético (EGTA) e a sacarose foram comprados à Merck (Darmstadt, Alemanha). A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) a 4-metiltioanfetamina (MTA) e os restantes químicos de elevado grau de pureza, foram obtidos pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia.

### 2- Preparação das suspensões mitocondriais

#### 2.1- Isolamento das mitocôndrias de coração

O isolamento de mitocôndrias cardíacas foi realizado por um processo de centrifugação diferencial (Fig. 2.1) como descrito por Darley-USmar e colaboradores (1987), com algumas alterações. O meio de homogeneização continha 250 mM sacarose, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, pH 7,4 e BSA a 0,1%. No meio de lavagem omitiu-se o EGTA e a BSA. Os corações (1,0 - 1,5 g) de ratos Wistar machos (200 - 300 g) foram removidos rapidamente após morte dos animais por decapitação e colocados em meio de homogeneização a 4°C. Os corações foram seccionados com auxílio de bisturi e triturados o mais possível com ajuda de uma tesoura, de modo a eliminar o sangue e facilitar a homogeneização em 20 ml de meio de homogeneização. Posteriormente, foram transferidos para um homogeneizador "Potter-Elvehjen" de 50 ml e adicionou-se a protease tipo VIII (0,5 mg/g de coração) tendo sido homogeneizados a 600 rpm durante 20 segundos. Após este período de tempo interrompeu-se a homogeneização durante 1 minuto de forma a possibilitar uma completa actuação da protease sobre o tecido cardíaco, de forma a ocorrer a ruptura dos cardiomiócitos, obtendo-se uma suspensão constituída por células fragmentadas, células integras e organelos intracelulares entre os quais as mitocôndrias. Findo este tempo adicionaram-se mais 20 ml de meio de homogeneização à suspensão que foi novamente homogeneizada durante 30 segundos. O homogeneizado foi repartido por dois tubos de centrifuga de 50 ml, o volume ajustado aproximadamente a 40 ml e centrifugado a 11000 rpm durante 10 minutos (IEC B-20

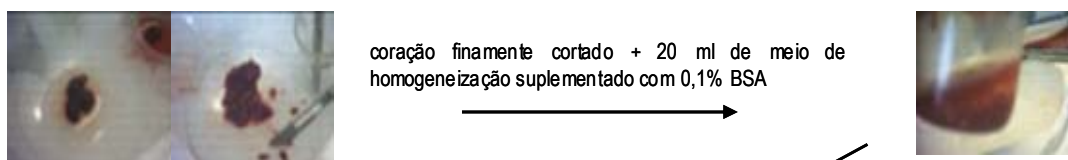
CENTRIFUGE) à temperatura de 4°C (Fig.2.1). Esta primeira homogeneização teve por objectivo remover a protease, impedindo a sua actuação mais prolongada na preparação biológica, que poderia levar à destruição dos componentes das mitocôndrias. O sobrenadante obtido foi decantado e o sedimento essencialmente desprovido de protease foi cuidadosamente resuspenso num pequeno volume de meio de homogeneização e transferido para um pequeno homogeneizador de vidro “Potter-Elvehjen”, sendo re-homogeneizado com auxílio de um pistão 250 rpm. O homogeneizado depois de transferido para tubos de centrifuga foi centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos, para remover compostos de maior densidade existentes na suspensão. O sobrenadante foi cuidadosamente decantado para dois novos tubos que foram centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos. O sedimento obtido contendo as mitocôndrias foi resuspenso num pequeno volume de meio de lavagem com auxílio de um pincel. A suspensão obtida foi diluída em aproximadamente 40 ml de meio de lavagem e centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos (Fig. 2.1). De forma a obter fracções mitocondriais ainda mais purificadas, esta lavagem foi realizada mais uma vez. O sedimento final foi resuspenso num volume mínimo de meio de lavagem (~1ml/coração). A suspensão mitocondrial acondicionada em tubo de centrifuga permaneceu em gelo durante a realização dos ensaios. Este procedimento experimental permitiu a obtenção de suspensões mitocondriais de boa qualidade que apresentaram índices de controlo respiratório entre 2-3 (succinato como substrato respiratório) quando utilizadas no espaço de 4-6 horas.

## 2.2- Isolamento das mitocôndrias de fígado

As fracções mitocondriais foram isoladas a partir de fígado de ratos Wistar (200 – 300 g), de acordo com método descrito Gazotti e colaboradores (1979) com pequenas modificações (Fig. 2.2). Os animais foram mantidos em jejum até à sua utilização, de forma a esgotar as reservas de glicogénio e de lípidos existentes no fígado. Após deslocamento cervical os ratos foram decapitados para sangrarem rapidamente e o fígado foi removido e colocado num copo de vidro contendo meio de homogeneização (250 mM sacarose, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, pH 7,4 e BSA a 0,1% tendo esta sido adicionada antes da utilização do meio). O fígado foi triturado em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura. Posteriormente, foi suspenso em meio de homogeneização (~60 ml) num homogeneizador de vidro tipo “Potter-Elvehjen”, e aí homogeneizado com 4-6 cursos do pistão de teflon rodando a 250 rpm até obter uma suspensão homogénea (Fig. 2.2). O homogeneizado foi transferido para dois tubos de centrifuga e centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi decantado para novos tubos de centrifuga, cujos volumes foram ajustados com meio de homogeneização e submetidos a 10000 rpm durante 10 minutos, obtendo-se o sedimento constituído pela fracção mitocondrial (Fig. 2.2). Após remoção por sucção do

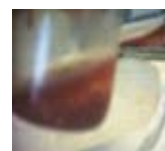
sobrenadante, o sedimento constituído pela fracção mitocondrial foi resuspenso em meio de lavagem (250 mM sacarose, 10 mM Hepes, pH 7,2). A suspensão foi transferida para novos tubos de centrifuga, e diluída em 45 ml de meio de lavagem e foram realizadas duas centrifugações sequenciais de 10000 rpm durante 10 minutos (Fig. 2.2).

### 1º HOMOGENEIZAÇÃO



cortar finamente com 1 bisturi e tesoura lavando várias vezes com meio de homogeneização

coração finamente cortado + 20 ml de meio de homogeneização suplementado com 0,1% BSA



resuspender em 20ml de meio de homogeneização suplementado com 0,5 mg de protease por cada grama de coração



### 2º CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL



centrifugar  
11000 rpm  
10 min



resuspender o sedimento com homogeneizador tipo potter



transferir para dois tubos de centrifuga



centrifugar  
2500 rpm  
10 min



transferir sobrenadante para novos tubos de centrifuga

centrifugar  
10000 rpm  
10 min



### 3º LAVAGEM E PURIFICAÇÃO



resuspender a fracção mitocondrial em meio de Lavagem

centrifugar  
10000 rpm  
10 min



desprezar o sobrenadante e resuspender as mitocôndrias em meio de lavagem  
Centrifugar  
10000 rpm  
10 min



resuspender as mitocôndrias em 1ml de meio



Figura 2.1 – Representação esquemática do processo de isolamento da fracção mitocondrial de coração de rato.

A fracção mitocondrial purificada foi ressuspensa em 2,5 ml de meio de lavagem e mantida em gelo durante o decorrer dos ensaios, tendo sido usada durante 4-5 horas após o isolamento. Este método permitiu obter mitocôndrias com índices de controlo respiratória (ICR) de 4-6 quando utilizado o succinato como substrato respiratório.

### 1º HOMOGENEIZAÇÃO

Fígado finamente cortado e lavado várias vezes com meio de homogeneização



suspender com auxílio de potter em ~60 ml de meio de homogeneização



fígado suspenso em 20 ml de meio de homogeneização suplementado com 0,1% BSA

### 2º CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL

centrifugar  
2500 rpm  
10 min



transferir para dois tubos de centrifuga



transferir o sobrenadante para dois novos tubos



centrifugar  
10000 rpm  
10 min



### 3º LAVAGEM E PURIFICAÇÃO



resuspender a Fracção mitocondrial em meio de Lavagem



centrifugar  
10000 rpm  
10 min



desprezar o sobrenadante e resuspender as mitocôndrias em meio de lavagem

centrifugar  
10000 rpm  
10 min



resuspender as mitocôndrias em 2,5 ml de meio de lavagem



Figura 2.2 – Representação esquemática do processo de isolamento da fracção mitocondrial de fígado de rato.

### 2.3- Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína da fracção mitocondrial foi determinada pelo método colorimétrico do biureto (Gornall *et al.*, 1949). As amostras da suspensão mitocondrial (50  $\mu$ l de mitocôndrias de fígado e 25  $\mu$ l de coração) foram colocadas em tubos de ensaio contendo 0,95 ml de solução de NaCl a 0,9% e 25  $\mu$ l de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 20 %. Foi também preparada uma série de padrões de albumina com o volume de 2 ml cada, tendo acertado o volume com NaCl e SDS a 20 %. Posteriormente a cada um dos tubos de ensaio foram adicionados 1,5 ml de reagente alcalino de cobre (“reagente de biureto”) e após agitação, colocaram-se os tubos a 37 °C durante 20 minutos. A absorvência das amostras e dos padrões foi lida a 550 nm num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3 UV/VIS.

## 3. -Avaliação dos efeitos da MDMA e MTA na bioenergética mitocondrial

### 3.1- Determinação do consumo de oxigénio associado à fosforilação de ADP

O consumo de oxigénio mitocondrial foi avaliado polarograficamente à temperatura de 30 °C com um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark (YSI Model 5331, Yellow Spring Instruments) ligado a um registador Kipp & Zonen. Os ensaios foram realizados numa câmara de reacção termostaticada com a capacidade de 1 ml e durante os ensaios a suspensão mitocondrial foi mantida sob agitação magnética. A calibração do eléctrodo fez-se de acordo com Rickwood e colaboradores (1987). As experiências com mitocôndrias de fígado (1 mg) foram realizadas em 1 ml de meio de respiração contendo sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, EGTA 0,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, enquanto que o meio usado para as mitocôndrias de coração (0,5 mg) não continha o MgCl<sub>2</sub>. Os meios foram suplementados com rotenona 2  $\mu$ M e após incubação durante 3 minutos, a respiração mitocondrial foi iniciada pela adição de succinato 5 mM (substrato respiratório) que induziu um pequeno aumento no consumo de oxigénio pelas mitocôndrias (estado 4 da respiração). A posterior adição de 150 nmoles de ADP/mg de proteína às mitocôndrias de fígado e de 300 nmoles de ADP/mg de proteína às mitocôndrias de coração originou um substancial aumento no consumo de oxigénio (estado 3 da respiração) e após o consumo de todo o ADP adicionado, a velocidade de consumo de oxigénio retomou a velocidade de consumo de O<sub>2</sub> próxima da inicial (controlo). Para estudar os efeitos dos derivados anfetamínicos, as mitocôndrias foram pré-incubadas durante 3 minutos com concentrações diferentes da MDMA e da MTA antes da energização com succinato.

As velocidades de consumo de oxigénio foram calculadas a partir da calibração do eléctrodo fazendo corresponder a concentração de oxigénio de 240 nmoles  $O_2$ /ml de meio de respiração, a 30°C, a 300 mm de papel do registador. O índice de controlo respiratório (ICR) foi determinado como o quociente entre a velocidade de consumo de  $O_2$  na presença de ADP (estado 3 da respiração) e a velocidade de consumo de  $O_2$  após o consumo do ADP adicionado (estado 4 da respiração), sendo utilizado como critério de integridade mitocondrial. A eficiência fosforilativa foi determinada pelo quociente entre o ADP adicionado (expresso em nmoles/mg de proteína) e a quantidade de  $O_2$  consumido (expresso em nAtg) para fosforilar todo o ADP adicionado.

### **3.2- Determinação do consumo de oxigénio na presença de ADP saturante e na presença de FCCP**

Os efeitos da MDMA e da MTA na respiração mitocondrial durante a fosforilação activa foram estudados na presença de ADP em concentrações saturantes (1 mM), reflectindo os efeitos destas drogas no sistema fosforilativo mitocondrial. Foram também realizados ensaios na presença de FCCP (1  $\mu$ M) em que a respiração mitocondrial se encontra dissociada da fosforilação oxidativa permitindo analisar a possível interacção da MTA com os componentes da cadeia respiratória ou sistema de transporte de electrões. O FCCP (ionóforo para protões) ao dissociar energicamente as mitocôndrias (Heytler, 1979), a permeabilidade da membrana a protões e o consumo de  $O_2$  encontram-se fortemente estimulados e deste modo, as variações na permeabilidade membranar potencialmente induzida pela droga não interferem com a velocidade de consumo de  $O_2$  pela cadeia respiratória. Na presença do dissociador FCCP, não ocorre fosforilação e conseqüentemente não há interferência do sistema fosforilativo na resposta do sistema de transporte de protões ao efeito da MTA. Assim, as alterações na velocidade de consumo de  $O_2$  indicam interferências no sistema de transporte de electrões.

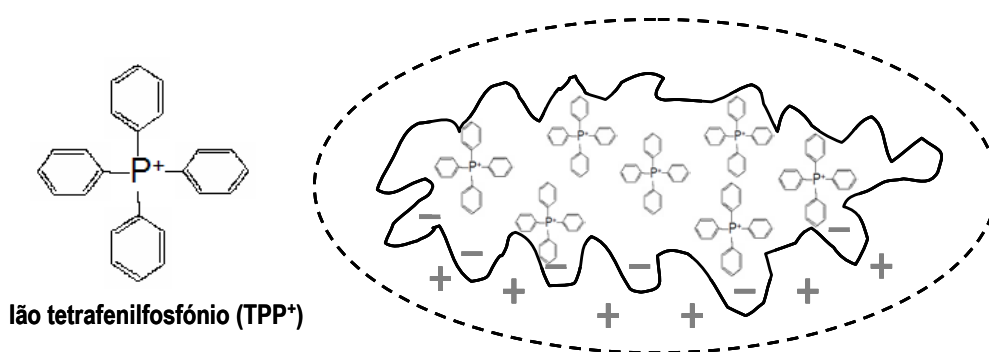
As mitocôndrias foram incubadas a 30°C em 1 ml de um meio contendo sacarose 130 mM, KCl 50 mM,  $MgCl_2$  2,5 mM,  $KH_2PO_4$  5 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,1 mM (pH 7,4), suplementadas com rotenona 2  $\mu$ M. Após incubação das mitocôndrias (1 mg) durante 3 minutos na ausência e na presença de diferentes concentrações de MTA, as reacções foram iniciadas pela adição de succinato 5 mM e posteriormente, o consumo de  $O_2$  foi estimulado pela adição de ADP (1 mM) nos estudos dos efeitos das drogas na eficiência fosforilativa ou estimulado pela adição de FCCP (1  $\mu$ M) quando se avaliaram os seus efeitos na cadeia respiratória.

### 3.3-Avaliação do potencial transmembranar das mitocôndrias

O potencial eléctrico transmembranar ( $\Delta\Psi$ ) foi avaliado através do registo contínuo da acumulação e libertação do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP<sup>+</sup>). Este registo foi obtido recorrendo a um eléctrodo selectivo para TPP<sup>+</sup> de acordo com métodos previamente descritos (Kamo *et al.*, 1979) e como referência foi utilizado um eléctrodo de calomelanos (Ag/AgCl-Modelo MI 402; Microelectrodes, Inc., Bedford, NH). Ambos os eléctrodos foram ligados a um aparelho de pH, Crison micro pH 2001 e o sinal correspondente à diferença de potencial gerada entre os eléctrodos foi debitado num registador Kipp & Zonen, após ter passado por um circuito de compensação de voltagem basal, de acordo com o descrito por Madeira (1975). A concentração de TPP<sup>+</sup> utilizada (4  $\mu\text{M}$ ) permitiu uma alta sensibilidade nas medições efectuadas, não exercendo efeitos tóxicos nas mitocôndrias. O  $\Delta\Psi$  foi determinado assumindo que a distribuição do TPP<sup>+</sup> entre a mitocôndria e o meio de reacção (Fig. 2.3), obedece à equação de Nernst como o descrito por Kamo et colaboradores *al.*, (1979) e de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\Psi \text{ (mV)} = 59 \log (v/V) - 59 \log (10^{\Delta E/59} - 1)$$

sendo que  $v$ ,  $V$  e  $\Delta E$  representam, o volume mitocondrial, o volume do meio de incubação e a deflexão do potencial de eléctrodo desde a linha basal, respectivamente. Para o volume da matriz mitocondrial tomou-se o valor de 1,1  $\mu\text{l/mg}$  de proteína (Massini *et al.*, 1984). Não foram efectuadas as correcções devidas à contribuição da ligação “passiva” de TPP<sup>+</sup>, uma vez que a finalidade destes ensaios não consistia em determinar os valores absolutos do potencial mitocondrial, mas sim avaliar as alterações relativas nos potenciais induzidas pelas drogas. As reacções decorreram a 30°C, numa câmara de reacção aberta, termostalizada sob agitação magnética continua.



**Figura 2.3 – Esquema ilustrativo do princípio em que se baseia a determinação do potencial transmembranar ( $\Delta\Psi$ ), por utilização do ião tetrafenilfosfónio (TPP<sup>+</sup>).** O  $\Delta\Psi$  foi determinado a partir da seguinte equação [ $\Delta\Psi \text{ (mV)} = 59 \log (v/V) - 59 \log (10^{\Delta E/59} - 1)$ ] assumindo que a distribuição do TPP<sup>+</sup> ente a mitocôndria e o meio, respeita a equação de Nernst, como o descrito por Kamo *et al.*,(1979) em que  $v$ ;  $V$ ,  $\Delta E$  significam o volume mitocondrial, o volume do meio de incubação e a deflexão do potencial de eléctrodo desde a linha basal, respectivamente.

### 3.4- Determinação em simultâneo do $\Delta\Psi$ e da actividade respiratória

De forma a estudar os efeitos da MDMA e da MTA na função bioenergética mitocondrial determinou-se simultaneamente o potencial transmembranar das mitocôndrias e a velocidade respiratória. Ambos os eléctrodos, foram inseridos na câmara de reacção utilizada para a determinação do consumo de  $O_2$  e foram ligados a um potenciómetro, sendo os valores de consumo de  $O_2$  e de  $\Delta\Psi$  registados num registador. A abertura da câmara de vidro foi vedada quase completamente, deixando apenas o espaço para efectuar as adições necessárias, limitando deste modo as trocas de  $O_2$  entre o conteúdo da câmara e o meio ambiente (Fig. 2.4). Os ensaios foram realizados em 1 ml de meio de respiração, ao qual foi adicionado 1 mg de proteína, TPP+ 4 $\mu$ M e rotenona 2  $\mu$ M. Os ensaios decorreram a 30°C e foram iniciados utilizando succinato 5 mM como substrato respiratório. Após obtenção do potencial eléctrico máximo e a distribuição de TPP+ atingir o equilíbrio, adicionou-se 150 nmoles de ADP/mg de proteína às mitocôndrias de fígado e de 300 nmoles de ADP/mg de proteína às mitocôndrias de coração que originou um substancial aumento no consumo de oxigénio no estado 3 da respiração e após o consumo de todo o ADP adicionado a velocidade de consumo de oxigénio retomou a velocidade de consumo de  $O_2$  próxima da inicial (controlo). Para estudar os efeitos dos derivados anfetamínicos as mitocôndrias foram pré-incubadas durante 3 minutos com concentrações diferentes de MDMA e de MTA antes da energização com succinato.

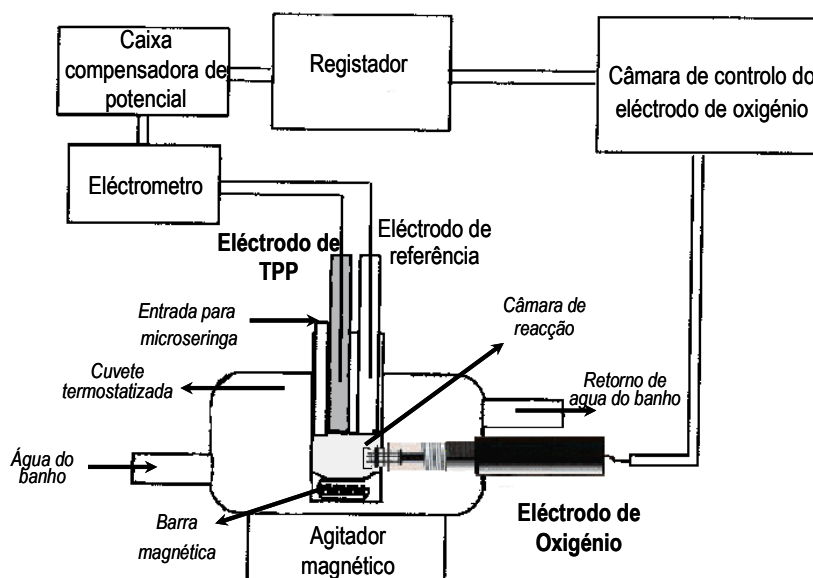


Figura 2.4 – Representação esquemática da determinação simultânea do consumo de oxigénio e do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).



### 3.5- Avaliação de efeitos das drogas na integridade das mitocôndrias

Para esclarecer os efeitos da MDMA e da MTA na integridade da membrana mitocondrial foram avaliadas as variações dos volumes osmóticos das mitôndrias por determinação espectrofotométrica da absorvência aparente da suspensão a 540 nm, num espectrofotómetro Perkin-Elmer, lambda 6 UV/VIS (Custódio *et al.*, 1998). As experiências decorreram em 2 ml de meio de respiração contendo sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 0,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM e HEPES 5 mM, pH 7,4, suplementado com rotenona 2 µM. A suspensão mitocondrial (1 mg) foi adicionada ao meio de respiração na ausência de substratos respiratórios, à temperatura de 30°C e sob agitação magnética constante, tendo sido feita a leitura da absorvência durante 20 minutos. Para esclarecer os efeitos dos derivados anfetamínicos, a suspensão de mitocôndrias foi incubada durante 3 minutos na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações de MDMA e MTA, antes de iniciar a leitura da absorvência a 540 nm.

## 4. -Avaliação dos efeitos da MDMA e MTA na permeabilidade transitória mitocondrial

### 4.1- Determinação do $\Delta\Psi$ associado ao transporte de cálcio

Os efeitos da MDMA e da MTA na MPT de mitocôndrias de fígado e coração foram também estudados avaliando o  $\Delta\Psi$ , conforme o descrito na secção 3.3. As reacções decorreram numa câmara aberta de reacção, termostaticada a 30°C, sob agitação magnética contínua, em 2 ml de meio de reacção contendo sacarose 200 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM ( 5 mM nas experiências com as mitocôndrias de coração), EGTA 10 µM; Tris-Mops 10 mM, pH 7,4 suplementado com TPP<sup>+</sup> 4 µM, rotenona 2 µM e oligomicina 1 µg. Os ensaios foram iniciados pela adição de 5 mM succinato à suspensão mitocondrial (0,5 mg de proteína/ml) e quando a distribuição do TPP<sup>+</sup> atingiu o estado de equilíbrio (após sensivelmente um minuto) adicionou-se o cálcio [140 nmoles/mg de proteína de fígado e 400 nmoles/mg de proteína de coração] e as flutuações de TPP<sup>+</sup> foram registadas. Paralelamente, a suspensão mitocondrial foi pré-incubada com diferentes concentrações de MDMA e da MTA e com CyA durante 3 minutos antes de iniciar as reacções com succinato. A MDMA, a MTA e a CyA foram também durante a despolarização do  $\Delta\Psi$  devida à indução da MPT por Ca<sup>2+</sup> e fosfato (Pi) 1mM ou 5 mM.

Com o objectivo de esclarecer os mecanismos dos efeitos da MDMA e MTA na inibição da MPT, esta foi também induzida com *t*-BuOOH (50 µM), na presença de Ca<sup>2+</sup>, (50 nmoles/mg de

proteína), como o descrito para as experiências com  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi. O *t*-BuOOH foi adicionado quando as mitocôndrias reestabeleceram o  $\Delta\Psi$  após a acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  o que causou uma despolarização total do  $\Delta\Psi$ . As diferentes concentrações de MDMA e MTA estudadas, assim como a CyA foram pré-incubadas durante 3 minutos com as mitocôndrias antes de iniciar as experiências com succinato.

#### 4.2- Determinação do consumo de oxigénio associado ao transporte de cálcio

A avaliação da actividade respiratória foi também utilizada para estudar os efeitos da MDMA e da MTA na MPT de mitocôndrias isoladas de fígado e de coração. As variações na respiração mitocondrial foram avaliadas pelo consumo de  $\text{O}_2$  e as experiências decorreram a  $30^\circ\text{C}$  em câmara fechada tendo sido o consumo de  $\text{O}_2$  determinado com um eléctrodo de oxigénio tipo Clark como as experiências descritas para as experiências de bioenergética mitocondrial (ver secção 3.1). A suspensão de mitocôndrias (1 mg/ml) foi adicionada ao meio de reacção contendo sacarose 200 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM (5 mM nas experiências com o coração), suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$  e oligomicina (0,5 mg/ml). As reacções foram iniciadas com succinato 5 mM e, após 2 minutos de reacção, foi adicionado  $\text{CaCl}_2$  (200 nmoles/mg de proteína de fígado e 600 nmoles/mg de proteína de coração) que induziu um aumento transitório do consumo de oxigénio. Paralelamente a suspensão mitocondrial foi pré-incubada com MDMA (1000 nmoles/mg proteína), MTA (250 e 500 nmoles/mg proteína) ou CyA (1,5 nmoles/mg de proteína) durante 3 minutos antes de iniciar as reacções com succinato.

#### 4.3- Determinação do intumescimento mitocondrial

A intumescência das mitocôndrias foi também determinada através das variações do seu volume osmótico pela avaliação espectrofotométrica da absorvência aparente da suspensão a 540 nm, num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 6 UV/VIS (Custódio *et al.*, 1998). Os ensaios foram realizados numa cuvete de espectrofotómetro a  $30^\circ\text{C}$  contendo 2 ml de meio de reacção (sacarose 200 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM (ou 5 mM nas experiências com o coração), EGTA 10  $\mu\text{M}$ , Tris-Mops 10 mM, pH 7,4) suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$  e oligomicina (1  $\mu\text{g}$ ). A suspensão mitocondrial (0,5 mg/ml) foi mantida na cuvete sob agitação contínua e a absorvência foi determinada durante 12-15 min. As experiências com mitocôndrias de fígado foram iniciadas com succinato 5 mM adicionado 1 minuto após o  $\text{CaCl}_2$  (140 nmoles/mg de proteína). Nas experiências com mitocôndrias de coração procedeu-se inicialmente à energização com succinato 5 mM e após cerca de 2 minutos adicionou-se  $\text{CaCl}_2$  400 nmoles/mg de proteína). A CyA (1,5 nmoles/mg de proteína) foi incubada durante 3 minutos antes da adição do succinato ou adicionada no decorrer do

decréscimo da absorvência, justificando assim que o intumescimento mitocondrial observado quando a suspensão mitocondrial é incubada com cálcio resulta da indução de MPT. Para avaliar os efeitos da MDMA e da MTA na MPT, procedeu-se igualmente à sua pré-incubação durante 3 minutos com as mitocôndrias antes de adicionar o succinato ou à sua adição no decorrer do processo de decréscimo da absorvência.

Nas experiências realizadas com o objectivo de esclarecer os mecanismos subjacentes à inibição de MPT por estas drogas, a MPT foi induzida pelo prooxidante, *t*-BuOOH (50  $\mu$ M em mitocôndrias de fígado) na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (40 nmoles/mg de proteína mitocondrial de fígado). As experiências com mitocôndrias de fígado foram iniciadas como o descrito anteriormente. Foi realizada uma experiência em que as mitocôndrias foram incubadas separadamente com *t*-BuOOH e também um controlo com CyA .

