



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-NORTE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS

Mestrado em Ciências Forenses

**Efeitos da cocaína, morfina e sua combinação na
bioenergética mitocondrial do fígado**

Lisbeth Elena Sousa e Silva



Lisbeth Elena Sousa e Silva

**Efeitos da cocaína, morfina e sua combinação na
bioenergética mitocondrial do fígado**

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Forenses pelo Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte**

Trabalho de tese realizado sob a orientação de:
Maria Sancha Santos
Teresa Cunha-Oliveira

Nota: dissertação escrita segundo as regras do antigo acordo ortográfico

**Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte
Departamento de Ciências
2011**

Agradecimentos

Deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram na realização deste trabalho quer a nível prático, teórico ou emocional:

À minha orientadora, Doutora Maria Sancha Santos, e co-orientadora, Doutora Teresa Cunha-Oliveira, por me terem orientado neste trabalho, pelos ensinamentos teóricos e práticos, e pela motivação que sempre me transmitiram.

À Ana Maria Silva pela sua enorme colaboração neste trabalho e, pela sua disponibilidade permanente em me ajudar.

Ao Doutor António Moreno pelos conhecimentos transmitidos e pelas respostas a inúmeras questões que se levantaram.

À Rute Loureiro pela companhia e boa disposição nas horas passadas no laboratório.

Ao meu namorado Marco, por toda a compreensão, preocupação, confiança, força, companhia, alegria, amizade e carinho.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e me animaram nas épocas mais difíceis.

À minha família que me apoiou incondicionalmente e sem os quais nada disto seria possível.

Índice

Agradecimentos	I
Abstract	IV
Resumo	VI
Abreviaturas	VIII
Capítulo I – Introdução	1
1.1 Abuso de drogas	2
1.2 Características das drogas de abuso	4
1.2.1 Cocaína	4
1.2.2 Heroína/Morfina	6
1.2.3 “Speedball”	8
1.3 Citotoxicidade	9
1.4 Mitocôndria	10
1.4.1 Aspectos gerais sobre a mitocôndria	10
1.4.2 Ciclo de Krebs	12
1.4.3 Fosforilação Oxidativa	15
1.4.4 Stresse Oxidativo e mitocôndria	19
1.4.5 Transporte de cálcio (Ca ²⁺) pela mitocôndria	23
1.4.6 Permeabilidade transitória mitocondrial (PTM)	24
Capítulo II - Objectivos	26
Capítulo III - Métodos	29
3.1 Isolamento das mitocôndrias	30
3.2 Quantificação da proteína – Método do Biureto	32
3.3 Determinação polarográfica da actividade respiratória das mitocôndrias	33
3.4 Determinação do potencial eléctrico transmembranar da mitocôndria	35
3.6 Avaliação da acumulação de cálcio (Ca ²⁺) pelas mitocôndrias	38
3.6.1 Técnica electrométrica (eléctrodo de Ca ²⁺)	38
3.6.2 Efeito da acumulação de Ca ²⁺ no potencial transmembranar das mitocôndrias	39
3.7 Avaliação da peroxidação lipídica	40
3.7.1 Consumo de oxigénio associado a peroxidação lipídica induzida pela adição do par ADP/Fe ²⁺	40
3.7.2 Método de TBARS	40

3.8	Quantificação da produção de H ₂ O ₂	41
3.9	Análise Estatística	42
Capítulo IV - Resultados		44
4.1	Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na respiração das mitocôndrias do fígado.....	45
4.2	Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína no potencial eléctrico transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	49
4.3	Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na actividade da ATPase mitocondrial	51
4.4	Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na acumulação de cálcio (Ca ²⁺) pelas mitocôndrias	52
4.5	Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na peroxidação lipídica.....	54
4.6	Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na produção mitocondrial de H ₂ O ₂	56
Capítulo V – Discussão		59
Capítulo VI – Conclusões Gerais		66
Capítulo VII - Bibliografia		68

Abstract

In present society, the use of drugs of abuse has reached the highest levels ever. This consumption causes many problems, from social to health status, because they cause drug dependence and addiction.

Cocaine and heroin are frequently co-abused in a combination known as speedball. In this context, the occurrence of chemical interactions between heroin (Her), or its metabolite morphine (Mor), and cocaine (Coc), was recently described, resulting in the formation of cocaine-morphine adducts, at a ratio of 1:1. It has been previously shown that this combination can induce specific mechanisms of toxicity, causing mitochondrial dysfunction in cultures of embryonic rat cortical neurons. However, much less is known about speedball-induced hepatotoxicity, despite the relevance of the liver in the metabolism and detoxification of these compounds.