#### 4.4- Determinação dos fluxos de cálcio

Os fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias de fígado e coração associados à indução de MPT foram estudados utilizando uma sonda fluorescente específica para o cálcio extramitocondrial, designada por Cálcium Green 5-N (Rajdev e Reynolds, 1993). As reacções decorreram em cuvetes de espectrofluorímetro termostatzadas a 30°C e à suspensão de mitocôndrias de fígado (0,2 mg/ml) e de coração (0,1 mg/ml) foram adicionados sob agitação continua a 2 ml de meio contendo sacarose 200 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM, (5 mM nas experiências com mitocôndrias de coração), EGTA 10  $\mu$ M; Tris-Mops 10 mM, pH 7,4 suplementado com rotenona 2  $\mu$ M, oligomicina (1  $\mu$ g), e 100mM de Cálcium Green 5-N sendo. O cálcio livre foi seguido pela determinação da intensidade de fluorescência das amostras num espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B, usando-se um comprimento de onda de 506 nm para a excitação e 531 nm para a emissão e as fendas de excitação e de emissão usadas foram de 4 e 6 nm. A avaliação foi contínua durante 1 minuto antes da adição de cálcio (para obter a linha basal) e decorrido 1 minuto após a adição de cálcio, as mitocôndrias foram energizadas com succinato 5 mM, seguindo-se um período de avaliação adicional de 12 minutos. As experiências foram terminadas pela adição de 1 ml de EGTA 50 mM. A CyA (1,5 nmoles/mg de proteína) foi adicionada às mitocôndrias e deixada incubar por 3 minutos antes da energização com succinato ou adicionada no decorrer da libertação de cálcio pelas mitocôndrias. O estudo do efeito da MDMA e da MTA na libertação e acumulação de cálcio pelas mitocôndrias foi feito pré incubando durante 2 minutos as mitocôndrias com a MDMA e a MTA antes de se proceder à energização com succinato, e pela sua adição no decorrer da libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. No coração, foram adicionados pequenos pulsos de cálcio (150 nmoles/mg de

proteína) de modo a verificar a capacidade limite de acumulação de cálcio quer nas mitocôndrias controlo quer nas mitocôndrias quando pré incubadas com MDMA ou MTA.

#### 4.5- Determinação do estado redox do NAD(P)H mitocondrial

Os nucleótidos de pirimidina (NADH e NADPH) apresentam auto-fluorescência quando se encontram no estado reduzido, enquanto que no estado oxidado (NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup>) não são fluorescentes (Nieminen et al., 1997). Deste modo, a sua oxidação resulta num decréscimo da fluorescência emitida pela suspensão mitocondrial, permitindo avaliar a oxidação destes compostos por fluorimetria. As mitocôndrias de fígado (1 mg /ml) foram adicionadas a 2 ml de meio de reacção contendo sacarose 200 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, EGTA 10 µM, Tris-Mops 10 mM, pH 7,4 suplementado com rotenona 2 µM e oligomicina (0,5 mg/ml). As experiências decorreram a 30°C sob agitação constante e após pré-incubação das mitocôndrias com *t*-BuOOH (50 µM), as reacções foram iniciadas com succinato 5 mM e decorridos 100 segundos após a energização das mitocôndrias foi adicionado Ca<sup>2+</sup> (50 nmoles/mg de proteína). Paralelamente, para estudar o efeito destas drogas no estado redox dos NAD(P)H, foi realizada a pré-incubação das mitocôndrias antes da adição do pró-oxidante com a MDMA em concentrações de 1000 nmoles/mg de proteína e a MTA em concentrações de 300 e de 500 nmoles/mg de proteína, tendo-se procedido de igual modo para a CyA (1,5 nmoles/mg de proteína). O estado redox dos nucleótidos de pirimidina [NAD(P)H] mitocondriais foi seguido pela determinação da intensidade de fluorescência das amostras num espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B, utilizando um comprimento de onda de 366 nm para a excitação e 450 nm para a emissão e as fendas de excitação e de emissão usadas foram de 3 e 5 nm, respectivamente.

#### 5- Análise dos dados e estatística

Neste trabalho os resultados foram apresentados como a média ± SD (desvio padrão) do número de experiências (n) indicado nas legendas das figuras. A significância estatística foi determinada usando a Análise de Variância com um factor (ANOVA) seguido do teste de Turkey. Em todos os casos um valor de *p* <0,05 foi considerado significativo. Os registos apresentados são representativos das experiências realizadas com pelo menos 3 suspensões mitocondriais diferentes.

---

### **III – RESULTADOS**

---

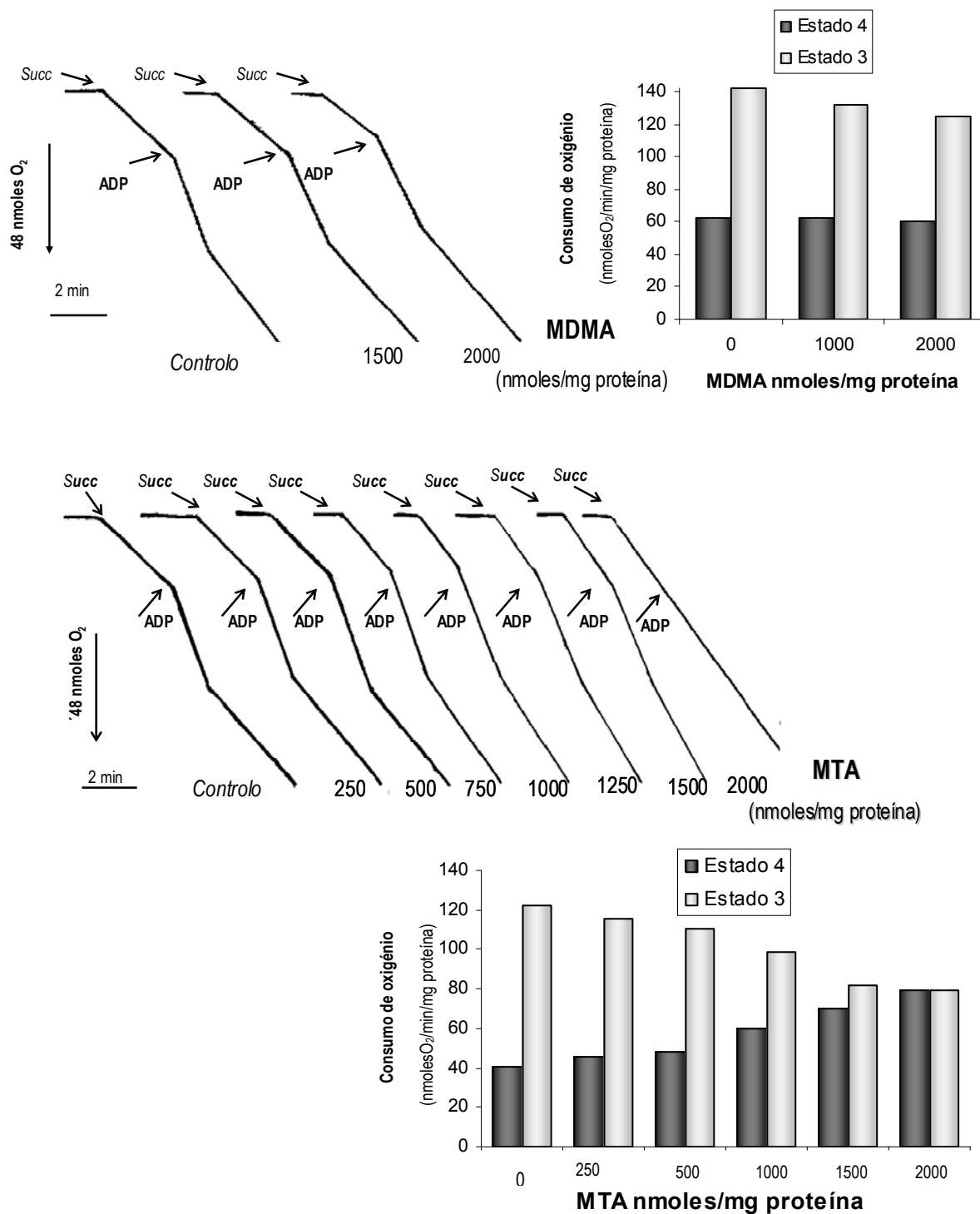
## RESULTADOS

### 1- Efeitos da MDMA e da MTA na bioenergética de mitocôndrias de coração e de fígado

#### 1.1- Efeitos da MDMA e da MTA no consumo de Oxigénio

A acção da MDMA e da MTA foi estudada na bioenergética de mitocôndrias de coração e de fígado, com o objectivo de avaliar e comparar os mecanismos responsáveis pelas alterações da carga energética da célula, provavelmente envolvidos na disfunção de órgãos e nos mecanismos de morte celular induzida por ambas as drogas.

Os efeitos da MDMA e da MTA na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa foram avaliados pelo consumo de oxigénio em mitocôndrias de coração. As mitocôndrias foram energizadas pela adição de succinato 5 mM que induziu um aumento do consumo de oxigénio correspondente ao estado 4 da respiração mitocondrial (Fig. 3.1-Controlo). Posteriormente, a adição de ADP induziu um aumento do consumo de oxigénio (estado respiratório 3) gasto para repor o  $\Delta\Psi$  usado no transporte do ADP para o interior das mitocôndrias e na fosforilação do ADP a ATP. Após a fosforilação de todo o ADP adicionado, a velocidade de consumo de oxigénio retomou o seu valor inicial (Fig. 3.1-Controlo). Para estudar os efeitos da MDMA e da MTA no consumo de oxigénio, as mitocôndrias foram incubadas durante 3 minutos com concentrações crescentes de MDMA e MTA, antes de iniciar os ensaios. Como pode ser observado nos registos e no gráfico de determinação das velocidades de consumo de  $O_2$  em mitocôndrias de coração (Fig. 3.1), a MDMA até uma concentração de 2000 nmoles/mg de proteína não afecta significativamente o consumo de  $O_2$  (Fig. 3.1-MDMA). A pré-incubação das mitocôndrias de coração com baixas concentrações de MTA (< 500 nmoles/mg de proteína) não afecta a actividade respiratória e fosforilativa das mitocôndrias, como se pode observar nos registos de consumo de  $O_2$  nos estados 4 e 3 da respiração (Fig.3.1-MTA). Todavia, a pré incubação de MTA em concentrações superiores a 1000 nmoles /mg de proteína, provoca um ligeiro aumento do consumo de  $O_2$  no estado 4 (Fig. 3.1-MTA). Por sua vez, a estimulação do consumo de oxigénio induzido pela adição de ADP (estado 3) deixa de ser observado para concentrações superiores a 1500 nmoles/mg de proteína, indicando que a pré-incubação da suspensão de mitocôndrias com concentrações iguais ou superiores a 2000 nmoles/mg de proteína dissocia a respiração mitocondrial da fosforilação oxidativa (Fig. 3.1 - MTA).

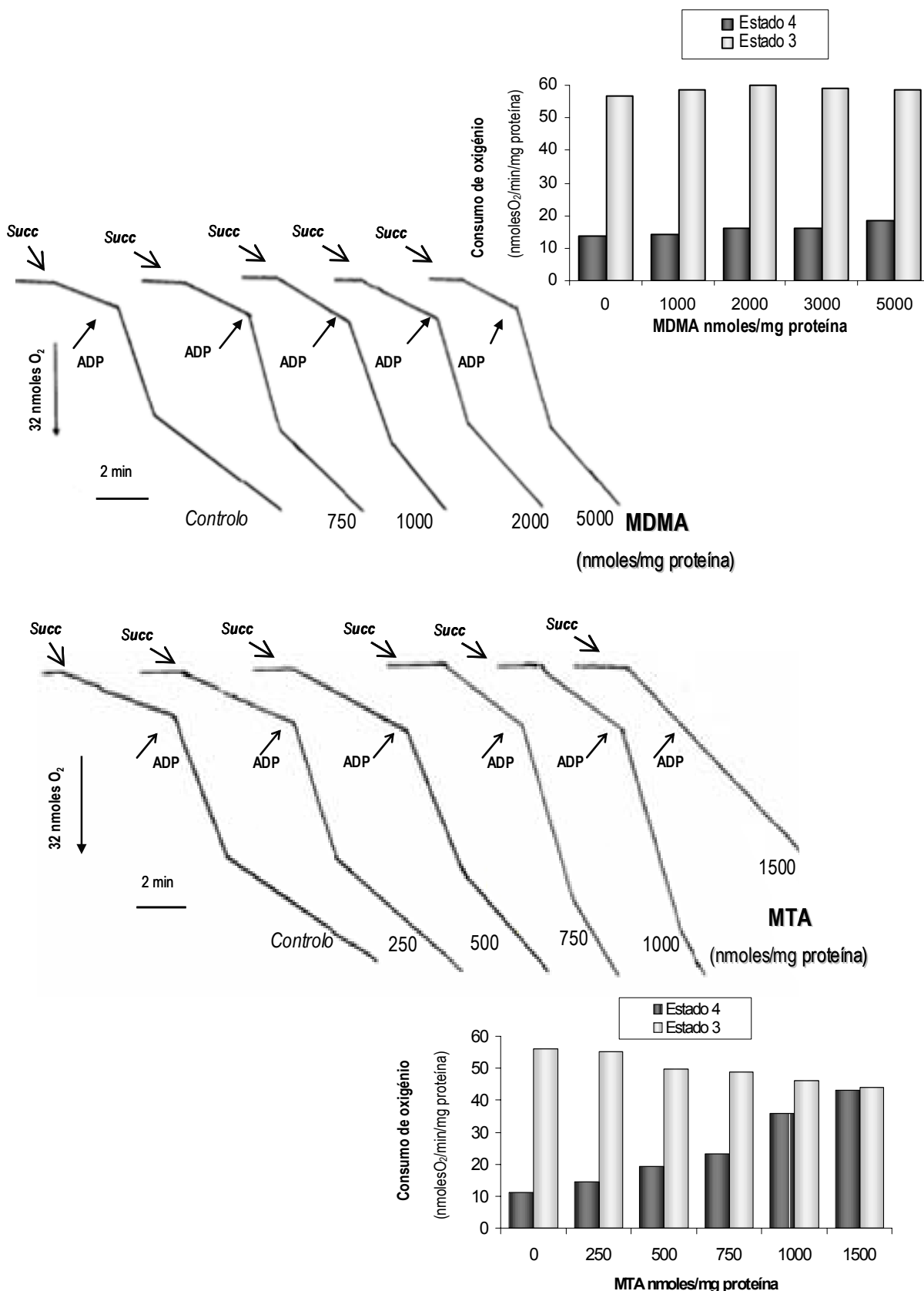


**Figura 3.1 – Efeitos da MDMA e MTA no consumo de oxigénio em mitocôndrias de coração.** As mitocôndrias (0,5 mg) em 1 ml de meio de respiração suplementado com rotenona 2  $\mu$ M foram incubadas na ausência das drogas (Controlo) ou com diferentes concentrações de MDMA e MTA (expressas em nmoles/mg de proteína como o indicado pelos números junto aos traços do registo) durante 3 min antes da adição do succinato (Succ) (estado 4). Após 2 min de energização, as mitocôndrias foram suplementadas com ADP (300 nmoles/mg de proteína) para induzir o estado 3. As velocidades de respiração mitocondrial expressas em nmoles O<sub>2</sub>/min/mg de proteína foram determinadas com um eléctrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark. Os registos são representativos de pelo menos 3 experiências com mitocôndrias de coração de diferentes animais.

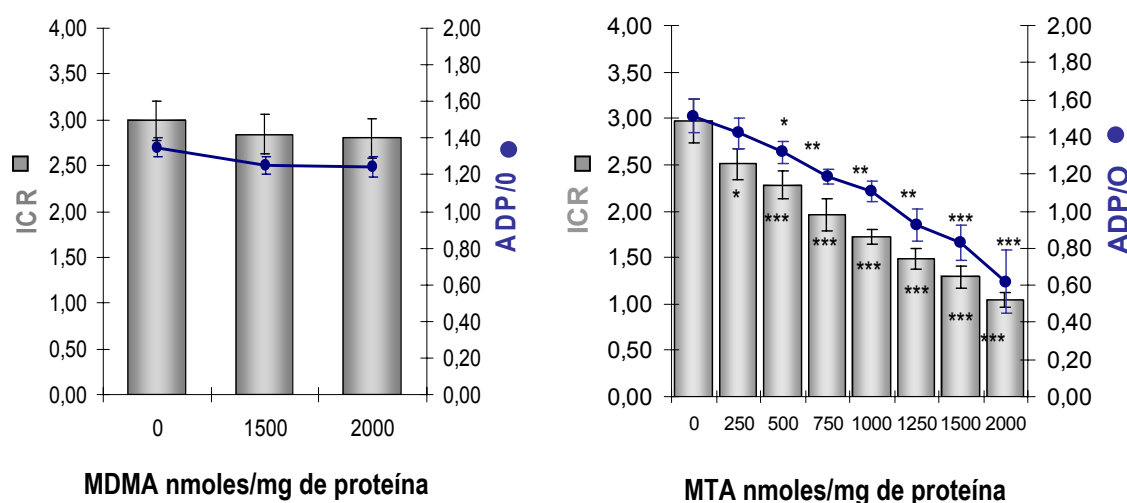
Assim, com estas concentrações de MTA, a adição de ADP às mitocôndrias não estimula o consumo de oxigénio o que sugere um efeito dissociador desta droga. De facto, a MTA estimula o estado 4 e diminui o estado 3, sugerindo uma alteração na integridade membranar. Paralelamente, foi realizado o mesmo estudo usando mitocôndrias de fígado e como se pode observar na Figura 3.2-MDMA, a pré-incubação com MDMA até concentrações de 5000 nmoles/mg de proteína não afecta significativamente a cadeia respiratória mitocondrial nem eficiência fosforilativa como se observa nos registos de consumo de  $O_2$  e pela velocidade de consumo de  $O_2$  nos estados 4 e 3 da respiração (Fig. 3.2-MDMA) Ao contrário, após pré-incubação com MTA em concentrações iguais ou superiores a 1500 nmoles/mg de proteína, a adição de ADP às mitocôndrias não estimula o consumo de oxigénio, o que sugere um efeito dissociador da MTA (Fig. 3.2-MTA). Todavia, a MTA para o intervalo de concentrações de 250-1000 nmoles/mg de proteína estimula o estado 4 e diminui o estado 3, sugerindo que este contaminante pode ser responsável pela toxicidade induzida pelo consumo de pastilhas de ecstasy (Fig. 3.2-MTA). A figura 3.3 ilustra os efeitos da MDMA e da MTA no ICR e no quociente ADP/O de mitocôndrias de coração, em função da concentração das drogas, usando succinato como substrato respiratório. O ICR indica a razão entre a velocidade de consumo de oxigénio (nmoles/min/mg de proteína) na presença do ADP (estado 3) e a velocidade de consumo de  $O_2$  após todo o ADP adicionado ter sido fosforilado (estado 4 pós fosforilativo). O quociente ADP/O, que expressa a eficiência fosforilativa mitocondrial, é definido pela razão entre o ADP adicionado (expresso em nmoles) e a quantidade de  $O_2$  (expresso em nAtg) consumidos para fosforilar todo o ADP adicionado, como definido nos Materiais e Métodos. Como pode ser observado, a pré-incubação da suspensão mitocondrial durante 3 minutos com MDMA não afecta os quocientes bioenergéticos ICR e ADP/O (Fig. 3.3-MDMA), significando que não afecta a cadeia respiratória e fosforilação oxidativa mitocondrial de acordo com os resultados da Fig. 3.1-MDMA.

Todavia, e ao contrário do que se observa com a MDMA, a MTA induz uma diminuição acentuada de ambos os índices em função da concentração da droga, evidenciando, pela diminuição do ICR, uma alteração da integridade da membrana mitocondrial e, pela diminuição do quociente ADP/O, a perda da capacidade fosforilativa das mitocôndrias. Para concentrações iguais ou superiores a 2000 nmoles/mg de proteína o índice ICR é próximo de 1, isto é, a adição de ADP já não induz a estimulação da cadeia respiratória, significando um efeito dissociador da cadeia respiratória do sistema fosforilativo de acordo com a diminuição na velocidade do consumo de oxigénio no estado 3 e no estado 4 da respiração (Fig. 3.3-MTA).





**Figura 3.2 – Efeitos da MDMA e MTA no consumo de oxigénio em mitocôndrias de fígado.** As mitocôndrias (1 mg) em 1 ml de meio de respiração, suplementado com rotenona 2 µM, foram incubadas na ausência das drogas (Controlo) ou com diferentes concentrações de MDMA e MTA (expressas em nmoles/mg de proteína como indicado pelos números junto aos traços do registo) durante 3 min antes da adição do succinato (Succ) (estado 4). Após 2 min de energização, as mitocôndrias foram suplementadas com ADP (150 nmoles/mg de proteína) para induzir o estado 3. As velocidades de respiração mitocondrial foram determinadas pelo consumo de O<sub>2</sub> usando um eléctrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark. Os registos são representativos de pelo menos 3 experiências com mitocôndrias de fígado de diferentes animais.



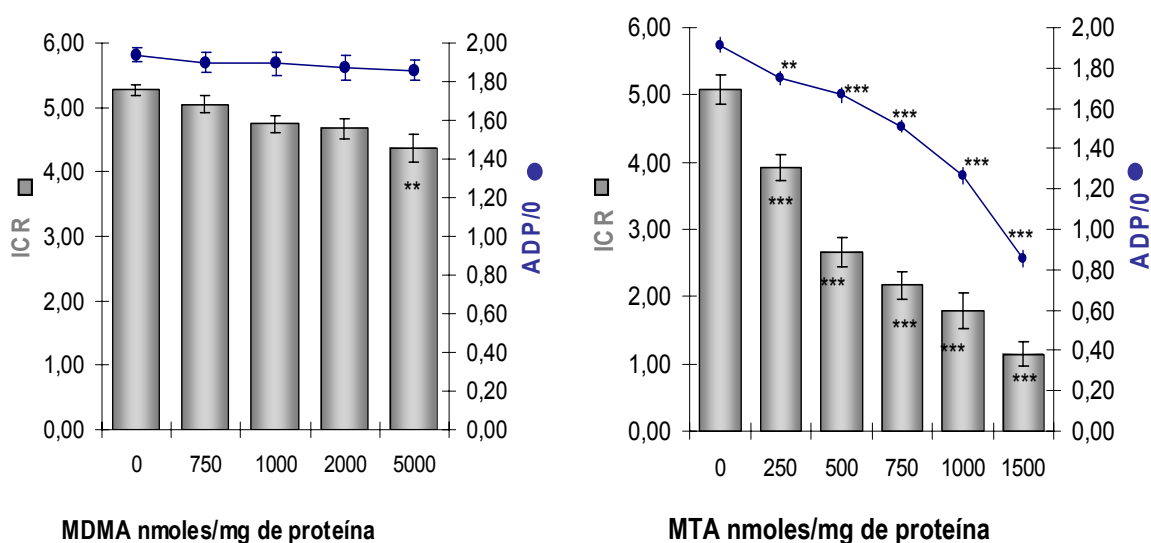
**Figura 3.3 – Efeitos da MDMA e MTA nos parâmetros bioenergéticos, índice de controlo respiratório (ICR) (barras) e no quociente ADP/O (•—•), em mitocôndrias de coração.** As mitocôndrias (0,5 mg) foram incubadas nas condições descritas na figura 3.1 na ausência das drogas (0) ou com diferentes concentrações de MDMA e MTA (expressas em nmoles/mg de proteína). Ambos os índices foram calculados como descrito nos Materiais e Métodos e os valores apresentados são a média  $\pm$  SD de 3 experiências com diferentes preparações mitocondriais. Análise estatística: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , significativamente diferentes quando comparados com os respectivos ensaios na ausência das drogas.

Nos estudos realizados com as mitocôndrias de fígado (Fig. 3.4) os efeitos da MDMA são idênticos aos observados em mitocôndrias de coração, não havendo alterações significativas nos quocientes bioenergéticos ICR e ADP/O até às concentrações utilizadas nas mitocôndrias de coração, apenas quando utilizada uma concentração de 5000 nmoles/mg de proteína é notório um decréscimo significativo no ICR (Fig. 3.4-MDMA). A pré-incubação das mitocôndrias com concentrações crescentes de MTA induz uma diminuição acentuada do ICR, o que evidencia uma alteração da integridade da membrana mitocondrial e uma diminuição do quociente ADP/O, sugerindo a perda da capacidade fosforilativa das mitocôndrias. Paralelamente, nas mitocôndrias de fígado para concentrações iguais ou superiores a 1500 nmoles/mg de proteína o índice ICR é próximo de 1 (Fig. 3.4-MTA), isto é a adição de ADP já não induz a estimulação da cadeia respiratória significando um efeito dissociador da cadeia respiratória do sistema fosforilativo o que evidencia uma maior sensibilidade das mitocôndrias de fígado para a MTA relativamente às mitocôndrias de coração.

## 1.2- Efeitos da MDMA e da MTA no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )

Os efeitos na eficiência fosforilativa das mitocôndrias de coração induzida pela MDMA e MTA foram confirmados seguindo as flutuações do  $\Delta\Psi$  associadas à respiração mitocondrial e ao ciclo fosforilativo induzido pelo ADP (Fig. 3.5). Como se observa, a adição de succinato às

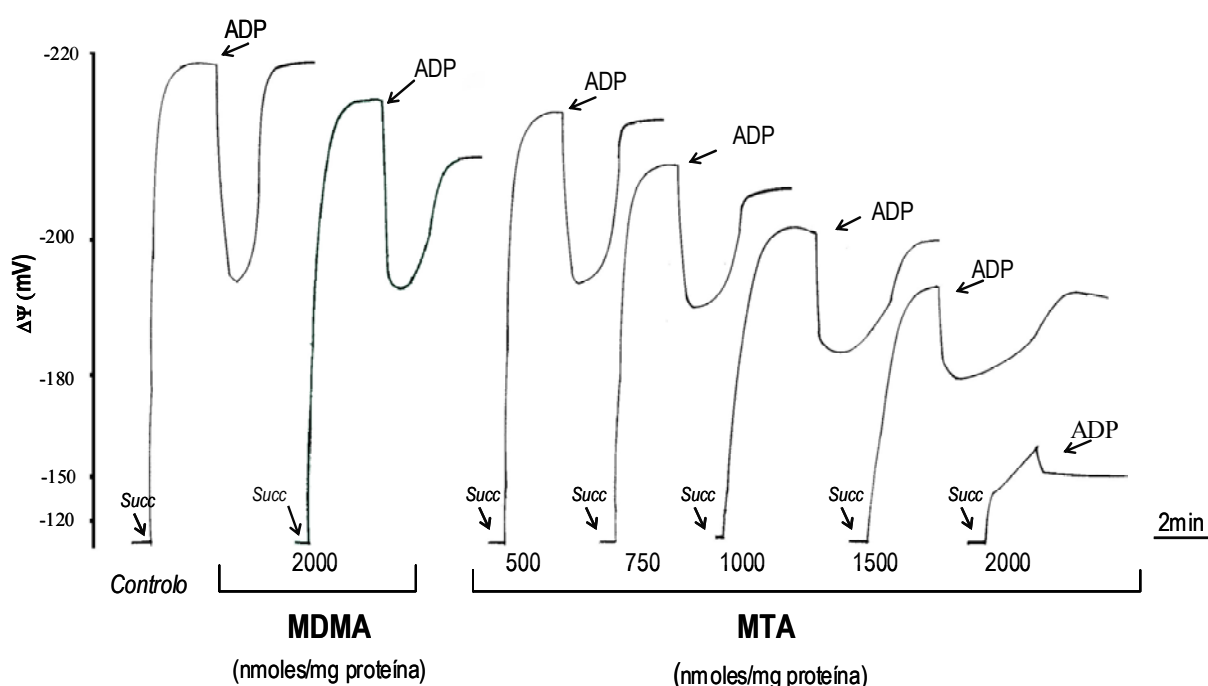
mitocôndrias induz o desenvolvimento de um  $\Delta\Psi$  de aproximadamente 220 mV (negativo no interior). A adição posterior de ADP (300 nmoles/mg proteína) após o equilíbrio do  $\Delta\Psi$ , que induz o estado 3 da respiração, promove um decréscimo imediato do  $\Delta\Psi$  para cerca de -190 mV, dado que a ATPsintase utiliza o  $\Delta\Psi$  para fosforilar o ADP adicionado. Após um curto intervalo de tempo, correspondente à fosforilação do ADP, a cadeia respiratória repõe o  $\Delta\Psi$  para valores próximos do valor inicial (estado 4) (Fig. 3.5-controlo).



**Figura 3.4 –Efeitos da MDMA e MTA no, índice de controlo respiratório (ICR) (barras) e no quociente ADP/O (•—•) em mitocôndrias de fígado**. As mitocôndrias (1 mg) foram incubadas nas condições descritas na figura 3.2 na ausência das drogas, (0) ou com diferentes concentrações de MDMA e MTA (expressas em nmoles/mg de proteína). Ambos os índices foram calculados como descrito nos Materiais e Métodos e os valores apresentados são a média  $\pm$  SD de 3 experiências com diferentes preparações mitocondriais. Análise estatística: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferentes quando comparados com os respectivos controlos na ausência de droga.

A pré-incubação das mitocôndrias de coração com MDMA até concentrações de aproximadamente 2000 nmoles/mg de proteína não afecta o  $\Delta\Psi$  desenvolvido (-220 mv), observando-se apenas um aumento não significativo no intervalo de tempo necessário para fosforilar todo o ADP adicionado e uma diminuição na capacidade de repolarização do  $\Delta\Psi$  após o ciclo fosforilativo (Fig. 3.5-MDMA). Estes efeitos da MDMA no potencial de membrana e ciclo fosforilativo são concordantes com os obtidos nas velocidades de consumo de oxigénio no estado 3 e 4 da respiração (Figs. 3.1 e 3.3) demonstrando que, de facto, a MDMA não afecta significativamente a bioenergética mitocondrial e a diminuição dos níveis celulares de ATP resultará, provavelmente, de alterações induzidas por contaminantes das pastilhas de *ecstasy* ou pelos seus metabolitos.

A pré-incubação das mitocôndrias de coração com MTA induz uma diminuição progressiva no  $\Delta\Psi$  em função da concentração da droga (Fig. 3.5-MTA). Adicionalmente, a despolarização do  $\Delta\Psi$  após a adição de ADP e a velocidade de repolarização diminuem também com o aumento das concentrações de MTA. A recuperação dos valores do  $\Delta\Psi$  antes e após fosforilação depende das condições de integridade membranar e da associação da cadeia respiratória com o sistema fosforilativo. Por sua vez, o intervalo de tempo necessário à repolarização do  $\Delta\Psi$  após o ciclo fosforilativo está relacionado com a eficiência fosforilativa das mitocôndrias e com a quantidade adicionada de ADP.



**Figura 3 5 – Efeitos da MDMA e MTA no potencial mitocondrial transmembranar ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias de coração.** As mitocôndrias (1 mg) foram adicionadas a 2 ml do meio de respiração suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$ ,  $\text{TPP}^+$  4  $\mu\text{M}$  e energizadas com succinato (Succ) 5 mM, após incubação a 30 °C durante 3 min na ausência (Controlo) e na presença de MTA e de MDMA cujas concentrações (expressas em nmoles/mg de proteína) estão indicadas pelos números adjacentes aos traços. O ADP (300 nmoles/mg de proteína), que induz o estado 3, foi adicionado após se ter atingido o equilíbrio do  $\Delta\Psi$ . O  $\Delta\Psi$  foi determinado usando um eléctrodo sensível ao  $\text{TPP}^+$  como descrito nos Materiais e Métodos. Os registos apresentados são representativos de experiências em 3 preparações mitocondriais diferentes.

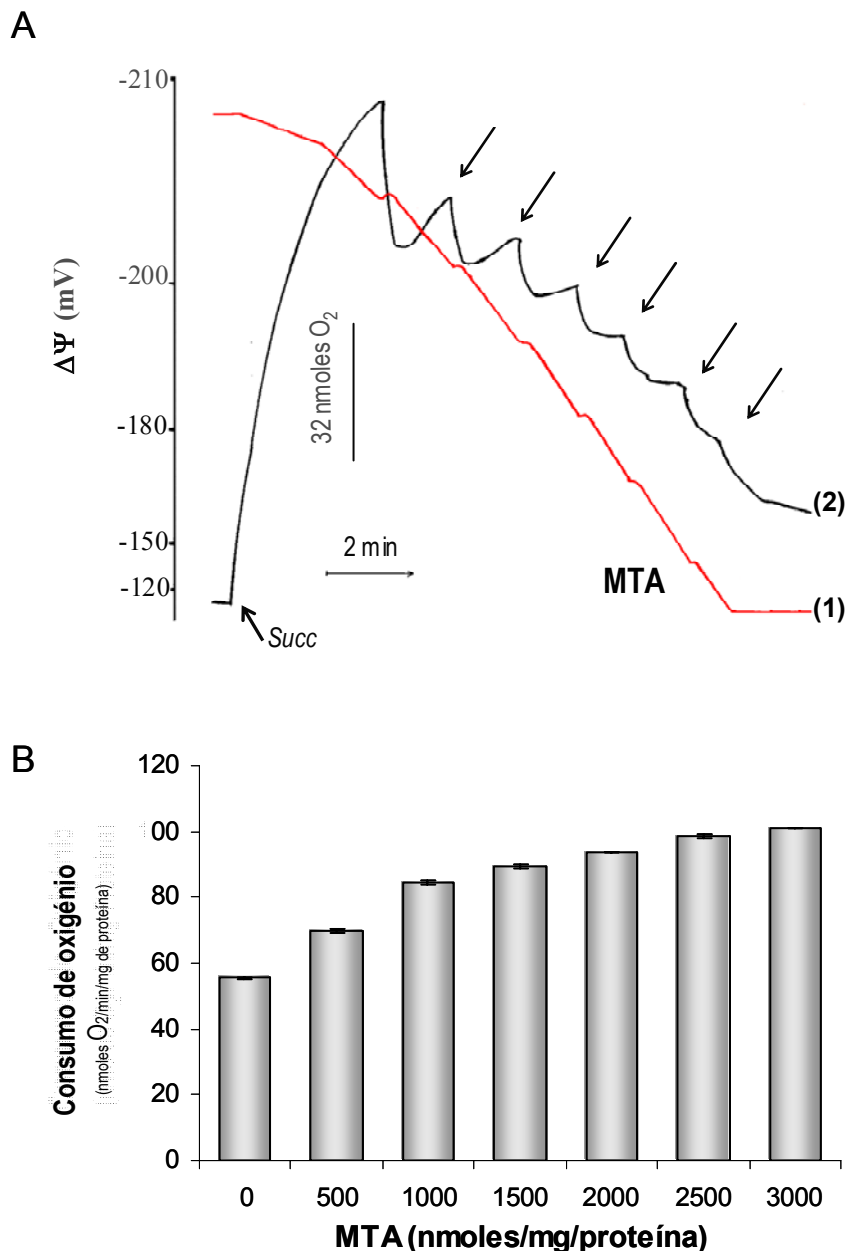
Como se observa na figura 3.5, a MTA em concentrações superiores a 2000 nmoles/mg proteína induz uma despolarização drástica do  $\Delta\Psi$  tornando as mitocôndrias incapazes de fosforilar o ADP adicionado. Estes resultados são concordantes com a diminuição significativa do ICR (ICR=1) e ADP/O induzida pela MTA (Fig.3.3-MTA), demonstrando que este contaminante das pastilhas de *ecstasy* dissocia a cadeia respiratória do sistema fosforilativo. Deste modo, a hipertermia, a rabdomiólise e a necrose celular observada em consumidores de *ecstasy* (Walubo and seger, 1999; Milroy *et al.*, 1996) poderá resultar da MTA presente nas pastilhas. Em paralelo, estudámos também

os efeitos da MDMA e MTA no  $\Delta\Psi$  de mitocôndrias de fígado (registos não apresentados). Verificámos que a pré-incubação com MDMA em concentrações elevadas não tem efeitos significativos nas flutuações do  $\Delta\Psi$  associadas ao ciclo fosforilativo, à semelhança do observado em mitocôndrias de coração (Fig. 3.5-MDMA) e de acordo com os efeitos os observados no consumo de  $O_2$  e na eficiência fosforilativa (Figs. 3.2 e 3.4). De igual modo, os efeitos da MTA nas mitocôndrias de fígado são idênticos aos observados em mitocôndrias de coração, observando-se uma despolarização drástica do  $\Delta\Psi$  e incapacidade para fosforilar o ADP adicionado, de acordo com os efeitos nos valores de ICR e ADP/O (Figs. 3.2 e 3.4). Contudo, as mitocôndrias de fígado apresentam uma maior susceptibilidade aos efeitos da MTA do que as isoladas do coração, uma vez que a pré-incubação das mitocôndrias de fígado com 1500 nmoles de MTA /mg proteína induz efeitos idênticos aos observados no coração com 2000 nmoles de MTA /mg de proteínas, à semelhança do observado no consumo de oxigénio e eficiência fosforilativa (Figs. 3.1 e 3.3).

### 1.3-Efeitos da MTA no $\Delta\Psi$ associado ao estado 4 da respiração

Nos estudos de consumo de  $O_2$  verificámos que a MTA estimula o estado 4 da respiração (Figs. 3.1 e 3.2) induzindo, todavia, uma diminuição do  $\Delta\Psi$  (Fig. 3.5). Assim, com o objectivo de clarificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos da MTA na respiração e  $\Delta\Psi$  estudámos a acção desta droga na despolarização do  $\Delta\Psi$  e na cadeia respiratória de mitocôndrias de coração. (Fig. 3.6). A suspensão mitocondrial foi titulada com adições sequenciais de MTA (500 nmoles/mg proteína) após energização com succinato (Fig. 3.6-A) e o estado 4 da respiração (traço 1) e o  $\Delta\Psi$  (traço 2) foram avaliados em simultâneo pela determinação da velocidade do consumo de  $O_2$  com um eléctrodo de Clark e o  $\Delta\Psi$  com um eléctrodo de TPP<sup>+</sup>, colocados na câmara fechada do eléctrodo de  $O_2$ . Como se observa na figura 3.6-A, a adição sequencial de MTA causa uma diminuição progressiva do  $\Delta\Psi$  (traço 2) e induz um aumento na velocidade de consumo de  $O_2$  no estado 4 da respiração (traço 1). Para concentrações de MTA superiores a 2000 nmoles /mg de proteína, verifica-se uma marcada despolarização do  $\Delta\Psi$  desenvolvido e incapacidade da cadeia respiratória para o susten (traço 2). Por outro lado, as velocidades de consumo de  $O_2$ , expressas em nmoles  $O_2$ /min/mg de proteína (Fig. 3.6-B), demonstram que a estimulação da velocidade respiratória no estado 4 aumenta progressivamente em função da concentração da droga e deixa de ser tão acentuada para concentrações superiores às 2000 nmoles/mg de proteína, justificando a diminuição abrupta do  $\Delta\Psi$  observada para estas concentrações de MTA (Fig. 3.6-B). Assim, estes resultados sugerem que a estimulação do estado 4 da respiração pela MTA ocorre para compensar a

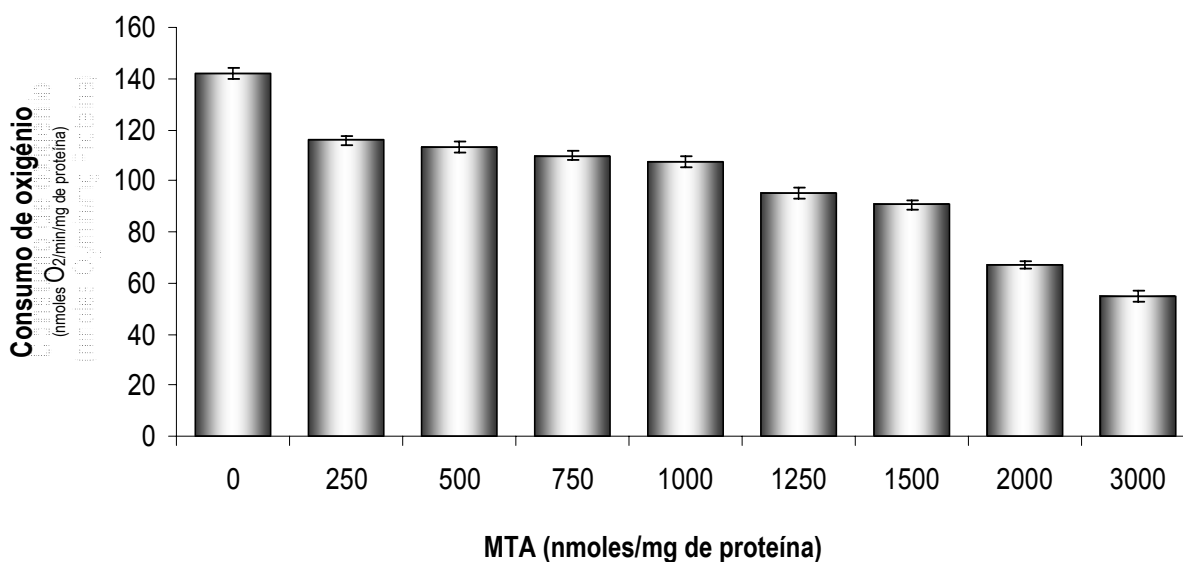
despolarização do  $\Delta\Psi$  devida, provavelmente, a uma permeabilidade passiva da membrana mitocondrial interna a prótons induzida por esta droga.



**Figura 3.6 – Efeitos da MTA no potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) associado ao estado 4 de respiração de mitocôndrias de coração.** As mitocôndrias (0,5 mg) foram adicionadas a 1 ml do meio de respiração suplementado com rotenona 2  $\mu$ M, TPP<sup>+</sup> 4  $\mu$ M e energizadas com succinato (Succ) 5 mM. (A)- A velocidade de respiração mitocondrial no estado 4 (traço 1) e o  $\Delta\Psi$  (traço 2) foram avaliados simultaneamente com um eléctrodo de  $O_2$  tipo Clark e um eléctrodo selectivo para o TPP<sup>+</sup>, respectivamente, colocados na mesma câmara. Após o equilíbrio do  $\Delta\Psi$  a suspensão mitocondrial foi titulada com adições sequenciais de MTA (500 nmoles/mg de proteína) em intervalos de 2 min. Os registos representados são típicos de experiências com diferentes suspensões mitocondriais. (B) As velocidades de consumo de  $O_2$ , devidas à adição de MTA (A-traço-1), foram determinadas em nmoles  $O_2$ /min/mg de proteína em função da concentração da droga. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  SD de 3 experiências com diferentes preparações mitocondriais.

#### 1.4- Efeitos da MTA na eficiência fosforilativa (estado 3 da respiração mitocondrial)

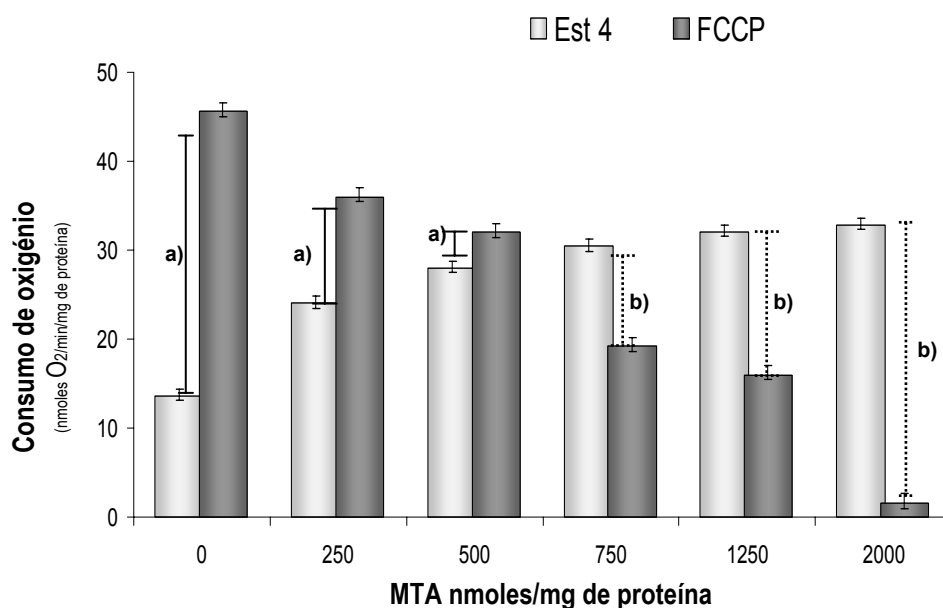
Para clarificar os mecanismos dos efeitos da MTA na fosforilação oxidativa mitocondrial estudámos a sua acção em condições de fosforilação permanente, isto é, na presença de ADP saturante (1 mM) (Fig. 3.7). Como se observa, a pré-incubação da suspensão mitocondrial com concentrações de MTA até 1000 nmoles/mg proteína diminui a velocidade de estimulação do consumo de oxigénio no estado 3 da respiração mitocondrial independentemente da concentração sugerindo uma ligeira diminuição na velocidade de fosforilação das mitocôndrias. Porém, para concentrações superiores, observa-se uma diminuição acentuada do consumo de O<sub>2</sub> em função da concentração, significando que, e de acordo com os efeitos no quociente ADP/O (Fig. 3.3), esta droga afecta a capacidade fosforilativa das mitocôndrias. Todavia, os efeitos no  $\Delta\Psi$  usado para fosforilar o ADP (Figs. 3.5 e 3.6-A) são mais significativos do que os observados na fosforilação oxidativa (Fig. 3.7). Estes resultados sugerem que as alterações na capacidade de síntese ATP induzidas por esta droga são devidas essencialmente à diminuição do potencial de membrana, como consequência da permeabilização da membrana interna a prótons, em vez de uma diminuição na actividade da cadeia respiratória ou do sistema fosforilativo.



**Figura. 3.7– Efeitos da MTA na eficiência fosforilativa de mitocôndrias de coração na presença de ADP saturante.** As mitocôndrias (1mg) foram adicionadas a 1 ml do meio de respiração suplementado com rotenona 2  $\mu$ M e incubadas a 30°C durante 3 minutos na ausência (0) e na presença de diferentes concentrações de MTA (nmoles/mg de proteína) antes da energização com succinato (Succ) 5 mM. A respiração mitocondrial, estimulada pela adição de ADP saturante (1 mM) foi determinada pelo consumo de O<sub>2</sub>, expresso em nmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína, usando um eléctrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  SD de 3 experiências com diferentes preparações mitocondriais.

### 1.5- Efeitos da MTA no consumo de oxigénio em mitocôndrias de coração quando dissociadas por FCCP

Para clarificar os mecanismos da MTA no  $\Delta\Psi$ , bem como da sua acção dissociadora na cadeia respiratória e sistema fosforilativo, estudámos os efeitos desta droga na cadeia respiratória quando dissociada pela adição de um protonóforo (FCCP) (Fig. 3.8). Quando a cadeia respiratória se encontra dissociada do sistema de consumo de protões, as variações na permeabilidade da membrana não interferem com a cadeia respiratória, uma vez que a permeabilidade passiva a protões está activada ao máximo. Na ausência de MTA (0), a adição de succinato estimula o consumo de oxigénio pela suspensão mitocondrial designado por estado 4 da respiração (Fig. 3.8-Est.4). Posteriormente, a adição de FCCP estimula a cadeia respiratória, observando-se um aumento do consumo de oxigénio durante a respiração mitocondrial associada a uma dissipação do  $\Delta\Psi$  designado de estado 4 após adição de FCCP (Fig. 3.8-FCCP).



**Figura. 3.8– Efeitos da MTA no estado 4 da respiração de mitocôndrias de coração dissociadas por FCCP.** As mitocôndrias (1mg) foram adicionadas a 1 ml do meio de respiração suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$  e incubadas a 30°C durante 3 minutos na ausência (0) e na presença de diferentes concentrações de MTA (nmoles/mg de proteína) antes da energização com succinato (Succ) 5 mM. A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> (nmoles O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) após a adição de succinato (Est.4) e estimulada pela subsequente adição de FCCP 1  $\mu\text{M}$  foi determinada com um eléctrodo de oxigénio tipo Clark. O traço (a) junto às barras representa o aumento no consumo de O<sub>2</sub> no estado 4 induzido pela adição de FCCP e (b) representa a diminuição da estimulação pelo FCCP no consumo de O<sub>2</sub> no estado 4 da respiração na presença de MTA. Os valores apresentados são a média  $\pm$  SD de 3 experiências com diferentes preparações mitocondriais.

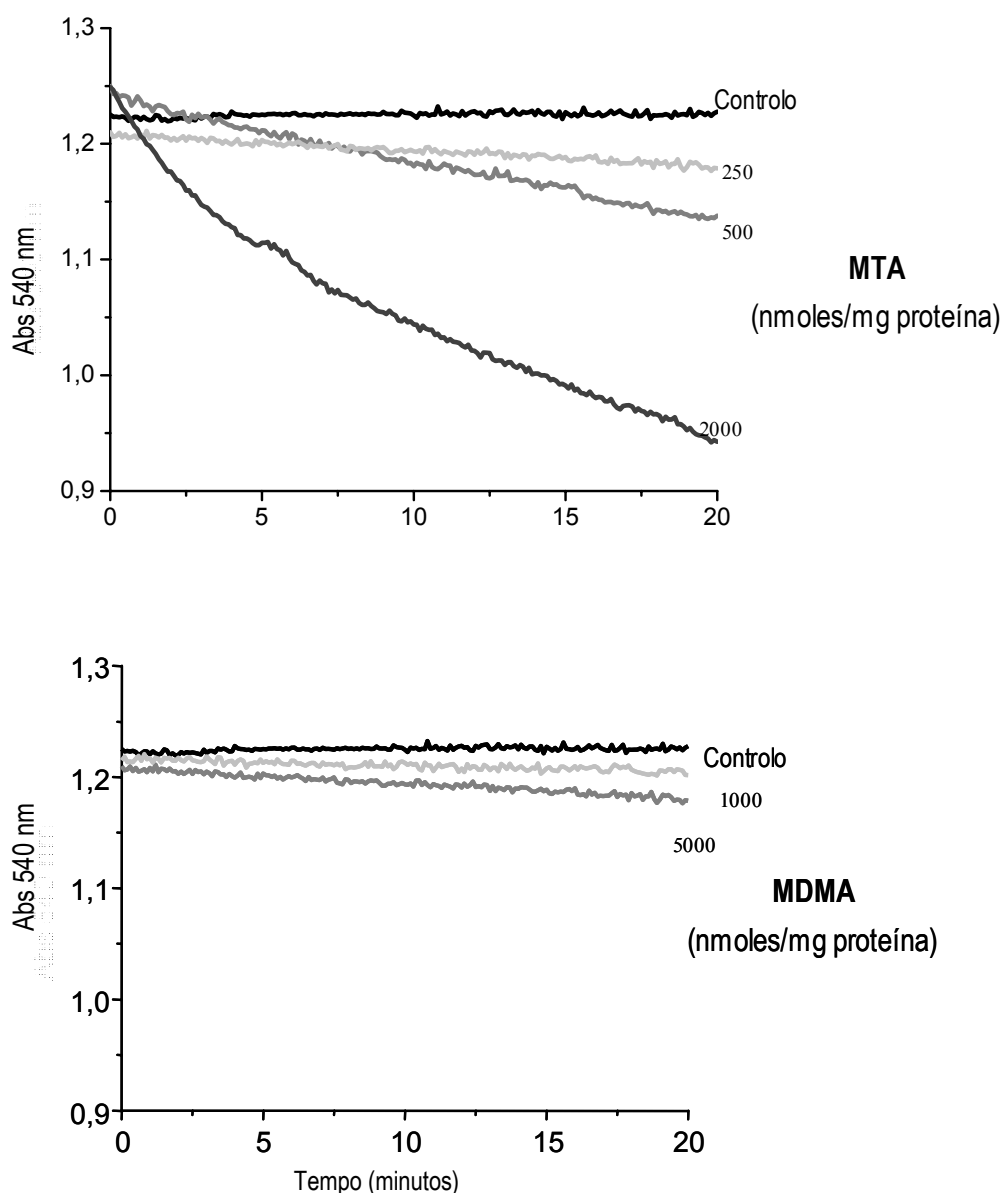


A pré-incubação com baixas concentrações de MTA (< 750 nmoles/mg de proteína) aumenta gradualmente a estimulação no estado 4 (Fig. 3.8-Est.4), verificando-se uma diminuição na estimulação da velocidade da respiração mitocondrial induzida pela adição de FCCP (Fig. 3.8-FCCP), cuja diferença é designada na figura pelos traços a). Todavia, para concentrações superiores, a MTA não induz um aumento gradual do estado 4 da respiração (Fig. 3.8-Est 4) e o efeito estimulante do FCCP na cadeia respiratória deixa de se observar (Fig. 3.8-FCCP), conforme representado pelos traços b), sugerindo que a MTA induziu uma estimulação máxima da cadeia respiratória sem efeito adicional do FCCP devido, provavelmente, a uma permeabilização da membrana a protões como consequência de um efeito protonófero ou de uma acção destrutiva na integridade membranar, para além de a MTA poder induzir em altas concentrações um efeito inibidor nos complexos da cadeia respiratória.

### **1.6- Efeitos da MDMA e MTA na integridade membranar das mitocôndrias**

No sentido de verificar se a permeabilização da membrana mitocondrial a protões é uma consequência do efeito protonófero ou de uma acção destrutiva na integridade membranar induzida pela MTA, estudámos os efeitos desta droga no comportamento osmótico de mitocôndrias intactas e não energizadas. Quando a integridade física da membrana mitocondrial é afectada por um determinado composto há entrada de água para a matriz, já que o seu meio é hipertónico relativamente ao meio extramitocondrial. A difusão de água para o interior da matriz induz o intumescimento mitocondrial com consequente diminuição da absorvência aparente da suspensão de mitocôndrias a 540 nm. Estes ensaios foram realizados durante 20 minutos em suspensões de mitocôndrias não energizadas, na ausência das drogas (Fig. 3.9 -Controlo) e na presença de diferentes concentrações de MDMA ou MTA (nmoles/mg de proteína) e a absorvência foi avaliada a 540 nm. Como se observa (Fig. 3.9), a absorvência aparente da suspensão mitocondrial mantém-se constante ao longo do tempo de incubação, sugerindo que, na ausência da droga, as mitocôndrias conservam a integridade física da membrana (Fig. 3.9-Controlo). No entanto, quando as mitocôndrias são incubadas na presença de MTA (Fig. 3.9-MTA) verifica-se um pequeno decréscimo, dependente da concentração, na dispersão da luz de mitocôndrias não energizadas em suspensão (Fig. 3.9), reflectindo um ligeiro efeito desta droga na integridade da membrana mitocondrial. Este efeito torna-se mais evidente para concentrações de MTA acima de 2000 nmoles/mg de proteína. Em mitocôndrias de fígado energizadas com succinato (resultados não apresentados), a MTA induz uma diminuição da absorvência aparente a 540 nm à semelhança do observado em mitocôndrias não energizadas (Fig. 3.9), sugerindo que esta droga induz alterações na integridade física da membrana mitocondrial com consequentes alterações na sua

permeabilidade. Comparativamente, estudámos também os efeitos da MDMA no comportamento osmótico das mitocôndrias (Fig. 3.9-MDMA). Como se observa, a incubação das mitocôndrias com elevadas concentrações de MDMA não induz alterações na absorvência aparente ao longo do tempo, sugerindo que esta droga não induz alterações na organização e integridade física da membrana de acordo com a ausência de efeitos na bioenergética mitocondrial.