In this work we evaluated the toxic effects of the combination of Coc and Mor in rat liver mitochondria incubated with Coc, Mor, or Mor+Coc combination (1:1), at a concentration range between 0.2 and 1 mM.

We analyzed the following mitochondrial bioenergetics parameters: respiration (respiratory states, respiratory control index and ratio ADP/O), by using a Clark-type O₂ electrode; mitochondrial potential and Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition (MPT), evaluated through fluctuations of transmembrane, electric potential using a TPP⁺ electrode; mitochondrial Ca²⁺ accumulation, by using a Ca²⁺ electrode; and the ATPase activity, by using a pH electrode. We also evaluated parameters related to oxidative stress: lipid peroxidation, by analyzing O₂ consumption and TBARS formation; and the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) mitochondrial, by using a spectrofluorimetric method.

The results obtained in respiratory parameters show that the effects of the combined formulation of Mor+Coc are similar to Coc alone: it increases the passive permeability of the inner membrane to protons; inhibits mitochondrial respiratory chain and decreases the transmembrane electrical potential generated by respiration. None of the drugs, alone or in combination, affects the MPT induced by calcium. For the parameters of oxidative stress, experimental

data indicate that the effects of the combination Mor+Coc are similar to Mor alone, since both show antioxidant activity, protect from membrane lipid peroxidation and decrease the formation of H₂O₂ by mitochondria.

In conclusion, the present work suggests that the direct sequential exposure of liver mitochondria to Mor and Coc does not alter the effects observed in the presence of each drug alone, or in other words, it does not affect cocaine's effect on mitochondrial bioenergetics nor the antioxidant effect of morphine.

These results may be important to explain forensic cases of death by co-consumption of heroin and cocaine. The data may be helpful to understand, for example, if death by overdose occurs more rapidly in co-users of heroin and cocaine than in users of the same dose of only one of these drugs.

Resumo

Na sociedade actual o consumo de drogas de abuso atingiu os valores mais altos de sempre. Este consumo acarreta enormes problemas, de ordem social e de saúde, devido ao facto de provocarem toxicoddependência e adição.

A cocaína (Coc) e a heroína (Her) são frequentemente usadas em conjunto, numa combinação conhecida como *speedball*. Neste contexto, foi recentemente descrita a ocorrência de interacções químicas entre a heroína, ou o seu metabolito morfina (Mor), e a Coc, com formação de aductos Coc-Mor na proporção de 1:1. Demonstrou-se anteriormente que esta combinação pode induzir mecanismos específicos de toxicidade, causando disfunção mitocondrial em neurónios corticais de embrião de rato. No entanto, pouco se sabe sobre a hepatotoxicidade induzida pelo *speedball*, apesar da relevância do fígado no metabolismo desses compostos.

Neste trabalho avaliaram-se os efeitos tóxicos da combinação de Coc e Mor em mitocôndrias isoladas de fígado de rato incubadas com Coc, Mor, ou combinação Mor+Coc (1:1), num intervalo de concentrações entre 0,2 e 1 mM.

Foram analisados os seguintes parâmetros da bioenergética mitocondrial: parâmetros respiratórios (estados respiratórios, índice de controlo respiratório e rácio ADP / O) usando um eléctrodo de O₂ tipo Clark; potencial mitocondrial e permeabilidade transitória mitocondrial induzida por Ca²⁺/Pi (PTM), avaliados através das flutuações do potencial eléctrico transmembranar, usando um eléctrodo de TPP⁺; acumulação mitocondrial de Ca²⁺, usando um eléctrodo de Ca²⁺; e a actividade da ATPase, usando um eléctrodo de pH. Avaliámos também parâmetros relacionados com o stresse oxidativo: peroxidação lipídica, analisando o consumo de O₂ e a produção de TBARS; e a produção de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) mitocondrial, usando um método espectrofluorimétrico.

Os resultados obtidos nos parâmetros respiratórios mostram que os efeitos da combinação Mor+Coc são semelhantes aos da Coc sozinha: promovem o aumento da permeabilidade passiva da membrana interna a protões; inibem a cadeia respiratória mitocondrial e diminuem o potencial eléctrico transmembranar gerado pela respiração. Nenhuma das drogas,

isoladamente ou em combinação, afecta o PTM induzido por cálcio. Relativamente aos parâmetros de stresse oxidativo, os resultados obtidos indicam que os efeitos da combinação Mor+Coc são semelhantes ao da Mor sozinha, apresentando ambas actividade antioxidante, ao protegerem da peroxidação lipídica membranar e reduzirem a formação de H₂O₂ pelas mitocôndrias.