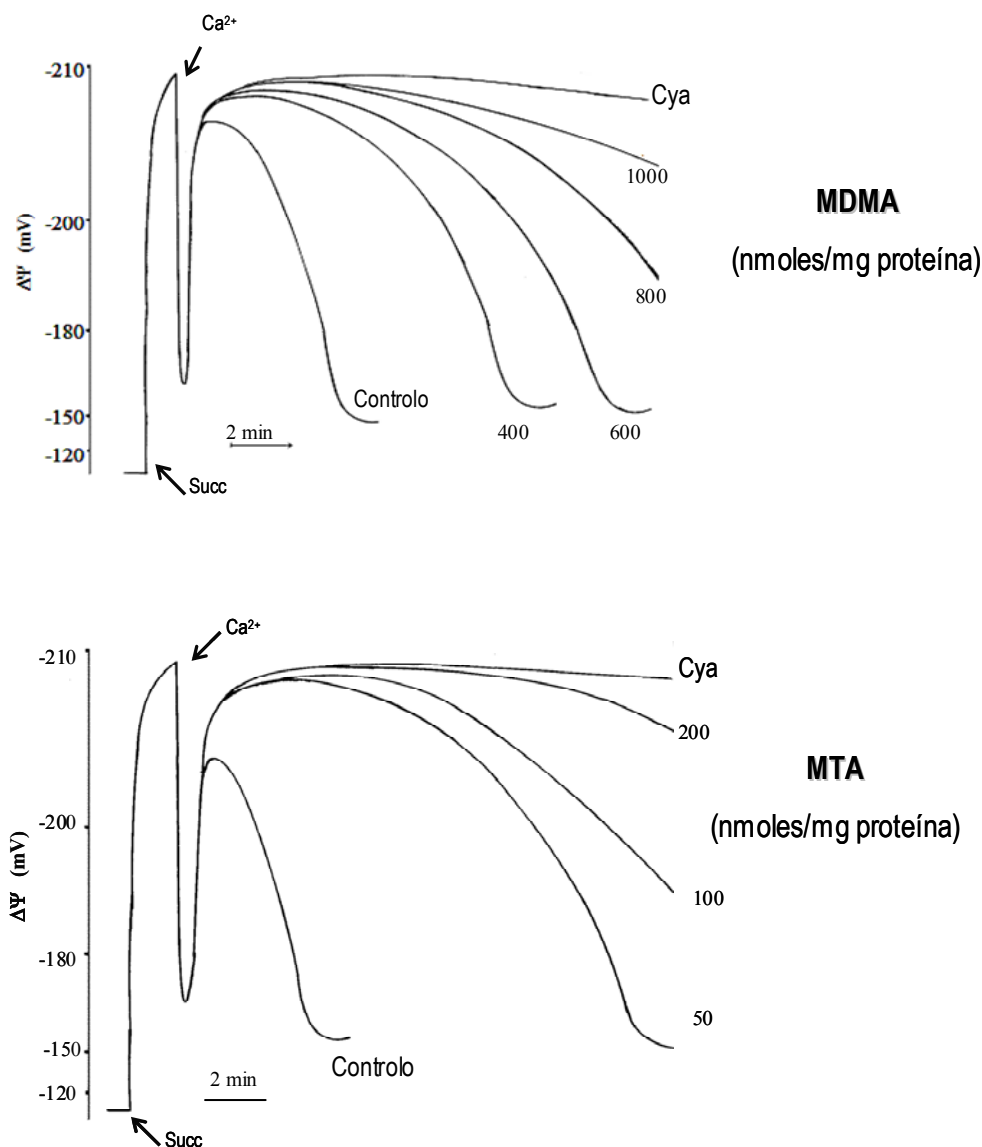
**Figura 3.9 – Efeitos da MTA e MDMA no comportamento osmótico de mitocôndrias de fígado.** As mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram adicionadas a 2 ml do meio de reacção contendo sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, EGTA 0,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4 suplementado com rotenona 2 µM. As mitocôndrias foram pré-incubadas a 30°C durante 3 minutos na ausência (Controlo) e na presença de diferentes concentrações (expressas em nmoles/mg de proteína) de MDMA e MTA conforme indicado pelos números adjacentes aos registos. A intumescência das mitocôndrias foi avaliada pela determinação da absorvência (Abs) a 540 nm durante 20 minutos. Os registos são representativos de experiências com diferentes preparações mitocondriais.

## **2- Efeitos da MDMA e da MTA na permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) induzida por $\text{Ca}^{2+}$ e Pi em mitocôndrias de coração e de fígado.**

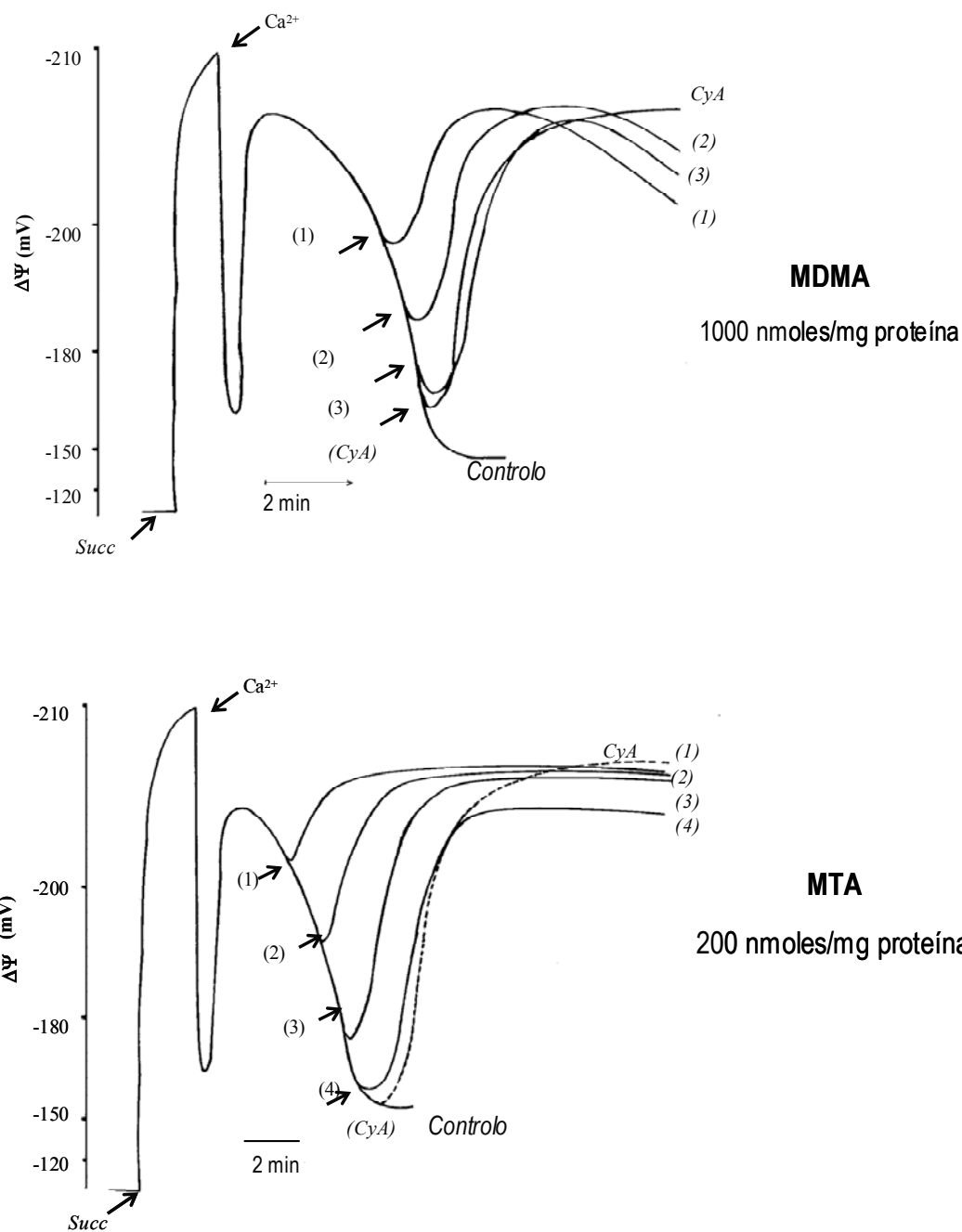
### **2.1- Efeito da MDMA e da MTA no potencial transmembranar das mitocôndrias associado ao transporte de $\text{Ca}^{2+}$**

A acção da MDMA e da MTA foi analisada na permeabilidade transitória de mitocôndrias (MPT) de coração e de fígado, com o objectivo de clarificar os mecanismos responsáveis pelas alterações na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  celular, provavelmente envolvidos na disfunção de órgãos e nos mecanismos de morte celular induzida por ambas as drogas. O decréscimo do potencial transmembranar das mitocôndrias ( $\Delta\Psi$ ) é uma das características da indução da MPT, uma vez que a permeabilização da membrana induz a entrada de prótons para o interior da matriz, onde o pH é mais alcalino, com dissipação do gradiente de prótons e consequentemente, do  $\Delta\Psi$ . A figura 3.10 representa as alterações do  $\Delta\Psi$  de mitocôndrias de fígado induzidas por  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfato e a prevenção desses efeitos pela MDMA e MTA. Como se pode observar na figura 3.10, as mitocôndrias desenvolvem um  $\Delta\Psi$  que atinge o estado de equilíbrio decorridos aproximadamente 2 minutos. A adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (140 nmoles/mg de proteína) provoca uma despolarização seguida de uma rápida repolarização (após todo o  $\text{Ca}^{2+}$  ter sido transportado para o interior da mitocôndria) mas que não atinge o potencial inicial. Contudo ao final de sensivelmente 6 minutos as mitocôndrias sofrem uma despolarização total. A adição de diferentes concentrações de MDMA (400 – 1000 nmoles/mg de proteína) ou de MTA (50-200 nmoles/mg de proteína) às mitocôndrias e sua incubação durante 3 minutos, antes de iniciar a reacção com succinato resulta numa maior capacidade de as mitocôndrias susterem o  $\Delta\Psi$  (Figs. 3.10- MDMA e 3.10-MTA). A pré-incubação de CyA durante 3 minutos, a adição de uma concentração de cálcio idêntica à usada na situação controlo induziu uma despolarização reversível com capacidade das mitocôndrias para manterem  $\Delta\Psi$  (Fig. 3.10-CyA) o que demonstra que os efeitos na despolarização induzidos por cálcio no  $\Delta\Psi$  são devidos à inibição da MPT pela CyA. Quando a CyA foi adicionada no decorrer do processo de despolarização induzida pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , observou-se uma recuperação e manutenção do  $\Delta\Psi$  até próximo do valor inicial (Fig. 3.11-CyA). A adição de MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) e MTA (200 nmoles/mg de proteína) em diferentes fases do processo de despolarização como o indicado pelas setas na Fig. 3.11) conferiu às mitocôndrias a capacidade para reporem e susterem o potencial. Pelo facto de a indução da MPT ser prevenida pela adição de CyA, um potente e

específico inibidor da MPT, sugere que estes compostos nas concentrações utilizadas inibem a MPT, tendo a MTA uma maior capacidade de inibição.

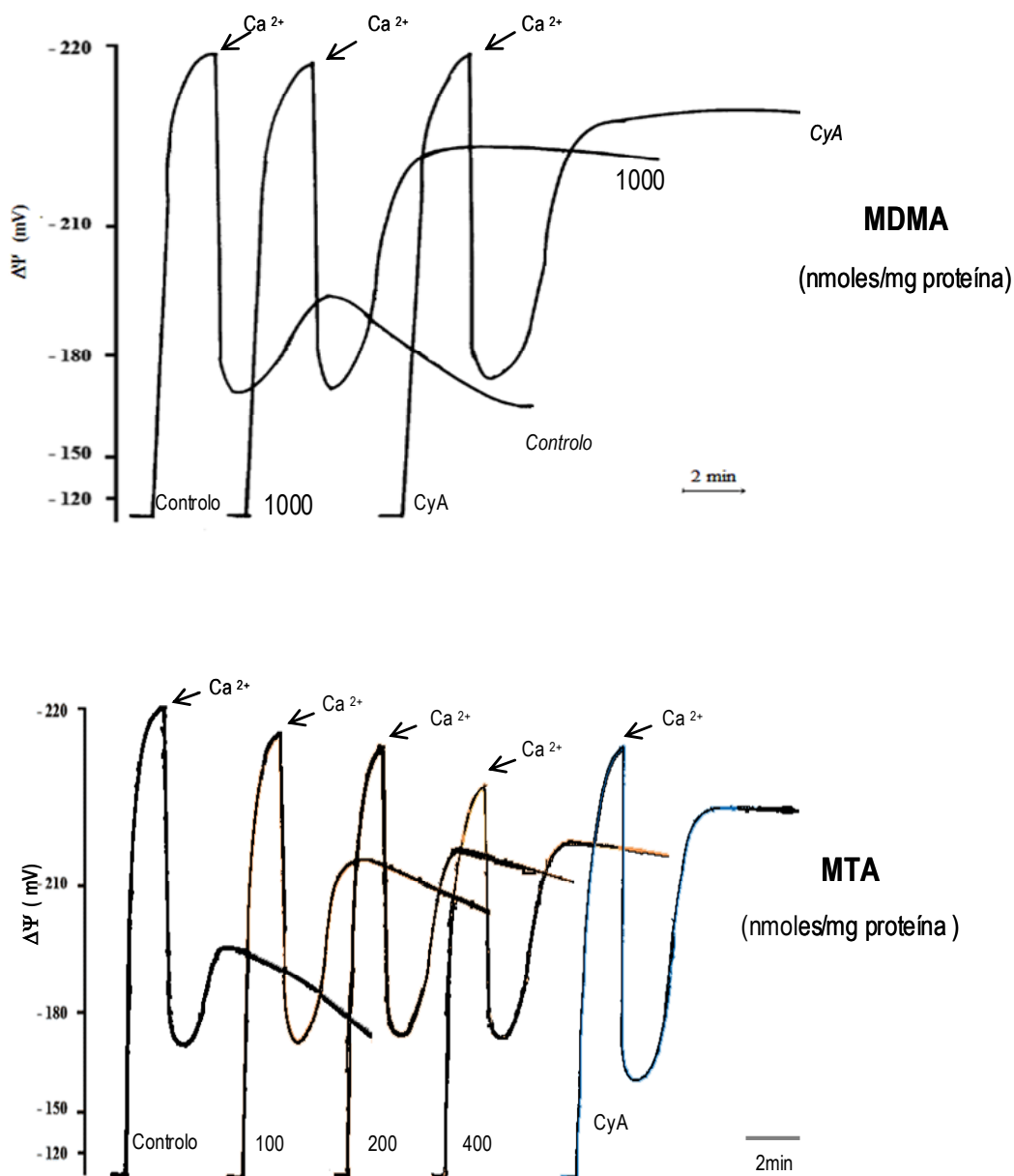


**Figura. 3.10 – Efeitos da MDMA e MTA no potencial de membrana mitocondrial no ( $\Delta\Psi$ ) em mitocôndrias de fígado associado à indução de MPT por  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi.** As mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram adicionadas a 2 ml do meio de reacção suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$ ,  $\text{TPP}^+$  4  $\mu\text{M}$  e energizadas com succinato (Succ) 5 mM, na ausência (Controlo) e na presença de MTA e de MDMA cujas concentrações (expressas em nmoles/mg proteína) estão indicadas pelos números adjacentes aos traços. O  $\text{Ca}^{2+}$  (140 nmoles/mg de proteína) foi adicionado após equilíbrio do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ). O  $\Delta\Psi$  foi avaliado com um eléctrodo sensível ao  $\text{TPP}^+$  conforme o descrito em Materiais e Métodos. Os registos apresentados são representativos de experiências em 3 preparações mitocondriais diferentes.



**Figura 3.11 – Efeitos da MDMA e MTA na despolarização do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) após indução de MPT por  $Ca^{2+}$  e Pi.** As reacções controlo decorreram nas condições descritas na Fig. 3.10. A MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) e MTA (200 nmoles/mg de proteína) foram adicionadas em tempos diferentes do processo de despolarização como o indicado junto aos traços dos dois registos. A CyA foi igualmente adicionada no decorrer da despolarização (CyA). A despolarização e a repolarização mitocondriais foram avaliadas seguindo o  $\Delta\Psi$  com um eléctrodo sensível ao  $TPP^+$ . Os traços são representativos de quatro experiências separadas realizadas em diferentes preparações mitocondriais.

Os efeitos destas drogas foram também estudados na MPT induzida em mitocôndrias de coração (Fig. 3.12). A concentração de cálcio necessária para induzir a despolarização do  $\Delta\Psi$  em mitocôndrias de coração foi mais elevada (400 nmoles/mg de proteína) do que nas mitocôndrias de fígado, sugerindo uma maior capacidade para reterem o  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado.

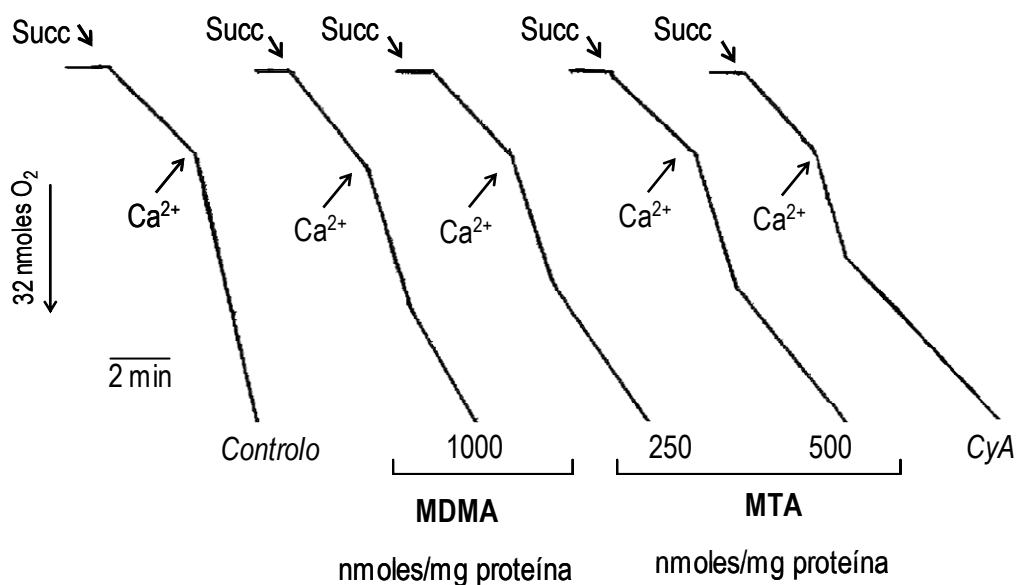


**Figura. 3.12 – Efeitos da MDMA e MTA no potencial de membrana mitocondrial no  $\Delta\Psi$  associado ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de coração.** As mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram adicionadas em 2 ml de meio de reacção a 30°C, suplementado com  $\text{TPP}^+$  4  $\mu\text{M}$  e rotenona 2  $\mu\text{M}$  e energizadas com succinato (*Controlo*). O  $\text{Ca}^{2+}$  (400 nmoles/mg de proteína) foi adicionado após equilíbrio do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ). As mitocôndrias foram pré-incubadas durante 3 min na presença de diferentes concentrações de MDMA e MTA indicadas junto aos traços do registo (expressas em nmoles/mg proteína) e de CyA (CyA). O  $\Delta\Psi$  foi avaliado com um eléctrodo sensível ao  $\text{TPP}^+$  conforme descrito em Materiais e Métodos. Os registos são típicos de quatro experiências com diferentes preparações mitocondriais.

Como se pode observar na figura 3.12, a cadeia respiratória após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  repõe parcialmente o potencial mas as mitocôndrias não têm a capacidade de sustentar esse potencial, ocorrendo uma despolarização irreversível (controlo). A pré-incubação durante 3 minutos com MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) ou com MTA (100-400 nmoles/mg de proteína) inibe a despolarização do potencial de membrana causado pelo excesso de  $\text{Ca}^{2+}$ . O efeito destas drogas é muito semelhante ao observado quando foi feita a pré incubação das mitocôndrias de coração com CyA (Fig. 3.12-CyA), sugerindo que ambas as drogas previnem a indução de MPT. A MTA é mais potente dado que foram necessárias menores concentrações (> 200 nmoles/mg de proteína) para se verificar um efeito idêntico ao da MDMA, que só conferiu capacidade às mitocôndrias em sustentar o  $\Delta\Psi$  para concentrações iguais ou superiores a 1000 nmoles/mg de proteína.

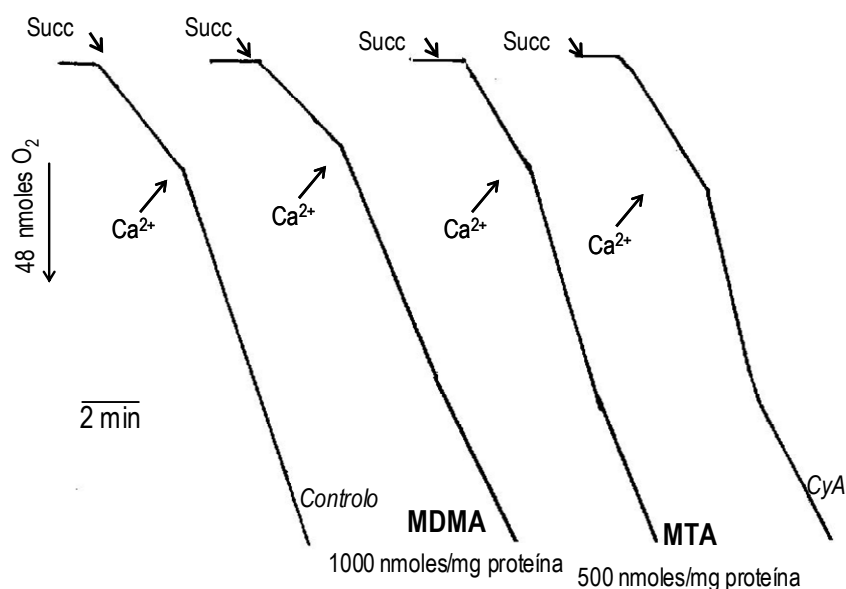
## 2.2- Efeito da MDMA e da MTA na respiração mitocondrial estimulada por $\text{Ca}^{2+}$

A indução da MPT por  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi em mitocôndrias de fígado (Fig. 3.13) e coração (Fig. 3.14) é também evidenciada pelo efeito na respiração das mitocôndrias. Para repor o  $\Delta\Psi$  gasto no transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , a cadeia respiratória é estimulada de forma que ocorre um aumento do consumo de oxigénio associado ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  para a matriz. Assim em mitocôndrias energizadas com succinato, observa-se um aumento do consumo de oxigénio pela suspensão de mitocôndrias quando se adiciona  $\text{Ca}^{2+}$  (200 nmoles/mg proteína) (Fig. 3.13 -controlo).



**Figura 3.13 – Efeitos da MDMA e MTA na respiração mitocondrial associada ao transporte de cálcio em mitocôndrias de fígado.** As mitocôndrias (1 mg/ml) foram adicionadas a meio de reacção suplementado com rotenona 2  $\mu\text{M}$  e energizadas com succinato 5 mM (Succ). O consumo de oxigénio foi avaliado a 30°C com um eléctrodo de oxigénio tipo Clark. O  $\text{Ca}^{2+}$  (200 nmoles/mg de proteína) foi adicionado após a energização das mitocôndrias com succinato. As mitocôndrias foram incubadas na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações de MDMA, MTA como indicado pelos números junto aos traços do registo. Os registos apresentados são representativos de experiências em 3 preparações mitocondriais diferentes.

Todavia, o  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado originou um aumento do consumo de  $\text{O}_2$  que não retomou o seu valor inicial, sugerindo que esta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  induziu a MPT, ocorrendo uma difusão dos prótons para o interior da matriz mitocondrial com conseqüente estimulação da cadeia respiratória. Quando as mitocôndrias foram pré incubadas durante 3 minutos com MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) ou MTA (250-500 nmoles/mg de proteína) verifica-se que a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  induziu um aumento transitório do consumo de oxigénio que retoma o seu valor inicial após todo o  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado ao meio de reacção ser transportado para a matriz mitocondrial (Figs. 3.13-MDMA e MTA). A pré incubação com CyA, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulou a velocidade do consumo de  $\text{O}_2$  pela cadeia respiratória e após o  $\text{Ca}^{2+}$  ter sido acumulado a velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  voltou ao valor inicial antes da adição do  $\text{Ca}^{2+}$  ao contrário do observado no controlo (Fig. 3.13-CyA), sugerindo que a dissociação é devida à indução de MPT.



**Figura 3.14 – Efeitos da MDMA e MTA na respiração mitocondrial associada ao transporte de cálcio em mitocôndrias de coração.** As mitocôndrias foram adicionadas (1 mg) a 1 ml de meio de reacção suplementado com rotenona  $2 \mu\text{M}$  e energizadas com succinato 5 mM (Succ). O consumo de oxigénio foi avaliado a  $30^\circ\text{C}$  com um eléctrodo de oxigénio tipo Clark. O  $\text{Ca}^{2+}$  (600 nmoles/mg de proteína) foi adicionado após a energização das mitocôndrias com succinato. As mitocôndrias foram incubadas na ausência (controlo) e na presença de MDMA, MTA como indicado pelos números junto aos traços do registo. Realizou-se uma pré-incubação com CyA durante 3 minutos como o indicado junto ao traço.

Assim podemos concluir que os efeitos da MDMA e MTA no consumo de oxigénio associado ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  resultam da inibição da MPT pelas duas drogas de acordo com os efeitos observados na despolarização do  $\Delta\Psi$  (Figs. 3.10 e 3.11). Os efeitos da MDMA e MTA foram também avaliadas na respiração de mitocôndrias de coração, quando foi induzida a MPT com  $\text{Ca}^{2+}$  mais fosfato. A MPT foi induzida como descrito na a figura 3.13, no entanto a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$

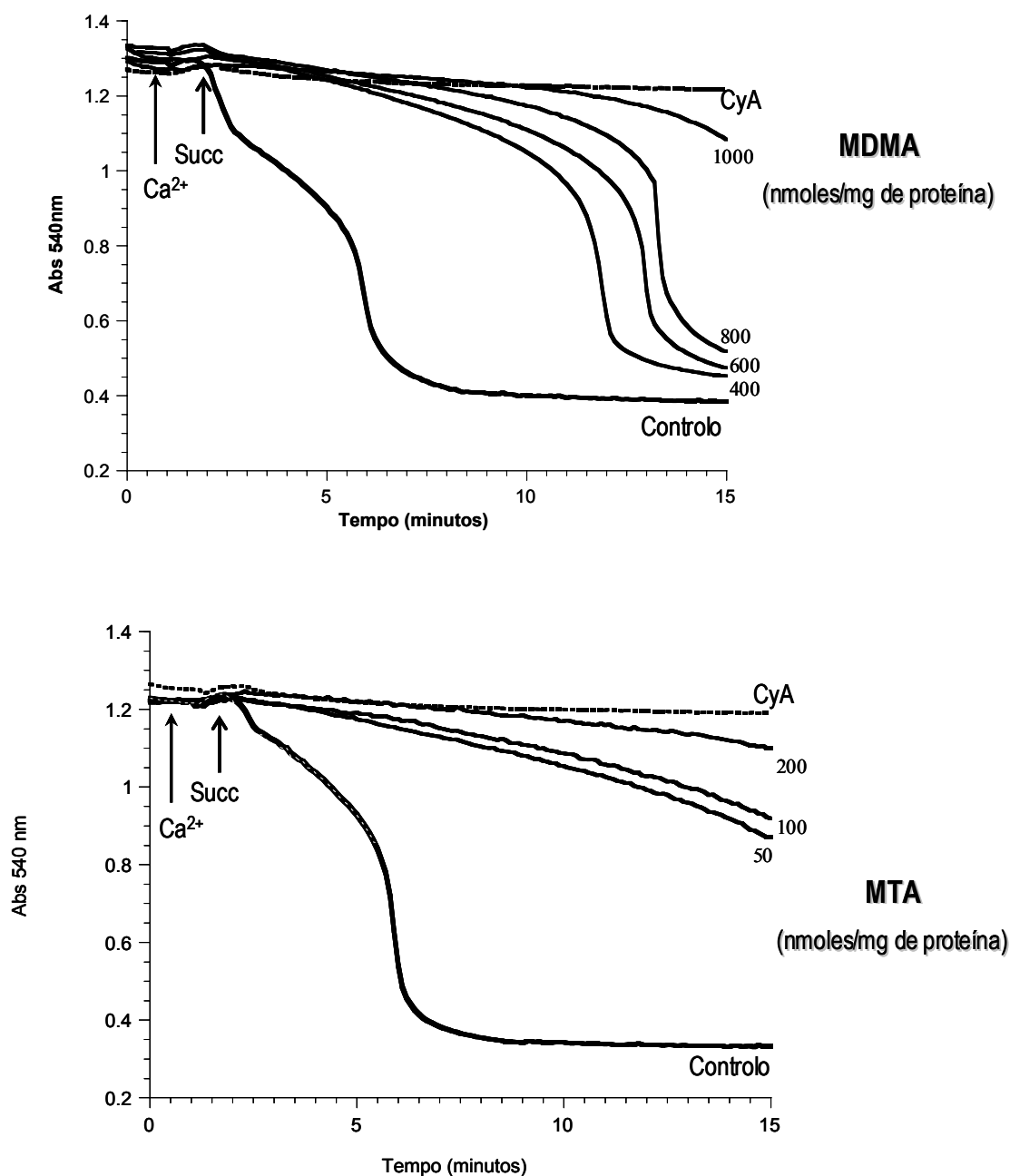


necessária para induzir a MPT foi superior, cerca de 600 nmoles/mg de proteína (Fig. 3.14-Controlo). Como se pode verificar, a pré-incubação com MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) ou MTA (500 nmoles/mg de proteína) conferiu às mitocôndrias a capacidade de retomarem os valores iniciais de consumo de  $O_2$  após todo o  $Ca^{2+}$  adicionado ao meio de reacção ser transportado para a matriz mitocondrial (Fig. 3.14-MDMA e MTA) à semelhança do que sucedeu quando a suspensão mitocondrial foi pré-incubada com CyA (Fig. 3.14-CyA), de acordo com os resultados obtidos