Em conclusão, o presente trabalho sugere que a exposição sequencial das mitocôndrias de fígado a Mor e Coc não altera os efeitos observados na presença de cada uma das drogas isoladamente, ou seja, não altera o efeito da Coc na bioenergética mitocondrial nem o efeito antioxidante da Mor.

Estes resultados poderão ser importantes a nível forense para explicar casos de morte por co-consumo de Her e Coc. Poderão ajudar a entender, por exemplo, se a morte por *overdose* ocorre mais rapidamente no co-consumo de Her e Coc do que se fosse consumida a mesma dose de apenas uma dessas drogas.

Abreviaturas

$\Delta \Psi_m$	Potencial transmembranar da mitocôndria
ΔpH	Gradiente de pH
AA	Antimicina A
ADP	Adenosina-5'- Difosfato
ANT	Transportador de Nucleótidos de Adenina
ATP	Adenosina-5'- Trifosfato
ATPase	Adenosina Trifosfatase
Bax	do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	Linfoma de células B2
Bid	do Inglês <i>BH3-interacting death-domain agonist</i>
BSA	Albumina do Soro de Bovino
CCCP	Carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona
CK	Creatinina Cinase
CNS	Sistema Nervoso Central
Coc	Cocaína
Cys A	Ciclosporina A
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOC	Desoxicolato de Sódio
EDTA	Ácido Etileno-diamino-tetracético
EGTA	Ácido Etileno-glicol-tetracético
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FCCP	Carbonildiciano- <i>p</i> -trifluoro-metoxifenil-hidrazona
FMN	Flavina Mononucleótido
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GPx	Peroxidase so Glutatião
glu/mal	glutamato/malato
HEPES	Ácido N-2-hidroietil-piperazina-N'-2-etanossulfônico
Her	Heroína
HK	Hexocinase
ICR	Índice de Controlo Respiratório

IDT	Instituto da Droga e Toxicodependência
MDA	Malonildialdeído
MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
Mor	Morfina
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reduzida)
nAtg	nano átomos de oxigénio
PBR	Receptor de Benzodiazepinas
Pi	Fosfato inorgânico
PTM	Permeabilidade Transitória Mitocondrial
PPT	Poros de Permeabilidade Transitória
Q	Ubiquinona
QH ₂	Ubiquinol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Espécies Reactivas de Azoto
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio
rot	rotenona
r.p.m	rotações por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
Suc	Succinato
TBA	Ácido Tio-barbitúrico
TBARS	Substâncias Reactivas ao Ácido Tio-barbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3 propanodiol
TPP ⁺	Catião Tetrafenilfosfónio
VDAC	Canal Aniónico Dependente de Voltagem

Capítulo I – Introdução

1.1 Abuso de drogas

Nas últimas décadas, a frequência de uso de drogas aumentou de uma forma assustadora em todo o mundo. O consumo de drogas em grande escala acarreta inúmeros problemas para a sociedade tornando-se um problema de saúde pública devido às consequências danosas do seu uso. Estando a Europa a atravessar um período de austeridade económica, os problemas com droga têm vindo a aumentar consideravelmente, assim como os danos colaterais de criminalidade e de insegurança. Além disso, o consumo de droga é uma das principais causas de problemas de saúde com graves implicações físicas e psíquicas e morte entre os jovens e adultos europeus (3).

O Instituto da Droga e Toxicodependência (IDT) referiu que, em Portugal, o número de mortes devido ao consumo de droga continua a aumentar. A elevada taxa de mortalidade entre os consumidores de droga está relacionada com inúmeros factores, tais como: complicações devido ao seu uso (por exemplo SIDA), overdose, suicídio, acidente, homicídio e os problemas associados a doenças crónicas resultantes do consumo repetido de estupefacientes, como problemas cardiovasculares nos consumidores de cocaína, entre outros.

Cocaína

Segundo o relatório anual de 2010 do Observatório Europeu da Droga e da toxicodependência (3), a cocaína é a segunda droga ilícita mais consumida na Europa, a seguir à *cannabis*.

A planta da coca é cultivada, maioritariamente, em três países da região andina: Peru, Bolívia e Colômbia. A cocaína é traficada para a Europa através de diferentes rotas marítimas e aéreas, sendo a Península Ibérica o principal ponto de entrada (figura 1) (4).

Muitas das mortes causadas pela cocaína não chegam ao conhecimento da polícia ou dos peritos da polícia científica devido à forma como se apresentam e ao perfil social das vítimas. A maioria das mortes causadas por esta droga deve-se a acidentes cardiovasculares e não a overdoses (3).