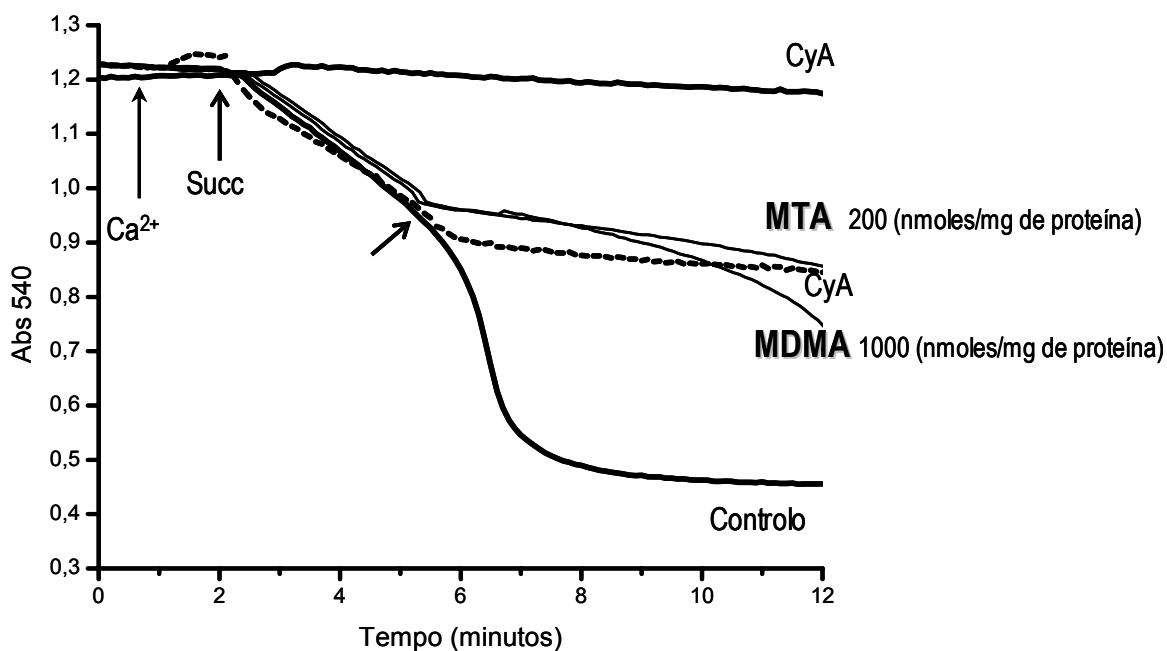
### **2.3- Efeito da MDMA e da MTA no intumescimento mitocondrial dependente de $Ca^{2+}$**

A indução da MPT pode também ser estudada em mitocôndrias isoladas determinação do intumescimento mitocondrial, avaliando o decréscimo da absorvência a 540 nm. Com o objectivo de estudar os efeitos da MDMA e MTA no comportamento osmótico das mitocôndrias de fígado, foram realizados ensaios em que decorrido 1 minuto após a adição de  $Ca^{2+}$  (140 nmoles/mg de proteína) se iniciou a reacção com a adição de succinato 5 mM observando-se um decréscimo da absorvência (Fig.3.15-Controlo), provavelmente devido à indução da MPT. Para confirmar se o decréscimo de absorvência ocorrido na presença de  $Ca^{2+}$  resulta da indução da MPT, adicionámos CyA (1 $\mu$ M) ao meio de reacção antes e após o inicio do ensaio com succinato e verificámos que não ocorreu decréscimo de absorvência (Fig. 3.15- CyA). Assim, a intumescência observada resulta da indução de MPT pela acumulação de  $Ca^{2+}$  pelas mitocôndrias. Quando a suspensão mitocondrial foi incubada durante 3 minutos com a MDMA (400-1000 nmoles/mg de proteína) e MTA (50-200 nmoles/mg de proteína) antes da adição do  $Ca^{2+}$  o decréscimo da intensidade de absorvência observado foi diminuindo em função das concentrações crescentes das drogas (Fig. 3.15-MDMA e MTA) sendo que a MTA é mais potente, uma vez que foi apenas necessário utilizar concentrações de 200 nmoles/mg de proteína.

O efeito da CyA e destas drogas foi também estudado pela adição à suspensão de mitocôndrias no decurso do processo de intumescimento. Na figura 3.16 podemos verificar que a adição de CyA no decurso do processo de intumescimento inibe o decréscimo da absorvência (Fig. 3.16-CyA) em mitocôndrias de fígado e podemos também observar que a adição de MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) e MTA (200 nmoles/mg de proteína) no decorrer da indução de MPT (Fig. 3.16-MDMA e MTA) têm um efeito idêntico à CyA, indicando portanto que estas drogas inibem a MPT dependente de  $Ca^{2+}$ . À semelhança do observado anteriormente quando as mitocôndrias são pré-incubadas com a droga. De igual modo a MTA é mais potente (200 nmol/mg de proteína (Fig.3.16-MTA).



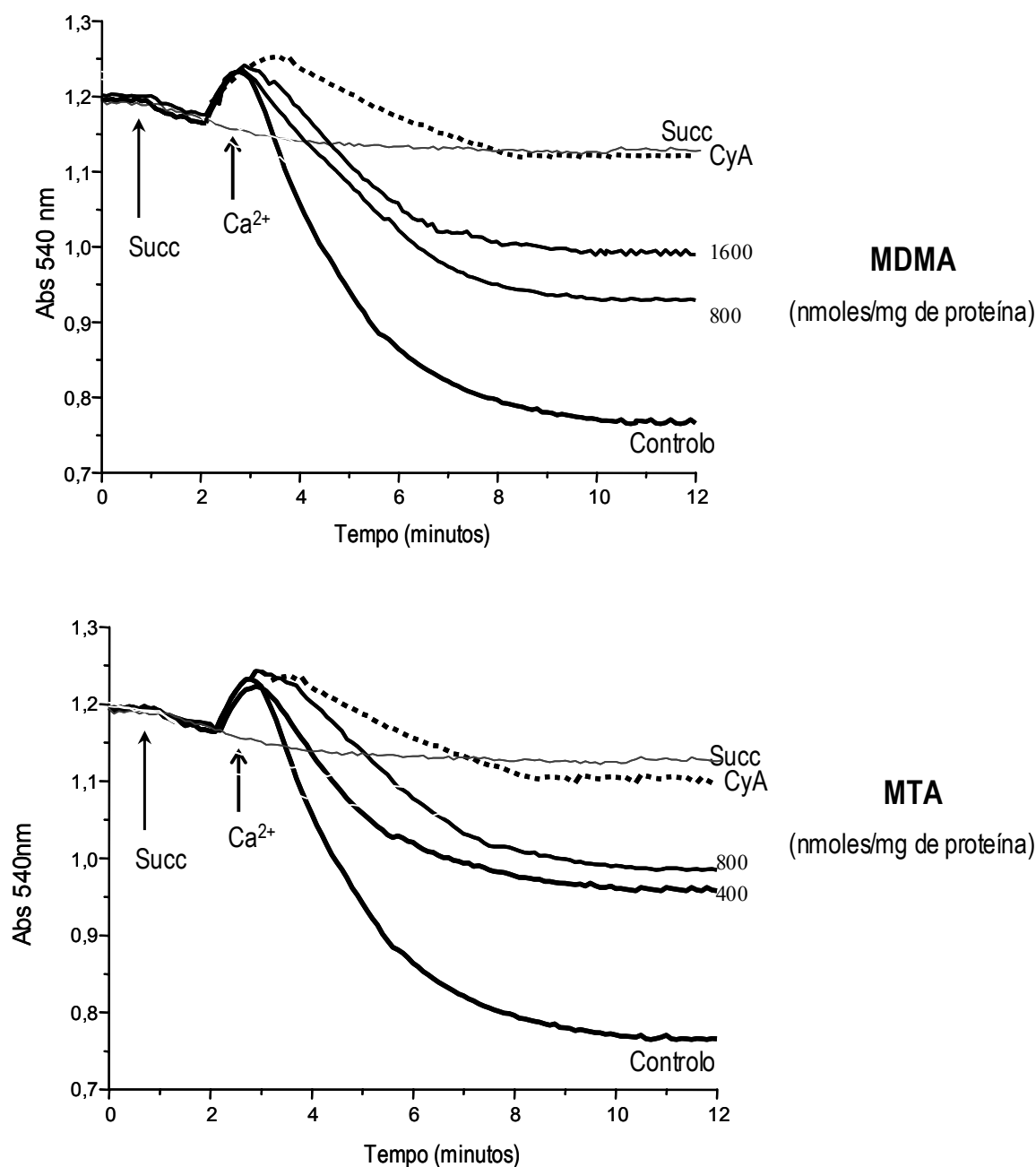
**Figura 3.15 – Efeito da MDMA e da MTA no intumescimento mitocondrial em mitocôndrias de fígado dependente de cálcio.** As mitocôndrias foram adicionadas (0,5 mg proteína/ml) a 1ml de meio de reacção suplementado com rotenona 2  $\mu$ M, e oligomicina 1 $\mu$ g e energizadas com succinato 5 mM (Succ) um minuto após a adição  $Ca^{2+}$  (140 nmoles/mg de proteína) com consequente indução de um decréscimo significativo da absorvência a 540 nm (Controlo). A MDMA e a MTA em diferentes concentrações foram pré incubadas com a suspensão mitocondrial 3 minutos antes de se proceder ao início da reacção. Os registos são típicos de quatro experiências com diferentes preparações mitocondriais.



**Figura 3.16 – Efeito da adição de MDMA e MTA em função do tempo no intumescimento mitocondrial em mitocôndrias de fígado.** As mitocôndrias (0,5 mg proteína/ml) foram adicionadas a 1 ml de meio de reacção como o descrito na legenda da figura 3.15 (controlo). A MDMA e MTA foram adicionadas durante o decréscimo significativo da absorvência aparente (conforme assinalado pela seta). A adição de CyA no decorrer do processo representada pelo traço descontínuo. Os registos são típicos de três experiências com diferentes preparações mitocondriais.

Os efeitos das drogas foram também estudados no intumescimento com mitocôndrias de coração (Fig. 3.17). Como podemos observar, quando a suspensão mitocondrial foi incubada durante 3 minutos com a MDMA (800-1600 nmoles/mg de proteína) e MTA (100-800 nmoles/mg de proteína) o decréscimo da intensidade de absorvência diminui em função de concentrações crescentes das drogas (Fig. 3.17-MDMA e MTA). Estes resultados evidenciam uma menor sensibilidade de mitocôndrias de coração para ambas as drogas relativamente às mitocôndrias de fígado onde menores concentrações de MDMA e de MTA têm efeitos idênticos.

A inibição do intumescimento mitocondrial por ambas as drogas observa-se quando a MDMA e MTA são pré-incubadas com as mitocôndrias de fígado (Fig 3.15) e coração (Fig. 3.17), ou quando adicionadas após a acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias de fígado (Fig. 3.16), indicando que a MDMA e MTA nas concentrações usadas não afectam o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) necessário para o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo uniporta, nem interfererem com este transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ .

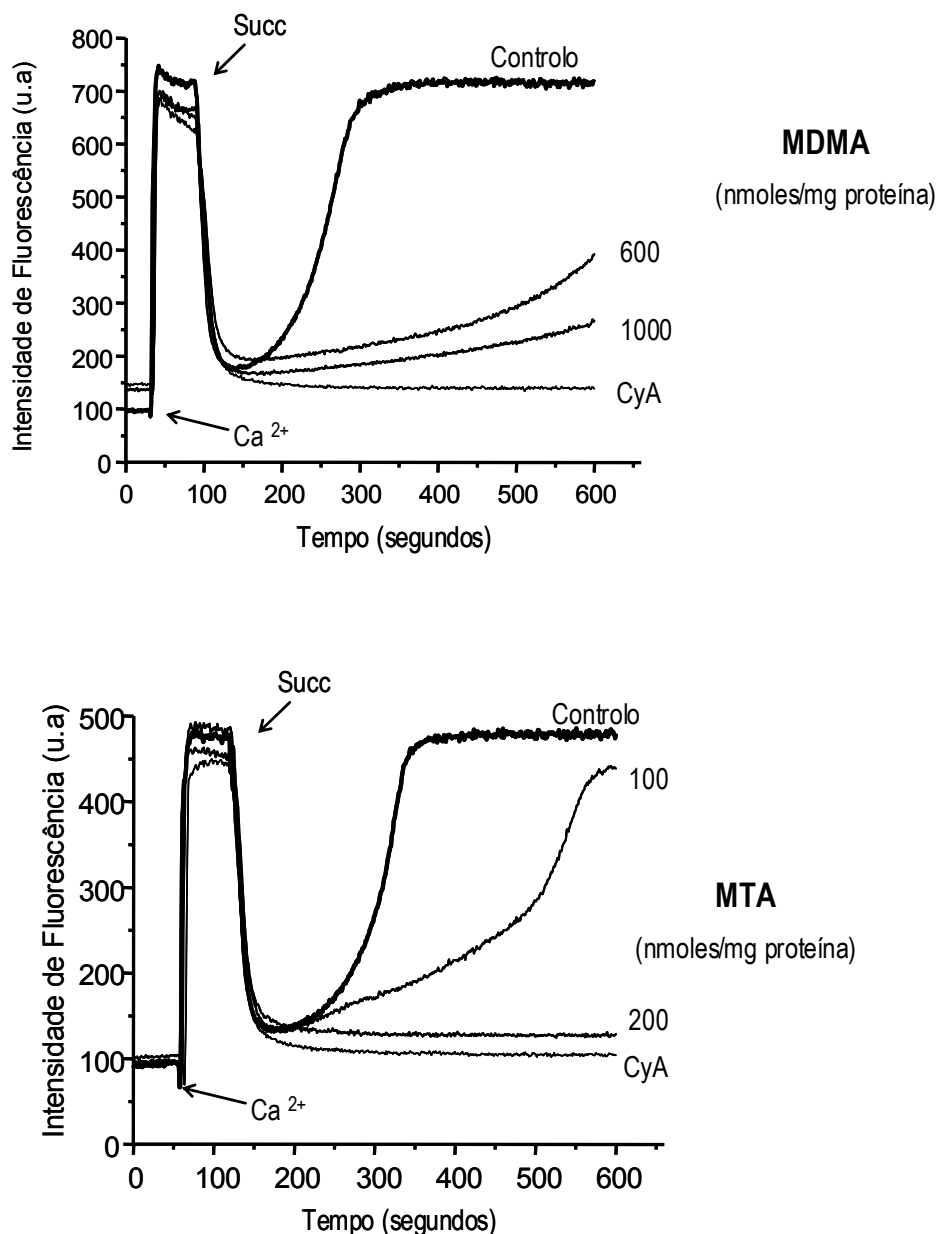


**Figura 3.17 – Efeito da MDMA e MTA no intumescimento mitocondrial em mitocôndrias de coração dependente de cálcio.** As mitocôndrias foram adicionadas (0,5 mg proteína/ml) a meio de reacção 1ml suplementada com rotenona 2  $\mu$ M e oligomicina 1  $\mu$ g. As mitocôndrias foram energizadas com succinato e decorrido um minuto de determinação da dispersão da luz foi adicionado  $\text{Ca}^{2+}$  (400 nmoles/mg de proteína), com conseqüente indução de um decréscimo significativo da absorvência a 540 nm (Controlo). A MDMA e MTA em diferentes concentrações como o indicado junto aos traços do registo (expressas em nmoles/mg de proteína) foram pré incubadas com a suspensão mitocondrial 3 minutos antes de se proceder ao início da reacção. A pré-incubação durante 3 minutos com CyA está representada pelo traço CyA. Os registos são típicos de quatro experiências com diferentes preparações mitocondriais.

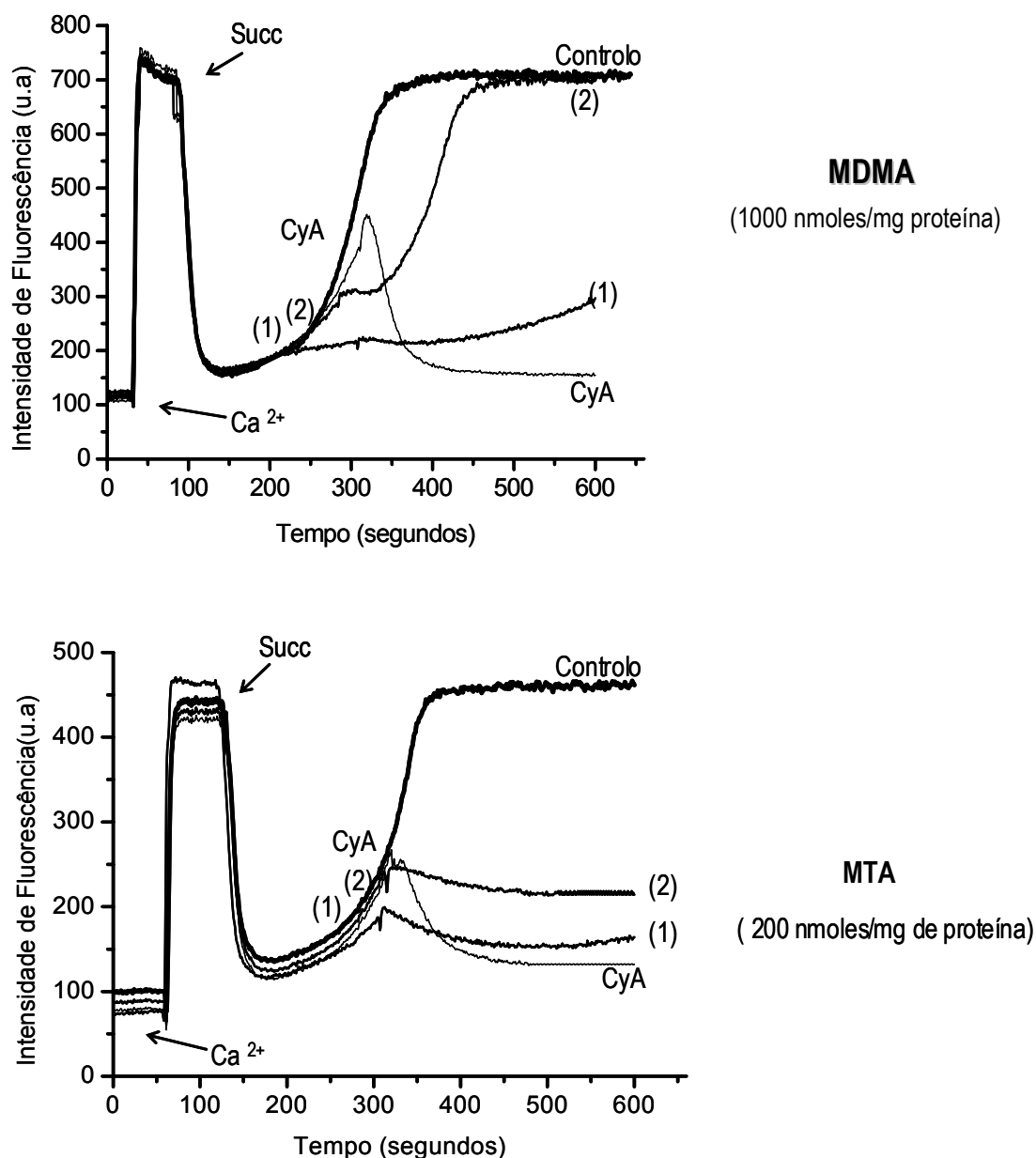
## 2.4- Efeito da MDMA e da MTA nos fluxos mitocondriais de cálcio

Uma vez que o colapso de  $\Delta\Psi$  associado ao aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  matricial está relacionado com indução da MPT, realizamos ensaios experimentais no sentido de testar a capacidade das mitocôndrias reterem  $\text{Ca}^{2+}$ , confirmando assim que a MDMA e MTA inibem a MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ . Para estudar os fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias de fígado e coração associados à indução de MPT foi utilizada uma sonda fluorescente específica para o  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial, a Calciun Green 5-N. Como se pode observar na Figura 3.18, quando é adicionado o  $\text{Ca}^{2+}$  à suspensão de mitocôndrias de fígado previamente incubada com *Ca<sup>2+</sup> green 5N* ocorre um aumento da intensidade de fluorescência e após energização das mitocôndrias com succinato o  $\text{Ca}^{2+}$  é transportado para o interior das mitocôndrias, ocorrendo assim o decréscimo da intensidade de fluorescência. Contudo ao final de aproximadamente 3 minutos começam a libertá-lo progressivamente para o meio, ocorrendo o aumento de intensidade de fluorescência (Fig. 3.18-Controlo). A pré-incubação das mitocôndrias com a MDMA (600-1000 nmoles/mg de proteína) ou de MTA (100-200 nmoles/mg de proteína) durante 3 minutos na presença da sonda *Ca<sup>2+</sup> green 5N* confere às mitocôndrias, a capacidade de acumularem o  $\text{Ca}^{2+}$  do meio. Adicionalmente, as mitocôndrias são capazes de suste o  $\text{Ca}^{2+}$  durante um maior período de tempo e, conseqüentemente, a libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio é mais tardia como se pode observar quando as mitocôndrias são pré-incubadas com 600 nmoles de MDMA/mg de proteína ou 100 nmoles de MTA/mg de proteína (Fig. 3.18- MDMA e MTA). Quando as mitocôndrias são pré-incubadas com 1000 nmoles de MDMA /mg de proteína ou com 200 nmoles de MTA/mg de proteína  $\text{Ca}^{2+}$  não se observa a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$ . A pré-incubação da suspensão mitocondrial com CyA antes da adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , e posterior energização, confere às mitocôndrias capacidade de acumulação e retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da matriz mitocondrial (Fig. 3.18-CyA), sugerindo que este efeito das drogas é devido à inibição da MPT. Adicionalmente, a adição de CyA à suspensão mitocondrial no decorrer da libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  induz uma reacumulação e retenção do íon no interior da matriz (Fig. 3.19-CyA) comprovando que a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  é resultante da indução da MPT pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto e como se pode observar (Fig. 3.19-MDMA), a adição de MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) em diferentes fases do processo de libertação, apenas confere capacidade às mitocôndrias em reacumularem e reterem o cálcio no interior da matriz, se adicionado numa fase inicial da libertação do íon para o meio pelas mitocôndrias, (traço1), o mesmo se observou quando foi feita a adição de MTA (200 nmoles/mg de proteína) em diferentes fases do processo de libertação (traços 1 e 2), sendo que esta droga mesmo quando adicionada numa fase mais tardia e em menor concentração relativamente à usada para os ensaios com a MDMA, conferiu capacidade às mitocôndrias para reacumularem e suste o cálcio (Fig. 3.19-MTA). Estes resultados são concordantes com os

estudos anteriores em que a MTA revelou ser um inibidor mais potente na inibição da MPT do que a MDMA.



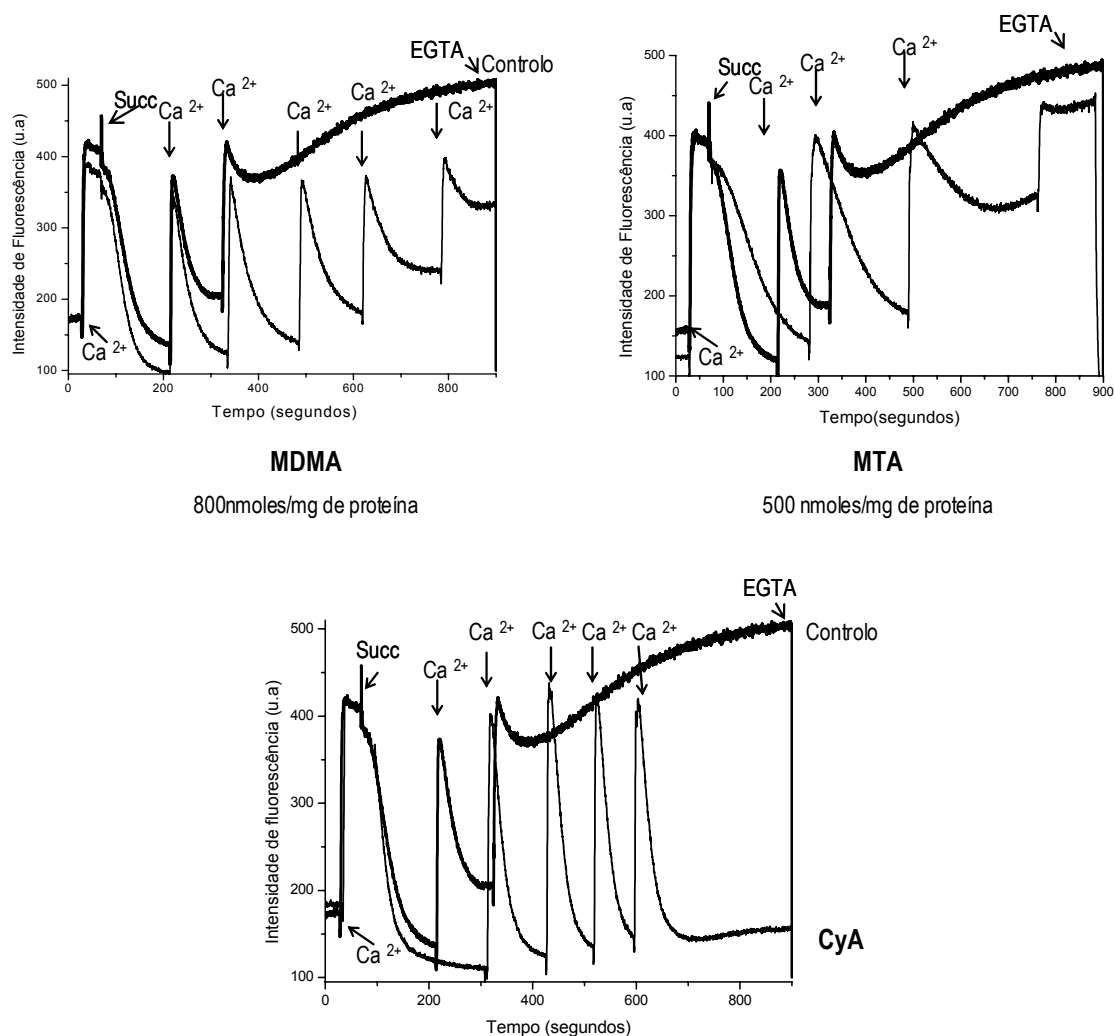
**Figura 3.18 – Efeito da MDMA e MTA nos fluxos de cálcio em mitocôndrias de fígado.** Os fluxos de cálcio foram avaliados utilizando a sonda fluorescente sensível a cálcio a (*Calcium Green 5N*). As mitocôndrias (0,2 mg/ml) foram incubadas a 30°C no meio de reação suplementado com rotenona 2 µM, oligomicina 1µg e Cálcium green 100 nM. A adição de um pulso de cálcio (150 nmoles/mg de proteína) após estabilização da linha basal, seguido da energização com succinato 5 mM (Succ) originou de imediato a diminuição de fluorescência devido à captação do Ca<sup>2+</sup> pelas mitocôndrias, no entanto após aproximadamente 3 minutos ocorre a libertação gradual de Ca<sup>2+</sup> para o meio (Controlo). Diferentes concentrações de MDMA e MTA foram pré incubadas na suspensão mitocondrial antes da adição de cálcio. A pré-incubação durante 3 minutos com CyA está representada pelo traço CyA. Os registos são representativos de diferentes experiências.



**Figura. 3.19– Efeito da MDMA e MTA nos fluxos de cálcio em mitocôndrias de fígado.** Os fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  foram avaliados utilizando a sonda fluorescente sensível a cálcio a *Cálcium Green 5N*. As mitocôndrias (0,2 mg/ml) foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  no meio de reação suplementado com rotenona  $2\ \mu\text{M}$ , oligomicina  $1\ \mu\text{g}$  e *Cálcium green*  $100\ \text{nM}$ . A adição de um pulso de cálcio (150 nmoles/mg de proteína) após estabilização da linha basal, seguido da energização com succinato  $5\ \text{mM}$  (Succ) originou de imediato a diminuição de fluorescência devido à captação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias no entanto após aproximadamente 3 minutos ocorre a liberação gradual de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio (Controlo). A MDMA e MTA foram adicionadas no período em que decorria um aumento significativo da intensidade de fluorescência. A adição de CyA no decorrer da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  está representada pelos traços CyA. Os registos são representativos de diferentes experiências.

Os efeitos da MDMA e MTA nos fluxos mitocôndriais de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de coração, são semelhantes aos da acumulação de cálcio pelas mitocôndrias de fígado. Como se pode observar na figura 3.20-Controlo, a adição de 150 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína à suspensão mitocondrial

previamente incubada com a sonda *Cálcium Green*, ocorreu um aumento da intensidade de fluorescência, e após energização das mitocôndrias com succinato o  $\text{Ca}^{2+}$  foi transportado para o interior das mitocôndrias, o que se traduziu no decréscimo da intensidade de fluorescência.



**Figura 3.20 – Efeito da MDMA e MTA na capacidade de acumulação de cálcio em mitocôndrias de coração.** As mitocôndrias cardíacas (0,1mg/ml) foram adicionadas a 2 ml de meio de suplementado com *Cálcium green* 5N 100 nM, rotenona 2  $\mu\text{M}$  e oligomicina 1 $\mu\text{g}$ . As experiências foram efectuadas a 30°C e após estabilização da linha basal adicionou-se um pequeno pulso de cálcio, seguido da energização com succinato 5 mM (Succ). Após acumulação de todo o cálcio foram feitas adições sucessivas de cálcio (setas) à suspensão mitocondrial (controlo). A MDMA, MTA e CyA foram pré incubadas durante 3 minutos antes da energização com succinato.

Como se pode verificar, as mitocôndrias sustêm o  $\text{Ca}^{2+}$  no seu interior, e um segundo pulso de  $\text{Ca}^{2+}$  (150 nmoles/mg de proteína) que foi acumulado rapidamente no interior das mitocôndrias (decréscimo de fluorescência). Todavia a adição posterior de (150 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  as mitocôndrias induziu a sua libertação para o meio de reacção, como se pode verificar pelo aumento da intensidade de fluorescência. A pré-incubação das mitocôndrias com a MDMA (800 nmoles/mg de



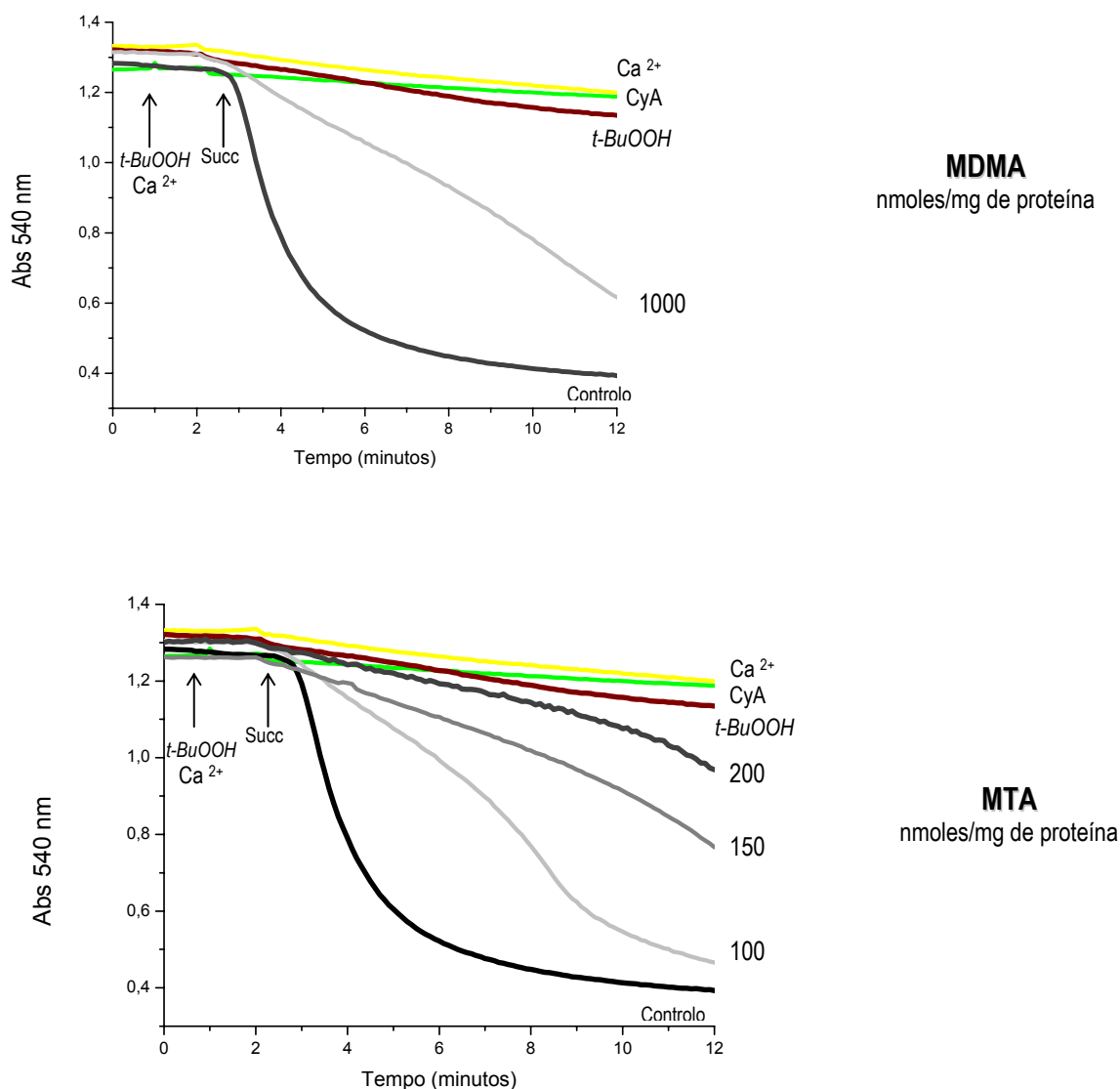
proteína) durante 3 minutos na presença da sonda *Cálcium Green 5N* antes de ser adicionado o  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3.20- MDMA), conferiu às mitocôndrias após a sua energização com succinato, a capacidade de acumularem uma maior quantidade de cálcio (750 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína) e de os susterem durante um maior período de tempo, retardando a sua libertação para o meio de reacção. Efeito idêntico foi observado quando as mitocôndrias foram pré-incubadas com a MTA (Fig. 3.20-MTA), embora em menor concentração, isto é 500 nmoles de MTA/mg proteína, em vez de (800 nmoles MDMA). A pré-incubação da suspensão mitocondrial com CyA antes da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e posterior energização com succinato, confere às mitocôndrias capacidade de acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  e sua retenção no interior da matriz mitocondrial não ocorrendo a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio (Fig. 3.20-CyA). No final de cada ensaio, foi adicionado à suspensão mitocondrial EGTA um quelante de cálcio, que provocou o decréscimo total de fluorescência, provando assim que as variações de fluorescência observadas são devidas ao cálcio (Fig. 3.20-EGTA).

### **3- Efeitos da MDMA e da MTA na permeabilidade transitória mitocondrial induzida por t-BuOOH na presença de $\text{Ca}^{2+}$**

#### **3.1 -Efeito da MDMA e da MTA no intumescimento mitocondrial induzido por t-BuOOH**

A MPT, na presença de concentrações matriciais elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  é favorecida por agentes oxidantes, uma vez que na presença destes agentes o stresse oxidativo gerado conduz à oxidação de grupos -SH de proteínas membranares mitocondriais, do GSH matricial e conduz à diminuição dos nucleótidos de adenina [NAD(P)H] (Halestrap et al., 2002) estimulando a indução da MPT. Assim, no sentido de clarificar a inibição da MPT pela MDMA e MTA, estudámos os efeitos destas drogas na MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e t-BuOOH, um agente prooxidante, análogo aos hidroperóxidos lipídicos de cadeia curta formados durante a peroxidação lipídica.

Como se pode observar na figura 3.21, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  às mitocôndrias de fígado pré-incubadas previamente com 50  $\mu\text{M}$  de t-BuOOH e após energização com succinato, ocorre um acentuado decréscimo da absorvência das suspensões mitocondriais (Fig. 3.21-Controlo). Uma vez que este efeito é prevenido pela CyA pré-incubada com as mitocôndrias (Fig. 3.21-CyA), de um modo semelhante ao observado no caso da indução da MPT com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{P}_i$ , sugere que a ocorrência do intumescimento mitocondrial é devido à indução da MPT.



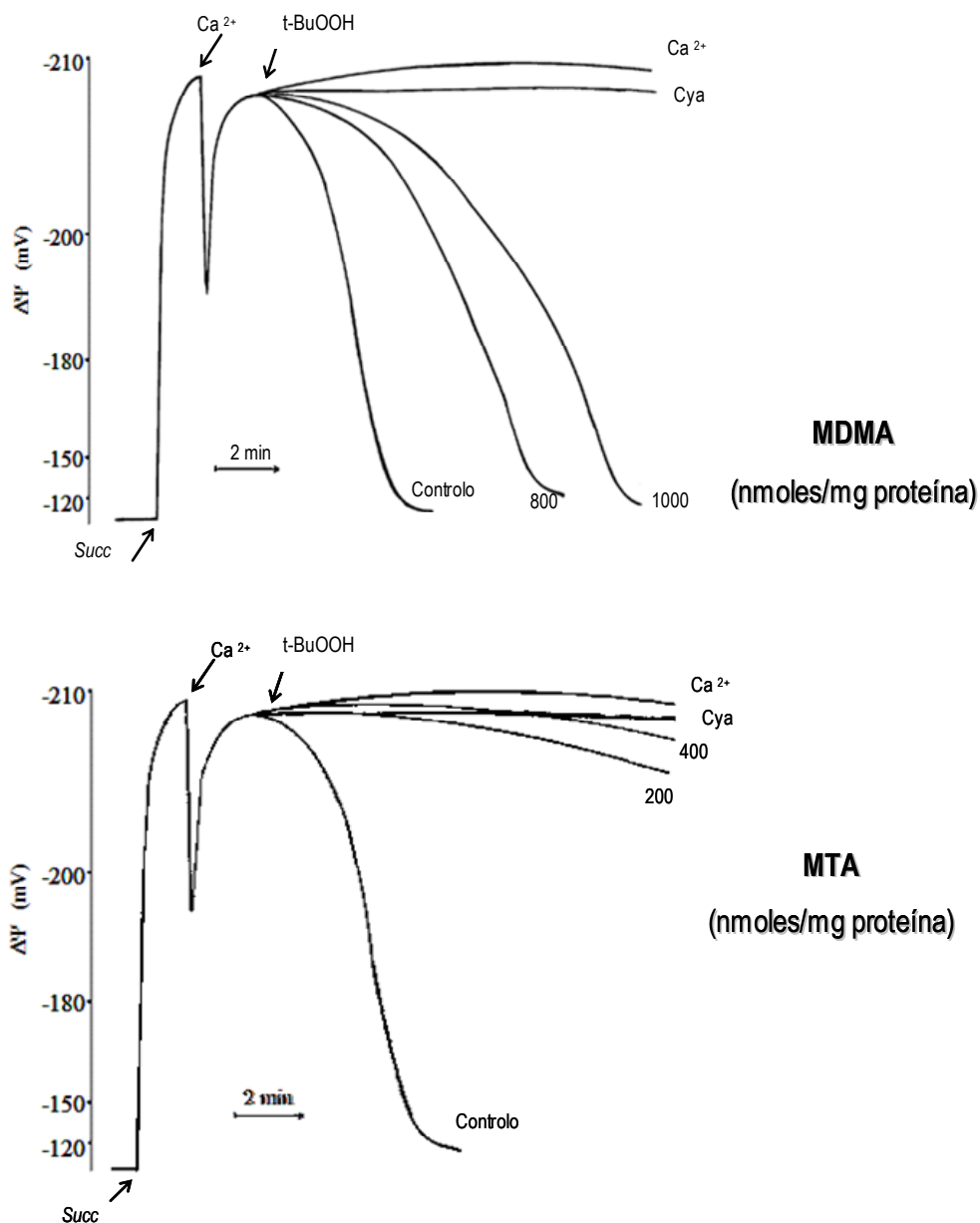
**Figura 3.21 – Efeito da MDMA e MTA no intumescimento mitocondrial em mitocôndrias de fígado induzido pelo prooxidante hidroperóxido de tert-butilo (*t-BuOOH*).** As mitocôndrias (0,5 mg proteína/ml) foram adicionadas ao meio de reação suplementado com rotenona 2  $\mu$ M, oligomicina 1  $\mu$ g energizadas com succinato 5 mM (Succ) um minuto após ter sido feita a pré incubação da suspensão mitocondrial com  $\text{Ca}^{2+}$  (150 nmoles/mg de proteína) e *t-BuOOH* (50  $\mu$ M), ocorrendo um decréscimo significativo da absorvência a 540 nm (Controlo). A adição de cálcio ou *t-BuOOH* separadamente não induz alterações significativas na absorvência aparente. A MDMA e MTA foram pré incubadas com a suspensão mitocondrial 3 minutos antes de se proceder ao início da reação. A pré-ncubação durante 3 minutos com CyA está representada pelo traço CyA. Os registos obtidos são típicos de diferentes experiências.

O  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado às mitocôndrias na ausência de prooxidantes (Fig. 3.21- $\text{Ca}^{2+}$ ), ou o *t-BuOOH* na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3.21- *t-BuOOH*) não induzem um decréscimo significativo na absorvência das suspensões mitocondriais, indicando que nenhum deles, individualmente, induz o intumescimento mitocondrial nas concentrações usadas nestes ensaios. A pré-incubação das

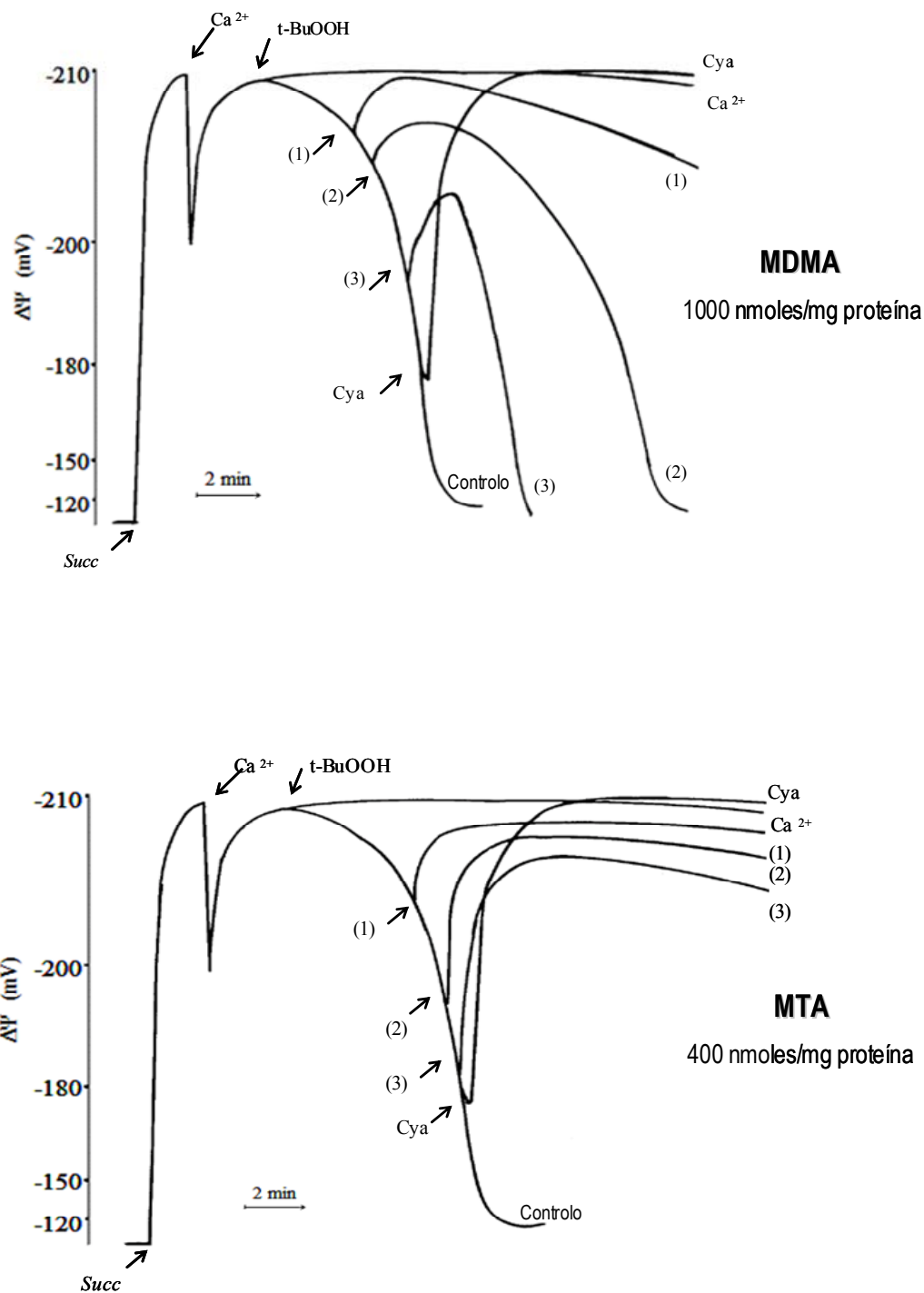
mitocôndrias com MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) previne parcialmente o intumescimento mitocondrial induzido pela combinação de  $\text{Ca}^{2+}$  com *t*-BuOOH (Fig. 3.21-MDMA). A pré-incubação com MTA em concentrações inferiores às de MDMA, isto é cerca de 200 nmoles de MTA/mg de proteína a previne o intumescimento mitocondrial induzido pela combinação de  $\text{Ca}^{2+}$  com *t*-BuOOH, (Fig. 3.21-MTA) de modo semelhante ao que acontece com o intumescimento induzido com  $\text{Ca}^{2+}$  e Pi (Fig. 3.17-MTA). Assim os resultados demonstram que a MTA inibe em maior extensão o intumescimento mitocondrial quando comparada com MDMA

### 3.2- Efeito da MDMA e da MTA na despolarização do potencial transmembranar devido à MPT

O efeito inibidor da MDMA e da MTA na indução da MPT com  $\text{Ca}^{2+}$  e *t*-BuOOH foi também demonstrado pelo facto de ambas as drogas inibirem a despolarização do  $\Delta\Psi$  associado a indução da MPT (Fig. 3.22). A adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (50 nmoles/mg de proteína) causa uma despolarização transitória no  $\Delta\Psi$  desenvolvido após a adição do succinato devido ao transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo uniporta de  $\text{Ca}^{2+}$ , e em aproximadamente 2 minutos o  $\Delta\Psi$  retoma e mantém a -210 mV. No entanto, quando é adicionado às mitocôndrias *t*-BuOOH (50  $\mu\text{M}$ ) a repolarização do  $\Delta\Psi$  após a acumulação do  $\text{Ca}^{2+}$  é seguida de uma despolarização acentuada e irreversível do  $\Delta\Psi$  nos 6 minutos seguintes. (Fig. 3.22-Controlo). As mitocôndrias quando pré-incubadas com concentrações crescentes de MDMA (800-1000 nmoles/mg de proteína) e MTA (200-400 nmoles/mg de proteína), antes da adição de succinato,  $\text{Ca}^{2+}$  e prooxidante protege as mitocôndrias da despolarização irreversível do  $\Delta\Psi$  (Fig. 3.22-MDMA e MTA) induzido pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , de modo semelhante ao que se observa com a CyA (Fig. 3.22-CyA). Quando tratamos as mitocôndrias com  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência de prooxidantes não ocorre despolarização da membrana mitocondrial (Fig. 3.22- $\text{Ca}^{2+}$ ). Além do mais, a adição de MDMA (1000 nmoles/mg de proteína) ou de MTA (400 nmoles/mg de proteína) a suspensões mitocondriais nas quais esteja a ocorrer a despolarização do  $\Delta\Psi$  induzido por *t*-BuOOH na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3.23- MDMA e MTA), induz repolarização do  $\Delta\Psi$  e confere às mitocôndrias capacidade para suster o  $\Delta\Psi$  de um modo semelhante ao conferido pela CyA, (Fig.3.23-CyA) indicando que qualquer das drogas tem capacidade para prevenir e reverter a indução da MPT.



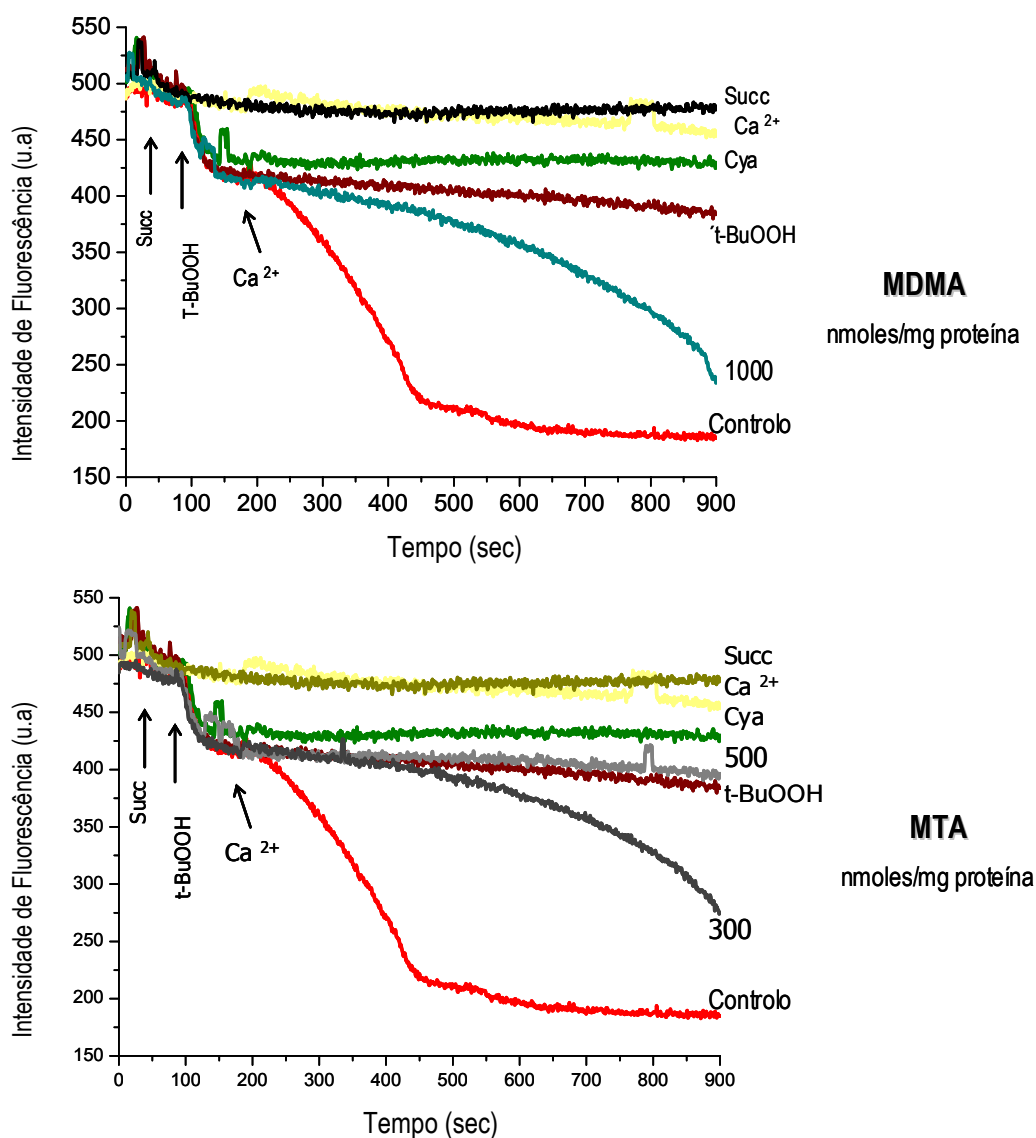
**Figura 3.22 – Efeitos da MDMA e MTA na variação de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) em mitocôndrias de fígado associado à indução da MPT por  $\text{Ca}^{2+}$  e *t*-BuOOH.** As mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram adicionadas a 2 ml de meio de reacção suplementado com TPP<sup>+</sup> 4  $\mu\text{M}$ , rotenona 2  $\mu\text{M}$ , oligomicina 1  $\mu\text{g}$  e energizadas com succinato 5 mM (Succ). O  $\text{Ca}^{2+}$  (50 nmoles/mg de proteína) foi adicionado após equilíbrio na distribuição de TPP<sup>+</sup>, causando uma despolarização transitória. Quando os valores de  $\Delta\Psi$  retomaram os valores iniciais (1 minuto) adicionou-se o *t*-BuOOH (50  $\mu\text{M}$ ) que causou uma despolarização acentuada no  $\Delta\Psi$  (Controlo). As mitocôndrias foram pré-incubadas durante 3 minutos na presença de diferentes concentrações de MDMA e MTA, indicadas junto aos traços dos registos expressas em nmoles/mg de proteína e de CyA (CyA). O  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado na ausência de *t*-BuOOH (traço  $\text{Ca}^{2+}$ ) não induziu uma despolarização irreversível. Os registos são típicos de quatro experiências com diferentes preparações mitocondriais. O  $\Delta\Psi$  foi avaliado com um eléctrodo sensível ao TPP<sup>+</sup> conforme o descrito em Materiais e Métodos.



**Figura 3.23 – Efeitos da MDMA e MTA na MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e  $t\text{-BuOOH}$ .** As experiências decorreram nas condições descritas na figura 3.22. A MDMA e MTA foram adicionadas em tempos diferentes do processo de despolarização como o indicado junto aos traços (1-3) da figura. A CyA foi igualmente adicionada no decorrer da despolarização (traço CyA). O  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado na ausência de  $t\text{-BuOOH}$  (traço  $\text{Ca}^{2+}$ ). Os traços são representativos de quatro experiências separadas realizadas em diferentes preparações mitocondriais.

### 3.3-Efeito da MDMA e da MTA na oxidação dos nucleotídeos de pirimidina

A sensibilidade das mitocôndrias à indução da MPT é aumentada pela oxidação dos nucleotídeos de pirimidina [NAD(P)H]. A fluorescência dos nucleotídeos [NADH e NADPH] é responsável pela maior parte da auto-fluorescência das mitocôndrias enquanto que os nucleotídeos de pirimidina oxidados (NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup>) são não fluorescentes. Deste modo, alterações na auto-fluorescência emitida pelas suspensões mitocondriais reflectem alterações no estado redox dos nucleotídeos de pirimidina. Assim, para esclarecer os mecanismos de inibição da MPT pela MDMA e MTA estudámos também as alterações no estado redox dos nucleotídeos de pirimidina (Fig. 3.24), avaliando a intensidade de fluorescência de suspensões mitocondriais tratadas com *t*-BuOOH na presença de Ca<sup>2+</sup>. No decorrer da MPT induzida por Ca<sup>2+</sup> (traço Ca<sup>2+</sup>) e *t*-BuOOH (traço *t*-BuOOH) ocorre hidrólise e/ou oxidação de NAD(P)H após a adição de *t*-BuOOH e de Ca<sup>2+</sup> às mitocôndrias uma vez que se observa uma diminuição na intensidade de fluorescência (Fig. 3.24-Controlo). Nas suspensões mitocondriais pré-incubadas apenas com Ca<sup>2+</sup> ou com *t*-BuOOH não se observa uma diminuição na intensidade de fluorescência. A oxidação dos nucleotídeos de pirimidina poderá atribuir-se ao stresse oxidativo, como causa ou consequência da indução da MPT, uma vez que não ocorre na ausência de Ca<sup>2+</sup> (traços Ca<sup>2+</sup>) e é inibido por CyA (traços CyA). À semelhança da CyA, também a pré-incubação com MDMA e MTA previne a hidrólise/oxidação dos NAD(P)H, uma vez que não se observa uma diminuição da intensidade de fluorescência das mitocôndrias nestas condições (Fig. 3.24- MDMA e MTA). Assim, estes resultados demonstram que a MDMA e principalmente a MTA, têm capacidade para prevenir a MPT em situações de stress oxidativo de um modo semelhante à prevenção de MPT induzida por Ca<sup>2+</sup> na presença de Pi, efeitos que podem contribuir para a alteração dos mecanismos de homeostase do Ca<sup>2+</sup>, e conseqüentemente para a toxicidade induzida por estas drogas.



**Figura. 3.24– Efeito da MDMA e MTA no estado redox dos nucleótidos de pirimidina.** As mitocôndrias de fígado (0,5 mg proteína/ml) foram adicionadas ao meio de reação suplementado com rotenona 2  $\mu$ M e oligomicina 1  $\mu$ g. As mitocôndrias foram previamente energizadas com succinato 5 mM (Succ) e decorrido 1 minuto foi adicionado o t-BuOOH (50  $\mu$ M) que originou um ligeiro decréscimo da fluorescência. A adição de Ca<sup>2+</sup> (60 nmoles/mg proteína) originou um decréscimo acentuado da intensidade de fluorescência (Controlo), correspondente à indução de MPT, sensível à pré-ncubação durante 3 minutos com CyA (traço CyA). A adição de Ca<sup>2+</sup> (traço Ca<sup>2+</sup>) ou de t-BuOOH (traço t-BuOOH) separadamente não induz alterações significativas na intensidade de fluorescência. A MDMA e MTA, nas concentrações indicadas pelos números junto aos traços do registo (expressas em nmoles/mg de proteína) foram pré incubadas com a suspensão mitocondrial 3 minutos antes de se proceder ao início da reação (traços assinalados com a respectiva designação). Os registos obtidos são representativos de 3 experiências diferentes.

---

## **IV – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES**

---



## DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

Nas últimas décadas, a avaliação dos mecanismos de toxicidade responsáveis pelo aparecimento de distúrbios psíquicos e neuropsiquiátricos em consumidores de *ecstasy* têm sido alvo de inúmeros estudos (Colado *et al.*, 2001; Zhou Jun-Fu *et al.*, 2003; Rabi Simantov 2003; Lyles C. e Cadet, 2003). Contudo os mecanismos de acção tóxica da *ecstasy* ao nível hepático e cardíaco bem como os efeitos de hipertermia observados em jovens após o consumo das pastilhas de *ecstasy* (Henry *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1997; Walubo and seger, 1999) continuam por esclarecer. Vários estudos demonstraram que a toxicidade e o risco de efeitos adversos agudos associados ao consumo de pastilhas de *ecstasy* é condicionado pela composição das pastilhas (Parrott 2004; Cole, 2002 Baggott *et al.*, 2000) e também pela frequente mistura que os consumidores fazem com outras drogas, como por exemplo, estimulantes, opiáceos e álcool. Além disso, sabe-se que nem todas as pastilhas consumidas como *ecstasy* contêm necessariamente MDMA. De entre os diferentes contaminantes presentes nas pastilhas destaca-se a 4-metiltoanfetamina (MTA), um derivado anfetamínico recente e potencialmente tóxico (Adam *et al.*, 2002, Poortman and Lock 1999), que é usualmente comercializado sob a designação de *ecstasy* ou de *flatliner*. O consumo de MTA é referido na literatura como o causador de várias mortes e intoxicações graves na Europa (Centro Europeu de monitorização para as drogas e toxicodependência [EMCDDA] 1999, Decaesteker *et al.*, 2001), no entanto os mecanismos de toxicidade da MTA não são ainda conhecidos. Assim neste trabalho, foi dado particular ênfase ao estudo da potencial acção da MDMA e da MTA na mitocôndria, ao seu efeito dissociador na cadeia respiratória e do sistema fosforilativo com consequente dissipação de energia sob a forma de calor como principal mecanismo responsável pela hipertermia. Adicionalmente, procedeu-se ao estudo da potencial indução de disfunções mitocondriais pela MDMA e MTA em mitocôndrias de fígado e de coração de rato *in vitro*, nomeadamente nos mecanismos de regulação do  $Ca^{2+}$  como a MPT, no sentido de esclarecer alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade e cardiotoxicidade originada pelo consumo de pastilhas de *ecstasy*.

### 1- Efeito da MDMA e MTA na bioenergética mitocondrial

Uma das causas do desenvolvimento de hipertermia é o efeito dissociador de compostos que dissociam a cadeia respiratória mitocondrial e o sistema fosforilativo (Mahmud *et al.*, 2003; Dabadie *et al.*, 1987; Petrescu e Tarba 1997). Assim, estudámos os efeitos da MDMA e MTA em

preparações de mitocôndrias isoladas, com o intuito de verificar se estes derivados anfetamínicos têm actividade dissociadora na cadeia respiratória e sistema fosforilativo a nível mitocondrial. Diferentes estudos demonstram que as anfetaminas podem atravessar as membranas biológicas na forma neutra ou na forma protonada e actuarem como dissociadores clássicos. Em 1971 Nelson e colaboradores demonstraram que compostos do tipo protonófero metilendioxifenil, estruturalmente semelhantes à MDMA possuem actividade dissociadora. Subsequentemente, foi evidenciado que um derivado anfetamínico análogo à MDMA, a clorofentermina, uma outra feniletilamina actua *in vivo* e *ex vivo* como um agente dissociador (Zychilinli e Montgomery, 1985). A rabdomiólise, a rigidez muscular, a hipercalémia, a acidose metabólica, a taquicardia e a hipertermia são sintomas comuns nos consumidores de *ecstasy* e em pacientes após intoxicação com os herbicidas 2,4-dinitrofenol e pentaclorofenol (Leftwich et al., 1982). Os mecanismos de toxicidade destes dois herbicidas são uma consequência da sua acção protonófera verificando-se que dissociam a cadeia respiratória da síntese de ATP pela indução de fuga ("leak") a protões ao longo da membrana mitocondrial interna para a matriz mitocondrial (Skulachev, 1998). A eventual hipótese de que a mitocôndria poderá constituir um alvo de toxicidade da *ecstasy* baseia-se em vários estudos cujos resultados demonstram que a MDMA provoca a perda de viabilidade celular, como consequência de um acentuado aumento da concentração de cálcio intracelular e depleção de ATP, bem como da indução de morte celular programada (Beitia et al., 1999, Montiel-Duarte et al., 2002). Adicionalmente, verifica-se que a administração de repetidas doses de *ecstasy* produz alterações histológicas nomeadamente necrose dos miócitos e alterações ao nível estrutural, particularmente evidente ao nível mitocondrial, onde foi possível observar modificações ao nível das cristas e uma diminuição da densidade da matriz (Gesi et al., 2002). As mitocôndrias além de produzirem a maior parte da energia nas células têm uma acção multifacetada, pelo que qualquer alteração a nível das funções mitocondriais irá diminuir a energia disponível para as actividades da célula, induzindo danos e possível morte celular.

O estudo dos efeitos da MDMA na bioenergética de mitocôndrias de coração de rato demonstra que não induz alterações no estado 4 ou no estado 3 da respiração de acordo com os efeitos no ICR e no quociente ADP/O. Apenas quando foi feita a pré incubação de mitocôndrias de fígado de rato com elevadas concentrações de MDMA (5000 nmoles/mg de proteína) ocorreu um ligeiro aumento do estado 4 (Fig. 3.2) e um correspondente decréscimo do ICR (Fig. 3.4). Por outro lado, a MDMA não induz alterações no potencial de membrana em mitocôndrias de coração e de fígado de rato. Significando que a MDMA não tem efeito dissociador, pelo que a hipertermia

induzida pela *ecstasy* não será devida à acção directa da MDMA na mitocôndria. Estes efeitos são concordantes com os resultados obtidos recentemente por Rusyniak e colaboradores (2004) que demonstram que a MDMA não têm actividade dissociadora em culturas de célula ou *ex vivo* em animais aos quais foi previamente administrada MDMA. Adicionalmente, quando avaliámos o efeito da MDMA na integridade da membrana de mitocôndrias intactas e não energizadas, verificámos que apesar da presença de elevadas concentrações de MDMA (5000 nmoles/mg de proteína) as mitocôndrias conservam a integridade física da membrana.

Os mecanismos envolvidos na hipertermia induzida pela MDMA não estão completamente esclarecidos, embora tenham sido referidos vários factores, nomeadamente, a estimulação das vias serotoninérgicas do hipotálamo (Gordon *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1995), o aumento da actividade motora acompanhado de um estado hipermetabólico do músculo esquelético (Woods and Herry 1992), a estimulação da lipólise (Nonogaki, 2000) e da glicogenólise (Darvesh *et al.*, 2002), diminuição da perda de calor através da pele devido à vasoconstrição periférica induzida pelas catecolaminas (Pedersen e Blessing 2001; Blessing *et al.*, 2003) e à produção de calor resultante da activação da proteína dissociadora UCP-3 (Mills *et al.*, 2003). Segundo Mills e colaboradores (2004) a termogénese induzida pelo consumo da *ecstasy* poderá ser devida a uma complexa interacção entre o eixo hipotálamo-glandula pituitária-tiróide, o sistema nervoso simpático e a actividade das UCPs. A exposição a MDMA conduz à libertação de noradrenalina a nível central (Rothman *et al.*, 2001) e à expressão dos receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e receptores  $\beta_3$  (Stuerenburg *et al.* 2002). A activação dos receptores  $\beta_3$  pela noradrenalina aumenta os níveis de AMPc, o que conduz à estimulação de lipases aumentando a conversão de triglicéridos a ácidos gordos, são os ácidos gordos que fornecem os prótons para a dissociação mitocondrial. A activação da UCP-3 pode ser induzida pela hormona tiroideia, que se encontra aumentada após exposição à MDMA (Gong *et al.*, 1997). Outros estudos (Mills *et al.*, 2003) demonstram que ratinhos transgénicos deficientes em UCP-3 têm uma resposta termogénica diminuída à MDMA comparativamente à estirpe selvagem, pelo que esses ratinhos estão mais protegidos contra a hipertermia, sugerindo que a UCP-3 é um mediador da resposta termogénica, pois ao provocar a dissociação da mitocôndria leva à dissipação do gradiente electroquímico de prótons, gerado na mitocôndria, sob a forma de calor (Lowell e Spiegelman, 2000). De acordo com esta teoria, como a temperatura do músculo aumenta, as proteínas desnaturam e pode ocorrer rabiólise como consequência da perda de integridade do músculo-esquelético (Mills *et al.*, 2004). Segundo um estudo recente (Rusyniak *et al.*, 2005), a MDMA dissocia a fosforilação oxidativa *in vivo*, através de um mecanismo indirecto independente do

metabolismo, resultando em reduções dos níveis de ATP e de fosfocreatina, com conseqüente desenvolvimento de hipertermia e rabdomiólise. Os mesmos autores sugerem o envolvimento das proteínas dissociadoras UCP-3 como um dos mecanismos indirectos que explica o efeito dissociador *in vivo*, e uma possível explicação para a ausência da dissociação mitocondrial no fígado será o facto de estas proteínas dissociadoras apesar de estarem presentes em inúmeros tecidos, não serem expressas em quantidade significativa nos hepatócitos.

Todavia, os efeitos de hipertermia da ecstasy poderão resultar dos efeitos dos seus metabolitos na mitocôndria. De facto diferentes estudos demonstram que o metabolismo da MDMA ocorre por via hepática, justificando-se que a MDMA sofre N-desmetilação originando a 3,4-metilenoamfetamina (MDA). A MDMA e MDA ao serem *o*-desmetiladas formam-se a N-metil- $\alpha$ -metildopamina (N-Me- $\alpha$ -MeDa) e  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDa) respectivamente (Maurer *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2004<sup>a</sup>). Apesar de Rusyniak e colaboradores (2004) terem realizado os estudos quer em animais tratados, quer numa linha celular hepática capaz de algum metabolismo (embora significativamente menor que em hepatócitos maduros) (Grisham, 1980), a possibilidade de um dos metabolitos da MDMA ter uma actividade dissociadora, não foi ainda estudada e deverá ser alvo de um intenso estudo no sentido de avaliar e comparar os efeitos ao nível mitocondrial. Adicionalmente, estudos recentes evidenciaram que os metabolitos da MDMA, N-Me- $\alpha$ -MeDa e da  $\alpha$ -MeDa (metabolitos altamente reactivos) são hepatotóxicos (Carvalho *et al.*, 2004<sup>b</sup>), nefrotóxicos (Carvalho *et al.*, 2002) e cardiótóxicos (Carvalho *et al.*, 2004<sup>c</sup>). Assim, estes metabolitos poderão ser os responsáveis por muitos dos efeitos da ecstasy, nomeadamente hipertermia e rabdomiólise. Por outro lado, estes efeitos da MDMA poderão resultar da presença de contaminantes nas pastilhas nomeadamente, devidos à MTA. De facto, a MTA induz despolarização do  $\Delta\Psi$ , estimulação da velocidade de respiração do estado 4 e inibição da velocidade de respiração do estado 3 estimulada pelo ADP (Figs. 3.1 e 3.2), demonstrando que a MTA é um dissociador da fosforilação oxidativa. A eficiência fosforilativa das mitocôndrias na presença de MTA é claramente afectada como se pode inferir pelo decréscimo no ICR e do quociente ADP/O, das flutuações associadas ao ciclo fosforilativo induzido pelo ADP (Fig. 3.5) e pela inibição do estado 3 da respiração (Fig. 3.7). Deste modo, para além da cadeia respiratória, esta droga pode afectar a velocidade de síntese de ATP. Uma vez que o transporte de ADP para a fosforilação pelo transportador de nucleótidos de adenina (ANT) e o sistema fosforilativo consomem  $\Delta\Psi$ . Este efeito conseqüência da despolarização do  $\Delta\Psi$  poderá ser devido a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons. Em mitocôndrias isoladas, a velocidade do estado 4 da

respiração é consequência da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons. Assim, a estimulação do estado 4 induzida pela MTA sugere um aumento na permeabilidade passiva a prótons, indicando que a MTA poderá actuar como um transportador de prótons ou por destruição da estrutura da membrana mitocondrial (Murphy, 1989). Os ensaios realizados demonstram que a MTA quando pré incubada em baixas concentrações diminui a velocidade de respiração estimulada pelo FCCP. Todavia, para concentrações mais elevadas induz a eliminação do efeito estimulante do FCCP, ou seja, nestas concentrações a MTA não estimula a cadeia respiratória. Avaliámos também os efeitos da MTA na integridade da membrana de mitocôndrias intactas não energizadas e verificou-se um pequeno decréscimo, dependente da concentração, na dispersão de luz das mitocôndrias indicativo de que ocorreu um intumescimento mitocondrial. Este efeito é mais evidente para concentrações elevadas de MTA, o que reflecte um ligeiro efeito desta droga na integridade mitocondrial. Estes distúrbios na integridade estrutural da membrana mitocondrial tornando-a permeável a prótons ("leak a prótons"), possibilita, a difusão de prótons através do gradiente de concentração, isto é, do espaço intermembranar para o interior da matriz mitocondrial, com consequente dissipação do  $\Delta\Psi$ , estimulação do estado 4 da respiração mitocondrial e diminuição da eficiência fosforilativa da mitocôndria. Estes resultados demonstram que a MTA afecta a bioenergética mitocondrial provavelmente devido à indução de alterações na integridade da membrana mitocondrial, podendo estes efeitos constituir um dos mecanismos de morte celular, nos indivíduos após o consumo de pastilhas de *ecstasy* em cuja composição esteja presente a MTA, para além de ser responsável pela hipertermia da *ecstasy*.

Em conclusão, a MTA pode induzir alterações significativas na carga energética celular como consequência da dissociação da cadeia respiratória do sistema fosforilativo, tornando as mitocôndrias incapazes de responder às necessidades energéticas da célula devido à destruição da membrana mitocondrial interna. Assim, os diferentes efeitos observados, poderão explicar o processo de morte celular induzido por esta droga em diferentes tipos de células (Elliot, 2001; Decaestecker et al., 2001<sup>a</sup>) uma vez que o ATP é requerido para manter a viabilidade celular. A MTA devido ao seu efeito dissociador e ao diminuir os níveis de ATP na célula, poderá quando contaminante presente nas pastilhas de *ecstasy* contribuir para a hipertermia e rabdomiólise desenvolvida após o consumo deste tipo de drogas (Parrot, 2004; Carmo et al., 2003; Gowing et al., 2002).

A alteração da permeabilidade transitória induz despolarização do  $\Delta\Psi$  mitocondrial, dissociação da fosforilação oxidativa, libertação de solutos intramitocondriais e intumescimento e

ruptura da membrana externa (Zoratti e Szabo, 1995). Para além disso, a MPT tem suscitado nos últimos anos grande interesse dos pontos de vista fisiológico, farmacológico e toxicológico (Zoratti et al. 2005). Uma vez que, a MDMA *per si* não afecta os níveis de ATP na célula, para avaliar outros possíveis mecanismos de toxicidade ao nível mitocondrial, estudámos os seus efeitos na permeabilidade transitória mitocondrial e este estudo foi realizado em paralelo com o estudo dos efeitos da MTA em mitocôndrias de fígado e coração de rato.

## 2- Efeito da MDMA e da MTA na permeabilidade transitória mitocondrial

A MPT ocorre devido à formação, por mecanismos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e stresse oxidativo, de poros de origem proteica na membrana mitocondrial, devido à oxidação de grupos SH de proteínas específicas da membrana mitocondrial. Trata-se de um fenómeno que resulta na dissipação rápida dos gradientes electroquímicos conduzindo à despolarização do  $\Delta\Psi$ , ao intumescimento mitocondrial, à libertação de solutos de baixo peso molecular, incluindo o  $\text{Ca}^{2+}$  e o GSH, à dissociação da respiração e à inibição da síntese de ATP (Ichas e Mazat, 1998; Bernardi et al., 1999). A indução da MPT dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  está implicada em vários eventos celulares, nomeadamente, na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , na defesa da célula, na apoptose (Bernardi *et al.*, 1996) e em mecanismos de toxicidade tecidual (Wallace *et al.*, 1997). No que diz respeito às anfetaminas, Beitia e colaboradores (2000) demonstraram que a toxicidade hepática da MDMA resulta de um moderado decréscimo de ATP e sugerem que este dano hepático pode também ser devido ao aumento dos níveis de cálcio intracelular, uma conhecida causa de dano celular. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  será possivelmente uma consequência quer do aumento da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para a célula, quer da libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos armazéns intracelulares. (Beitia et al., 1999). A apoptose dos hepatócitos pode também estar envolvida na hepatotoxicidade da MDMA, uma vez que elevadas concentrações de MDMA induziram apoptose em hepatócitos de rato (Montiel-Duarte et al., 2002). Assim, as alterações na MPT produzida pela MDMA poderão constituir os mecanismos responsáveis por estes efeitos da *ecstasy*.

Os estudos dos efeitos destas drogas na MPT demonstram que a MDMA e a MTA previnem o intumescimento mitocondrial dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figs. 3.15, 3.16, 3.17), a despolarização do  $\Delta\Psi$  (Figs.3.10 e 3.13) e a libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado (Figs 3.18 e 3.19). Adicionalmente, a pré-incubação das mitocôndrias com MDMA ou com MTA confere às mitocôndrias a capacidade de acumularem uma maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e também a capacidade de o susterem durante mais tempo e a libertação de cálcio para o meio ocorre mais tardiamente (Fig. 3.20- MDMA e MTA). Por

outro lado, a MDMA e mais fortemente a MTA conferem às mitocôndrias a capacidade para recuperarem o  $\Delta\Psi$  (Fig. 3.11) e para reacumularem o  $\text{Ca}^{2+}$  libertado (Fig. 3.19). Do mesmo modo, a MDMA e a MTA previnem também o intumescimento mitocondrial quando adicionadas no decurso de processo de indução da MPT (Fig. 3.16), sugerindo que a MDMA e a MTA não causam despolarização membranar nem interferem com o uniporta de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por outro lado a MDMA e a MTA, nas concentrações usadas para inibir a MPT, não alteram o  $\Delta\Psi$ , o estado 4 da respiração nem a fosforilação oxidativa, sugerindo que o efeito da MDMA e da MTA na inibição da MPT não está relacionado com um efeito no sistema de transporte de electrões mas será devido provavelmente à inibição dos mecanismos responsáveis pela estimulação da MPT.

A MPT constitui um mecanismo importante para a regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  celular (Evtodienko et al., 1994; Ichas et al., 1997). Considerando que aberturas reversíveis parciais do poro de MPT nas células podem desempenhar um papel essencial na sua actividade vital (Gunter et al., 2004; Jacobson e Duchon 2004), a inibição da MPT pela MDMA e mais fortemente pela MTA poderá estar implicada nos seus mecanismos de acção e como tal contribuir para a hepatotoxicidade e cardiotoxicidade provocada pelo consumo destas drogas. Os efeitos observados sugerem que a MDMA e MTA ao inibirem MPT contribuem para a perda da homeostase de cálcio ao nível da célula e podem causar distúrbios nas interacções de  $\text{Ca}^{2+}$  entre retículo endoplasmático e mitocôndria (Orrenius et al., 2003). Adicionalmente, a capacidade da mitocôndria como sequestrante e reservatório intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é limitada (Gunter et al., 2004), a inibição da MPT causada pela MDMA e pela MTA poderá levar a um desequilíbrio entre os mecanismos de influxo e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Embora numa primeira fase a mitocôndria continue a acumular  $\text{Ca}^{2+}$  através do seu uniporta, quando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondriais são demasiado elevados, poderão causar uma série de alterações ao nível mitocondrial nomeadamente a activação de fosfolipases e proteases (Jacobson e Duchon 2004), seguindo-se a depleção de todo o  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado, contribuindo assim para o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estes efeitos da MDMA na inibição da MPT sugerem que o aumento de mitocôndrias alteradas apresentando uma matriz mitocondrial menos densa e alterações nas cristas, conforme observado em cardiomiócitos (Gesi et al., 2002), possa estar relacionado com a perda da homeostase de cálcio. Adicionalmente estudos realizados com cardiomiócitos demonstram que a administração continua de MDMA altera significativamente a função cardiovascular, verificando-se que ao longo de administrações contínuas há um aumento crescente de arritmias e inflamação dos cardiomiócitos (Bandon et al., 2002). A sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta em parte da libertação deste ião dos locais de armazenamento intracelulares

nomeadamente da mitocôndria (Smaili et al., 2003). Por sua vez, o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser o responsável pela hipercontractura dos cardiomiócitos, uma vez que o  $\text{Ca}^{2+}$  na vizinhança das proteínas contrácteis favorece a contractibilidade muscular por um duplo mecanismo: a) activando a ATPase miofibrilar e aumentando a quantidade de ATP necessário à contracção; b) a interacção entre as proteínas contrácteis actina e miosina e pela sua fixação inactivadora ao complexo troponina-tropomiosina (Berridge, 2003). A regulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  é primordial para o funcionamento normal do miocárdio e as alterações na homeostase deste ião podem explicar as arritmias que têm sido associadas ao consumo de *ecstasy* (Bandon et al., 2002). A contractura dos cardiomiócitos em indivíduos após o consumo de pastilhas de *ecstasy* cuja composição possua MTA pode também estar associada com a diminuição dos níveis intracelulares de ATP induzidos por esta droga (Figs. 3.3 e 3.4). Os elevados níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos podem ser altamente tóxicos para a célula, uma vez que podem induzir a diminuição dos níveis energéticos por inactivação da fosforilação mitocondrial e por activação excessiva das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Adicionalmente, existem vários e potenciais alvos para a sinalização mediada por cálcio na apoptose, nomeadamente a excessiva activação de proteases, fosfatases, fosfolipases e endonucleases (Orrenius et al. 2003; Duchon, 1999). A morte celular por apoptose pode também estar envolvida na hepatotoxicidade da MDMA, uma vez que elevadas concentrações de MDMA induziram apoptose em hepatócitos de rato (Montiel-Duarte et al., 2002).

Adicionalmente, o  $\text{Ca}^{2+}$  e os prooxidantes desempenham um papel concertado na acumulação de ROS na mitocôndria (Castilho et al., 1996; Byrne et al., 1999). A permeabilização transitória da membrana mitocondrial interna induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e prooxidantes é regulada quer pelo estado redox dos nucleótidos NAD(P)H quer pelos grupos sulfídrico (-SH) de compostos da matriz e de proteínas da membrana envolvidas na indução da MPT (Bernardi et al., 1996; Halestrap et al., 1997). A MPT induzida por prooxidantes como o *t*-BuOOH é desencadeada pela produção de ROS estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ . As ROS que se acumulam devido à exaustão dos antioxidantes mitocondriais GSH e NAD(P)H (Valle et al., 1993; Castilho et al., 1995) e o seu ataque aos grupos -SH das proteínas membranares conduz à formação pontes de dissulfureto e abertura de poros na membrana após ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ . Nos estudos realizados, o *t*-BuOOH revelou-se incapaz de causar intumescimento mitocondrial na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3.21-*t*-BuOOH), sugerindo que este catião é essencial e deve agir em passos adicionais na sequência de eventos que conduzem à despolarização mitocondrial responsável pelo desencadear da MPT. A ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à membrana mitocondrial interna induzirá alterações conformacionais em proteínas críticas que expõem os



grupos -SH à acção dos oxidantes. A pré-incubação das mitocôndrias com MDMA e MTA previne o intumescimento mitocondrial induzido pela combinação de  $\text{Ca}^{2+}$  com *t*-BuOOH (Fig. 3.21), inibe a despolarização do  $\Delta\Psi$  (Fig. 3.22), induz repolarização do  $\Delta\Psi$  e confere às mitocôndrias capacidade para sustentar o  $\Delta\Psi$  (Fig. 3.23) de um modo semelhante ao conferido pela CyA, indicando que qualquer das drogas tem capacidade para prevenir e reverter a indução da MPT com  $\text{Ca}^{2+}$  e *t*-BuOOH. Os resultados sugerem que nas mitocôndrias previamente incubadas com MDMA e MTA ocorre protecção da oxidação de grupos -SH induzida pela combinação de  $\text{Ca}^{2+}$  com o *t*-BuOOH. As alterações no estado redox dos nucleótidos de piridina associados à indução MPT com *t*-BuOOH e  $\text{Ca}^{2+}$  foram também estudadas através da avaliação da auto-fluorescência emitida pelas suspensões mitocondriais e os resultados obtidos demonstram que a pré-incubação das mitocôndrias com MDMA e MTA previne a hidrólise/oxidação dos NAD(P)H, uma vez que não se observa uma diminuição da intensidade de fluorescência das mitocôndrias nestas condições (Fig.3.24) à semelhança da pré incubação com CyA. *A CyA inibe a MPT por ligação à CyD ou local de ligação às ANT.* Estas drogas podem inibir a MPT por um mecanismo idêntico ou seja impedindo que ocorram as alterações na conformação das proteínas que constituem a formação do poro e, conseqüentemente, não há exposição dos grupos -SH e sua oxidação, bem evitam a oxidação de NAD(P)H. De referir que estes mecanismos estimulam a indução ou tornam as mitocôndrias mais susceptíveis à indução de MPT. Assim, numa situação de dano oxidativo das proteínas mitocondriais devido à presença de prooxidantes e  $\text{Ca}^{2+}$  a incubação de MDMA e MTA inibe a indução de MPT.

Assim, considerando que aberturas reversíveis parciais do poro de MPT nas células podem desempenhar um papel essencial na sua actividade vital, a inibição da MPT pela MDMA e mais fortemente pela MTA poderá estar implicada nos seus mecanismos de morte celular por necrose e apoptose e contribuir para a hepatotoxicidade e cardiotoxicidade provocada pelo consumo destas drogas. Por outro lado a MDMA e a MTA ao inibirem a MPT levam à perda da homeostase celular do cálcio, uma vez que causam distúrbios nas interacções de  $\text{Ca}^{2+}$  entre retículo endoplasmático e a mitocôndria. Este desequilíbrio entre os mecanismos de influxo e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial poderá causar toda uma série de alterações ao nível mitocondrial com conseqüente libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol. Como a regulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  celular e a manutenção dos níveis de ATP é essencial para o funcionamento normal da célula nomeadamente do miocárdio, as alterações na homeostase deste ião podem explicar as arritmias e as paragens cardíacas que têm sido associadas ao consumo de pastilhas de *ecstasy* e à presença de contaminantes como a MTA.

Assim podemos concluir que as alterações induzidas pela MDMA nas funções da mitocôndria se restringem essencialmente aos mecanismos de  $\text{Ca}^{2+}$ , nomeadamente à MPT e poderão explicar a toxicidade observada nos diferentes órgãos. Contudo, a presença de MTA nas pastilhas de *ecstasy*, será a grande responsável pela toxicidade geral da MDMA observada *in vivo* dadas as alterações acentuadas nas múltiplas funções da mitocôndria induzidas por este contaminante. Porém os metabolitos da *ecstasy* poderão ser os principais responsáveis pela sua toxicidade pelo que o estudo dos efeitos dos principais metabolitos da MDMA, a N-metil- $\alpha$ -metildopamina (N-Me- $\alpha$ -MeDa) e a  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDa) ao nível mitocondrial será essencial para o esclarecimento dos efeitos da *ecstasy in vivo* e constituem uma perspectiva futura na continuação deste trabalho.

## **V- BIBLIOGRAFIA**

---

- Adam R., Winstock K. and Ramsey J. (2002). 4-MTA: a new synthetic drug on the dance scene. *Drug and Alcohol Dependence* 67, 111-115.
- Al-Nasser I. (1999). Salicylate Induced Kidney Mitochondrial Permeability Transition is Prevented by Cyclosporin. *Toxicol.Lett* 105, 1-8.
- Al-Nasser I (2000). Ibuprofen-Induced Liver Mitochondrial Permeability Transition. *Toxicol Lett* 111, 213-218.
- Andreu V., Mas A., Bruguera M., Salmerón J.M., Moreno V. and Nogué S. (1998). Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. *J Hepatol* 29, 394-7.
- Augustin W., Wiswedel I., Noack H., Reinheckel T. and Reichelt O. (1997). Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem* 174, 199-205.
- Badon L.A., Hiks A., Lord K., Ogden B. A., Meleg-Smith S. and Varner K. J. (2002). Changes in Cardiovascular Responsiveness and Cardiotoxicity Elicited during Binge Administration of Ecstasy. *JPET* 302, 898-907.
- Baggott M., Boris H., Reese T.J., Mendelson J., Sferiosand E. and Zehnder J. (2000). Chemical Analysis of Ecstasy Pills.(Letter to the Editor) *JAMA* 284, 1.
- Bayley S.M., Pietsch E.C. and Cunningham C.C. (1999). Etanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I e III. *Free Rad Biol Med* 27, 891-900.
- Beitia G., Cobreros A., Sainz L. and Cenarruzabeitia E. (1999). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) -induced hepatotoxicity effect on cytosolic calcium signals in isolated hepatocytes. *Liver* 19, 234-41.
- Beitia G., Cobreros A., Sainz L. and Cenarruzabeitia E. (2000). Ecstasy-induced toxicity in rat liver. *Liver* 20, 8-15.
- Bernardi P., Colonna R., Costantini P., Eriksson O., Fontaine E., Ichas F., Massari S., Nicolli A., Petronili V. and Scorrano L. (1998). The mitochondrial permeability transition. *Bio Factors* 8, 273-281.
- Berridge M.J. (2003). Cardiac calcium signalling. *Biochem Soc Trans* 31, 930-3
- Boss O., Samec S., Paoloni-Giacobino A., Rossier C., Dulloo A., Seydoux J., Muzzin P and Giacobino J.P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue specific expression. *FEBS Lett* 408, 39-42.
- Brenner C. and Kroemer G. (2000). Apoptosis and Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 289, 1150-1151.
- Broekemeier K.M., Dempsey M.E. and Pfeiffer D.R. (1989). Cyclosporine A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem* 264, 7826-7832.
- Buntinas L., Gunter K.K., Sparagna G.C. and Gunter T.E. (2001). The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1504, 248-261.

- Byrne A.M., Lemasters J.J. and Nieminen A-L. (1999). Contribution of increased mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  to the mitochondrial permeability transition induced by *tert*-butylhydroperoxide in rat hepatocytes. *Hepatology* 29, 1523-1531.
- Cadenas E. and Davies K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230.
- Carafoli E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev. Biochem.* 56, 395-433.
- Cardoso C.M.P. (2004). Toxicidade mitocondrial de tamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, efeitos na permeabilidade transitória e na bioenergética mitocondrial. *Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra*.
- Carmo H., Hengstler J.G., Bóer D., Ringel M., Carvalho F., Fernandes E., Remião F., Reys L.A., Oesch F. and Bastos M.L. (2004). Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369, 198-205.
- Carmo H., Remião F., Carvalho F., Fernandes E., Boer D. Reys L.A., and Bastos M.L. (2003). 4-Methylthioamphetamine-induced hyperthermia in mice: influence of serotonergic and catecholaminergic pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 190, 262-71.
- Carmody R.J. and Cotter T.G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 6, 77-90.
- Carvalho M., Hawksworth G., Milhazes N., Borges F., Monks T.J. and Carvalho M. (2004). Metabolism is required for the expression of Ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chem. Res. Toxicol* 17, 623-632.
- Carvalho M., Carvalho F. and Bastos M.L. (2001). Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. *Arch Toxicol* 74, 789-793.
- Carvalho M., Carvalho F., Remião F., Pereira M.L. Pires-das-Neves R. and Bastos M. L. (2002). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch Toxicol* 76, 166-172.
- Carvalho M., Milhazes N., Remião F., Borges F., Fernandes E., Amado F., Monks T.J., Carvalho F. and Bastos M.L. (2004<sup>a</sup>). Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and *a*-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch Toxicol* 78, 16 – 24.
- Carvalho M., Remião F., Milhazes N., Borges F., Fernandes E., Carvalho F. and Bastos M.L. (2004). The toxicity of *N*-methyl-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and *N*-acetylcysteine. *Toxicology* 200, 193 – 203.
- Centro Europeu de monitorização para as drogas e toxicodependência [EMCDDA] 1999
- Chakraborti T., Das S., Mondal M., Roychoudhury S. and Chakraborti S. (1999). Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 11, 77-85.
- Chandra J., Samal A. and Orrenius S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.

- Che S., Johnson M., Hanson G.R. and Gibb J.W. (1995). Body temperature effect on methylenedioxyamphetamine-induced acute decrease in tryptophan hydroxylase activity. *Eur J Pharmacol* 293, 447–453.
- Chernyak B.V. and Bernardi P. (1996). The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem* 238, 623-630.
- Cohen R.S. (1995) Subjective reports on the effects of the MDMA ('ecstasy') experience in humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19, 1137-45.
- Colado M. I., Camarero J., Mechan A.O., Sanchez V., Esteban B., Elliott M. and Green R. (2001). A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134, 1711 – 1723.
- Cole J.C., Bailey M., Harry R., Graham F. and King L.A. (2002). The content of ecstasy tablets: implications for the study of their long-term effects. *Society for the Study of Addiction to Alcohol and Other Drugs Addiction* 7, 1531–1536.
- Collins J. T., Berridge M.J., Lipp P. and Bootman M.D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 21, 1616-1627.
- Crompton M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341, 233-249.
- Custódio J.B.A., Moreno A.J.M. and Wallace K.B. (1998). Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by  $Ca^{2+}$  and inorganic phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol* 152, 10-17.
- Custódio, J. B. A., Cardoso C. M. P. and Almeida L. (2002). Thiol protecting agents and antioxidants inhibit the mitochondrial permeability transition promoted by etoposide: implications in the prevention of etoposide-induced apoptosis. *Chem Bio. Inter* 140, 169-184.
- Dabadie P., Bendriss P., Erny P and Mazat J.P. (1987). Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 226, 77–82.
- Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N. and Kroemer G (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476, 118-123.
- De la Torre R., Farré M., Ortuño J., Mas M., Brenneisen R. and Roset P.N. (2000a). Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br J Clin Pharmacol* 49, 104-9.
- De la Torre R., Farré M., Roset P.N., Hernández L.C., Mas M. and Ortuño J. (2000b). Pharmacology of MDMA in humans. *Ann N Y Acad Sci* 914, 225-37.
- De Letter E.A., Coopman V.A., Cordonnier J.A. and Piette M.H. (2001). One fatal and seven non-fatal cases of 4-methylthioamphetamine (4-MTA) intoxication: clinico-pathological findings. *Int J Legal Med* 114, 352-6
- Decaestecker T., De Letter E., Clauwaert K., Bouche M.P., Lamnert W., Boxlaer V., Piette M., Van den Eeckout E., Peteghem C.V. and Leenheer A. (2001). Fatal 4-Mta Intoxication: Development of a liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Assay for multiple matrices. *J Ann Toxicol* 705-710.

- Decaudin D., Geley S., Hirsch T., Castedo M., Marchetti P., Macho A., Kofler R. and Kroemer G. (1997). Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 57, 62-67.
- Desagher S. and Martinou J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
- Doran E. and Halestrap A.P. (2000). Cytochrome c release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture: possible role of contact sites. *Biochem J* 348, 343-350.
- Duchen M.R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* 516, 1-17.
- Dykhuisen R.S, Brunt P.W, Atkinson P., Simpson J.G. and Smith C.C. (1995). Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. *Gut* 36,939-41.
- Henry J.A., Jeffreys K., Dawling S. (1992). Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet* 340, 384-7.
- Edward M.M., Banks M.L., Sprague J.E. and Finkel T. (2003). Uncoupling the agony from ecstasy. *Nature* 426, 403-404.
- Elk C. (1996). MDMA (Ecstasy): useful information for health professionals involved in drug education programs. *J Drug Educ* 26, 349-356.
- Elliott M. and Green R. (2001). A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain". *Br J Pharmacol* 134, 1711 -1723.
- Elliott S.P. (2001). Analysis of 4-methylthioamphetamine in clinical specimens. *Ann Clin Biochem* 38, 339-47.
- Ellis A.J, Wendon J.A, Portmann B. and Williams R. (1996). Acute liver damage and ecstasy ingestion. *Gut* 38, 454-8.
- Enerback S., Jacobsson A., Simpson E.M., Guerra C., Yamashita H., Harper M.E. and Kozak L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94.
- Fagian M.M., Pereira-da-Silva L., Martins I.S. and Vercesi A. (1990). Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants. *J Biol Chem* 265, 19955-19960.
- Fernandes E., Carvalho F. and Bastos M.L. (2002). Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol* 76, 581-588.
- Fischer H.S, Zernig G., Schatz D.S, Humpel C. and Saria A. (2000). MDMA ('ecstasy') enhances basal acetylcholine release in brain slices of the rat striatum. *Eur J Neurosci* 12, 1385-90.
- Fleury C., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F., Seldin M.F., Surwit R.S., Ricquier D. and Warden C.H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 15, 269-72.

- Fontaine E. and Bernardi P. (1999). Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr* 31, 335-345.
- García-Ruiz C., Colell A., Marí M., Morales A. and Fernández-Checa J.C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272, 11369-11377.
- García-Ruiz C., Colell A., París R. and Fernández-Checa J.C. (2000). Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB J* 14, 847-858.
- Garvey W. T. (2003). The role of uncoupling protein 3 in human physiology. *J Clin Invest*. 111 438–441.
- Gesi M., Lenzi P., Soldani P., Ferruci M., Giusiani A., Fornai F. and Paparelli A. (2002). Morphological Effects in the Mouse Myocardium After Methylenedioxymethamphetamine Administration Combined With Loud Noise Exposure. *Anatomical Record* 267, 37–46.
- Gesi M., Soldani P., Lenzi P., Ferrucci M., Giusiani A., Fornai F. and Paparelli A. (2002). Ecstasy during Loud Noise Exposure Induces Dramatic Ultrastructural Changes in the Heart. *Pharmacol & Toxicol*, 91, 29–33.
- Gobbi M., Moia M., Pirona L., Ceglia I., Reyes-Parada M., Scorza C. and Mennini T. (2002). P-Methylthioamphetamine and 1-(m-chlorophenyl) piperazine, two non-neurotoxic 5-HT releasers in vivo, differ from neurotoxic amphetamine derivatives in their mode of action at 5-HT nerve endings in vitro. *Journal of Neurochemistry* 82, 1435–1443.
- Gomes L.A.V. (2003). Toxicidade Mitocondrial da Cisplatina: Efeitos na Bioenergética e na Permeabilidade Transitória. *Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra*.
- Green A. R., Mehan A.O., Elliot J. M., O'shea E. and Colado M. I. (2003). The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4- Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacol Rev* 55, 463–508.
- Green D.R. and Reed J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Grinspoon L. and Bakalar J.B. (1986). Can drugs be used to enhance the psychotherapeutic process? *Am J Psychothe* 40, 393–404.
- Grisham J.W. (1980). Cell types in long-term propagable cultures of rat liver. *Ann N Y Acad Sci* 349, 128–37.
- Grob C.S, Poland R.E, Chang L. and Ernst T. (1996). Psychobiologic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans: methodological considerations and preliminary observations. *Behav Brain Res* 73, 103-7.
- Groombridge C.J. (1998). The identification of 4- methylthioamphetamine in a drug seizure. *Microgram* 31, 50-159.
- Gunter T.E. and Pfeiffer D.R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258, 755-786.
- Gunter T.E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R. and Gunter K. (2000). Mitochondrial and calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28, 285-296.



- Halestrap A.P. (1999). The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp* 66, 181-203.
- Halestrap A.P., McStay G.P. and Clarke S.J. (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153-166.
- Hansen J.P, Riddle E.L, Sandoval V., Brown J.M, Gibb J.W, Hanson G.R. and Fleckenstein A.E., (2002). Methylenedioxymethamphetamine decreases plasmalemmal and vesicular dopamine transport: mechanisms and implications for toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 1093–1100.
- He L. and Lemasters J.J. (2002). Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett* 512, 1-7.
- Henry J.A, Fallon J.K, Kicman A.T., Hutt A.J., Cowan D.A. and Forsling M. (1998). Lowdose MDMA («ecstasy») induces vasopressin secretion. *Lancet* 351, 1784.
- Huang X., Marona-Lewicka D. and Nichols E. (1992). P-Methyltioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotonin-releasing agent. *Eur J Pharmacol* 229, 31-38.
- Hunter D.R., Haworth R.A. and Southard J.H. (1976). Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 251, 5069-5077.
- Ichas F., Jouaville L.S. and Mazat J-P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89, 1145-1153
- Jaburek M., Varecha M., Gimeno R.E., Dembski M., Jezek P., Zhang M., Burn P., Tartaglia L.A. and Garlid K.D. (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* 274, 274-279.
- Jacobson J. and Duchen M.R. (2004). Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling *Mol Cell Biochemistry* 257, 209–218.
- Jezek P. and Garlid K.D. (1998). Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1163-1168.
- Johnalyn L. and Cadet J.I. (2003). Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Research Reviews* 42, 155–168.
- Jones A.L. and Simpson K.J. (1999). Mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications. *Aliment Pharmacol Ther* 13, 129-33.
- Khakoo S.I, Coles C.J, Armstrong J.S. and Barry R.E. (1995). Hepatotoxicity and accelerated fibrosis following 3,4-methylenedioxymetamphetamine («ecstasy») usage. *J Clin Gastroenterol* 20, 244-7.
- Kinnally K.W., Antonenko Y.N. and Zorov D.B. (1992). Modulation of inner mitochondrial membrane channel activity. *J Bioenerg Biomembr* 24, 99-110.
- Kirkinezos I.G. and Moraes T. (2001). Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell & developmental biology* 12, 449–457.
- Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* 495, 12-15.

- Korsmeyer S.J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 59, 1693-1700.
- Kristal B.S., Park B.K. and Yu B.P. (1996). 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 271, 6033-6038.
- Kroemer G. and Reed J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Kroemer G., Dallaporta B. and Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60, 619.
- Rousset S., Alves-Guerra M., Mozo J., Miroux. B., Cassard-Doulcier A., Bouillaud F., Ricquier D. (2004). The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *DIABETES* 53, 30-35.
- Laranjeira R., Dunn J., Rassi R. and Fernandes M. (1996). "Éxtase" (3,4 metilendioxi metanfetamina, MDMA): uma droga velha e um problema novo? *Revista ABP-APAL*; 18, 77– 81.
- Lee H.C. and Wei Y-H. (2000). Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 7, 2-15.
- Lemasters J.J. (1999). V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 276, G1-G6.
- Lenaz G., D'Aurelio M., Merlo Pich M., Genova M.L., Ventura B., Bovina C., Formigini G. and Parenti Castelli G. (2000). Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta* 1459, 397-404.
- Leonardi E.T. and Azmitia E.C., (1994). MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 10, 231–238.
- Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler B., Kerner J. and Hoppel C.L. (2001). Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1065-89.
- Li H.L. and Yuan J.Y., (1999). Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 11, 261-266.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157.
- Loeffler M. and Kroemer G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256, 19-26.
- Mahmud T., Rafi S.S., Scott D.L., Wrigglesworth J.M. and Bjarnason I. (1996). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Arthritis Rheum* 39, 1998–2003.
- Mangado E. O. (2002). Drogas de diseño. *Med Clin (Barc)* 119, 375-6.
- Mannella C.A. (2000). Our changing views of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 32, 1-4.
- Mannella C.A., Pfeiffer D.R., Bradshaw P.C., Moraru I.I., Slepchenko B., Loew L.M., Hsieh C.E., Buttle K. And Marko M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52, 93-100.
- Maurer H. H., Bickeboeller-friedrich J., Kraemer T and Peter F.T (2000). Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ("ecstasy"). *Toxicol Lett* 112-113:133-142.

- Mao W., Yu X.X., Zhong A., Li W., Brush J., Sherwood S.W., Adams S.H. and Pan G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 443, 326-330.
- Martinou J.C, Desagher S. and Antonsson B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nature Cell Biol* 2, E41-E43.
- Mas M, Farré M, De-la-Torre R., Roset P.N., Ortuño J. and Segura J. (1999). Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 290, 136-45.
- Mattson M.P. and Liu D. (2003). Mitochondrial potassium channels and uncoupling proteins in synaptic plasticity and neuronal cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 539-549.
- McCann U.D., Slate S.O. and Ricaurte G.A. (1996). Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy"). *Drug Saf* 15,107-15.
- McClain H.J. and Sapienza F. (1989). The role of abuse liability testing in drug control procedures. In: Fischman MW, Mello NK, eds. Testing for abuse liability of drugs in humans. *Research Monograph Series* 92, 21-42.
- McConkey D.J. and Orrenius S. (1997). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 357-366.
- McKenna C. (2002). Ecstasy is low in league table of major causes of deaths. *BMJ* 325, 296.
- Mechan A.O., Esteban B., O'Shea E., Elliott J.M., Colado M.I. and Green A.R. (2002). The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) to rats. *Br J Pharmacol* 135,170-80.
- Mitchel P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev* 41, 445-502.
- Montiel-Duarte C., Ansorena E., Lopez-Zabalza M.J., Cenarruzabeitia E. and Iraburu M. (2004). Role of reactive oxygen species, glutathione and NF- $\kappa$ B in apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") on hepatic stellate cells. *Biochem Pharm* 67, 1025-1033.
- Montiel-Duarte C., Varela-Rey M., Ose's-Prieto J. A., Lopez-Zabalza M.J., Beitia G., Cenarruzabeitia E. and Iraburu M. (2002). 4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *BBA* 1588, 26-32.
- Mørland J. (2000). Toxicity of drug abuse — amphetamine designer drugs (ecstasy): mental effects and consequences of single dose use. *Toxicol Lett* 112, 147-52.
- Nagy T.R., Blaylock M.L., Garvey W.T. (2004). Role of UCP2 and UCP3 in nutrition and obesity. *Nutrition* 20,139-44.
- Nicholls D.G. (1977). The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue. Dependency on proton electrochemical potential gradient. *Eur J Biochem* 77, 349-356.
- Nicholls D.G. (1978). The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. *Biochem J* 176, 463-474.

- Nicholls D.G. and Locke R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64.
- OEDT (2003). Relatório anual de 2003- A evolução do fenómeno da droga na união europeia e na Noruega. Observatório Europeu da droga e toxicodependência, Lisboa ISSN 1609-6185.
- Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Pacifici R., Zuccaro P., Hernández L.C., Pichini S., Di-Carlo S. and Farré M. (2001). Acute effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine alone and in combination with ethanol on the immune system in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 207-15.
- Packer M.A. and Murphy M.P. (1994). Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by cyclosporin A. *FEBS Lett* 345, 237-240.
- Packer M.A., Scarlett J.L., Martin S.W. and Murphy M.P. (1997). Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite. *Biochem Soc Trans* 25, 909-914.
- Parone P.A., James D. and Martinou J.C. (2002). Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84, 105-111.
- Parrott A.C. (2004). Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. *Psychopharmacology* 173, 234-241.
- Pastorino J.G., Marcineviciute A., Cahill A. and Hoek J.B. (1999). Potentiation by chronic ethanol treatment of the mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Res Comms* 265, 405-409.
- Patel M.M., Belson M.G., Wright D., Lub H., Heninger M. and Miller M.A. (2005). Methylenedioxyamphetamine (ecstasy)-related myocardial hypertrophy: An autopsy study. *Resuscitation* 66, 197-202.
- Pecqueur C., Alves-Guerra M.C., Gelly C., Levi-Meyrueis C., Couplan E., Collins S., Ricquier D., Bouillaud F. and Miroux B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276, 8705-8712.
- Pederson P.L. (1999). Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* 31, 291-304.
- Petit P.X., Goubern M., Diolez P., Susin A.S., Zamzami N. and Kroemer G. (1998). Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett* 426, 111-116.
- Petrescu I. and Tarba C. (1997). Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim Biophys Acta*. 1318, 385-94.
- Poortman A.J. and Lock E. (1999). Analytical profile of 4-methylthioamphetamine (4-MTA), a new street drug. *Forensic Sci International* 100, 221-233.
- Raha A. and Robinson B.H. (2001). Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 106, 62-70.
- Raha S. and Robinson B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 25, 502-508.

- Ravagnan L., Roumier T. and Kroemer G. (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192, 131-137.
- Reed J.C. (1997). Cytochrome c: can't live with it—can't live without it. *Cell* 91, 559-562.
- Richter C. (1993). Pro-oxidants and mitochondrial  $Ca^{2+}$  their relationship to apoptosis and oncogenesis, *FEBS Lett* 325, 104-107.
- Richter C. and Kas G.E. (1991). Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular  $Ca^{2+}$  homeostasis, cell death, proliferation and differentiation. *Chem Biol Interact* 77, 1-23.
- Ricquier D. and Bouillaud F. (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 1, 3-10.
- Rohrig T.P. and Prouty R.W. (1992). Tissue distribution of methylenedioxymethamphetamine. *J. Anal. Toxicol* 16, 52-53.
- Rothman R.B., Baumann M.H., Dersch C.M., Romero D.V., Rice K.C., Carroll F.I. and Partilla J.S. (2001) Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* 39, 32–41.
- Rusyniak D. E., Tandy S. L., Kamendulis L. M., Sprague J. E. and Klaunig J. E. (2004). The Effects of Ecstasy (MDMA) on Rat Liver Bioenergetics. *Acad Emerg Med* 11 7, 723-729.
- Sanchis D., Fleury C., Chomiki N., Gubern M., Huang Q., Neverova M., Gregoire F., Easlick J., Raimbault S., Levi-Meyrueis C., Miroux B., Collins S., Seldin M., Richard D., Warden C., Bouillaud F. and Ricquier D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 273, 34611-34615.
- Sardão V.A, Oliveira P.J. and Moreno A.J.M. (2002). Caffeine enhances the calcium –dependent cardiac mitochondrial permeability transition: Relevance for Caffeine toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 179, 50-56.
- Saris N.L. and Carafoli E. (2005). A Historical Review of Cellular Calcium Handling, with Emphasis on Mitochondria. *Biochemistry (Moscow)* 70, 2, 187-194. Translated from *Biokhimiya* 70, 231-239.
- Saunders N. (1996). Ecstasy e a cultura dance. São Paulo: *Publisher Brasil*.
- Scheffler I.E. (2000). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1, 3-31.
- Schmidt C.J., (1994). Neurochemistry of ring-substituted amphetamine analogs. 151-175. In Cho AK and Segal D.S [eds], Amphetamine and its analogs. *Academic Press, San Diego*.
- Schuckit M. A. (1994). MDMA (Ecstasy): “An old drug with new tricks” *Drug abuse and alcoholism newsletter* 23.
- Schwartz R.H. and Miller N.S. (1997). MDMA (ecstasy) and the rave: a review. *Pediatrics* 100, 705–708.
- Scorza C., Silveira R., Nichols D.E. and Reyes-Parada M. (1999). Effects of 5-HT-releasing agents on the extracellular hippocampal 5-HT of rats. Implications for the development of novel antidepressants with a short onset of action. *Neuropharmacology* 38, 1055-6.

- Shankaran M. and Gudelsky G.A. (1999). A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacology* 147, 66– 72.
- Simantov R. (2004). Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). *Life Sciences* 74, 803–814.
- Skulachev V.P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 25, 100-24.
- Smaili S.S., Hsu Y-T., Carvalho A.C.P., Rosenstock T.R., Sharpe J.C. and Youle R.J. (2003) Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36, 183-190.
- Sparagna G.C., Gunter, K.K., Sheu, S.S. and Gunter T.E. (1995). Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem* 270, 27510-27515.
- Stuart J.A., Cadenas S., Jekabsons M.B., Roussel D. and Brand M.D. (2001). Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologue. *Biochim Biophys Acta* 1504, 144-158.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M.C., Alzari P.M. and Kroemer G. (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-394.
- Susin S.A., Zamzami N. and Kroemer G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366, 151-165.
- Szewczyk A. and Wojtczak L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54, 101-127.
- Turrens J.F. and Boveris A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191, 421-427.
- Tzagoloff A. (1982). Mitochondria. *Plenum Press, New York*
- Ursini F., Maiorino M. and Gregolin C. (1986). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int J Tissue React* 8, 99-103.
- Varela-Rey M., Montiel-Duarte C., Beitia G., Cenarruzabeitia E. and Iraburu M. J. (1999). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) stimulates the expression of a1(I) Procollagen mRNA in Hepatic Stellate Cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 259, 678–682.
- Vaux D.L. and Korsmeyer S.J. (1999). Cell death in development. *Cell*. 22 , 245-54.
- Vidal-Puig A.J., Grujic D., Zhang C.Y., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik A., Wade J., Mootha V., Cortright R., Muoio D.M. and Lowell B.B. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275, 16258-16266.
- Vieira H.L., Haouzi D., Hamel C.E., Jacotot E., Belzacq A.S., Brenner C. and Kroemer G. (2000). Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* , 1146-1154.

- Vollenweider F.X, Gamma A., Liechti M. and Huber T. (1998). Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA naive healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 19, 241-51.
- Wallace K.B. and Starkov A.A. (2000). Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev pharmacol Toxicol.*, 40, 353-388.
- Walubo A. and Seger D. (1999). Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "ecstasy": case report and review of the literature. *Hum Exp. Toxicol* 18, 119-125.
- Williams D.R. and Cole S.J. (1998). Ventricular fibrillation following butane gas inhalation. *Resuscitation* 37, 43-5.
- Wink C.S., Rossowska M.J, Joseph Jr.F., Yazdani M. and Nakamoto T. (1999). Effects of caffeine on heart mitochondria in newborn rats. *Biol Neonate* 76, 114-119.
- Woodrow G., Harnden P. and Turney J.H. (1995). Acute renal failure due to accelerated hypertension following ingestion of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Nephrol Dial Transplant* 10, 399-400.
- Zoratti M. and Szabo I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139-17.
- Zoratti M., Szabo I. and De-Marchia H. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Bioch Biophysic Acta* 1706, 40- 52.
- Zychlinski L. and Montgomery M.R. (1985). Chlorphentermine-induced biochemical alterations in mitochondrial membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 233, 39-44.
- Milroy C.M. (1999). Ten years of "ecstasy". *J R Soc Med* 92, 68-71.
- Peroutka S., (1987). Incidence of recreational use of 3,4 methylenedimethoxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on an Undergraduate campus. *N Engl. Med* 317, 1542-3.
- Rochester J.A, Kirchner J.T. (1999). Ecstasy (3, 4-methylenedioxymethamphetamine): history, neurochemistry, and toxicology. *J Am Board Fam Pract* 12, 137-142.