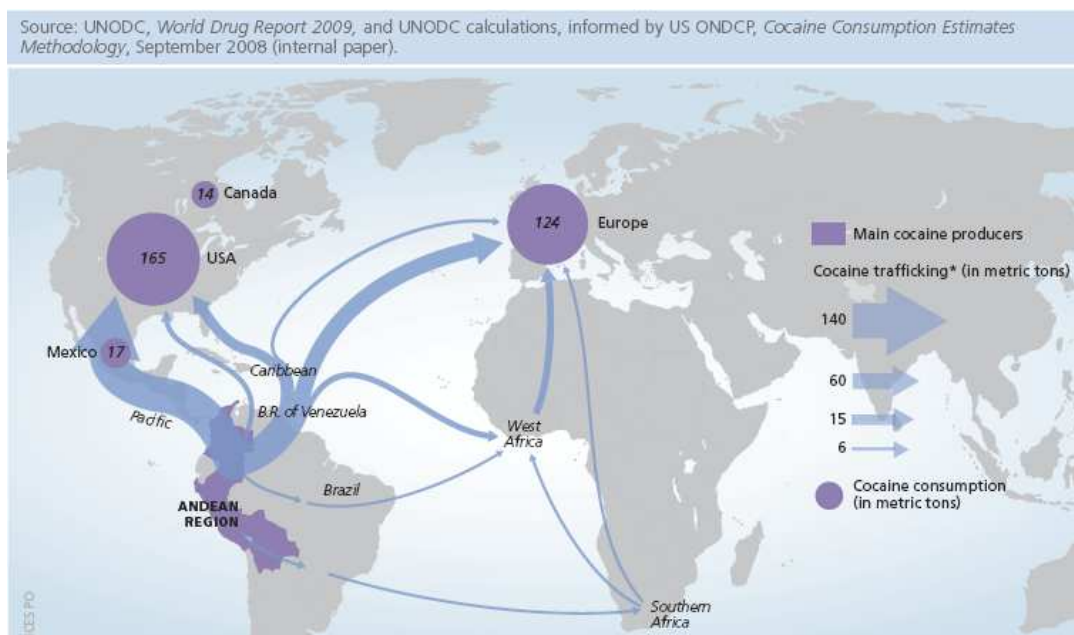


Figura 1: Rotas da cocaína a partir dos locais de produção (região andina) para os locais de consumo [figura adaptada de (4)].

Opiáceos

O Afeganistão é responsável pela maior parte da produção ilegal de ópio. A heroína consumida na Europa é produzida, maioritariamente, neste país, entrando na Europa pela «rota da seda» através da Ásia Central e da Rússia (4).

Na União Europeia o consumo de heroína, sobretudo injectada, é responsável pela maior parte da morbilidade e mortalidade relacionadas com o consumo de droga. As mortes devem-se, maioritariamente, a overdoses fatais e à transmissão de doenças infecto-contagiosas. O número de overdoses fatais comunicadas na União Europeia nas últimas duas décadas é equivalente a cerca de uma morte por overdose por hora (3).

1.2 Características das drogas de abuso

1.2.1 Cocaína

A cocaína (figura 2) é um alcalóide extraído da planta da coca, *Erythroxylon coca*. Ela é extraída na forma de “pasta”, porém, esta forma não é consumida devido aos efeitos demasiado potentes que provoca. Pode ser consumida por várias vias dependendo da sua forma química. As formas mais consumidas são: o sal cloridrato de cocaína, solúvel em água, e a cocaína base livre,

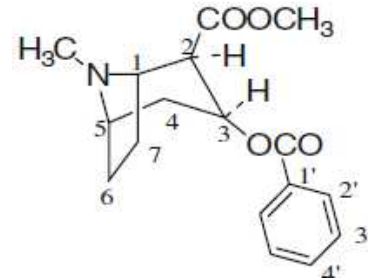


Figura 2: Representação esquemática da cocaína [figura adaptada de (1)].

insolúvel em água. O sal cloridrato de cocaína pode ser inalado (“snifado”) e, quando diluído, pode ser injectado. Para se obterem efeitos mais intensos e de forma mais rápida, desenvolveu-se uma forma de cocaína que pudesse ser fumada. Para isso, a cocaína é processada com amónia ou bicarbonato de sódio e água, e aquecida para remover o cloridrato. Esta forma é geralmente designada de “*crack*” devido ao som (estalos) que produz quando fumada (5).

Farmacocinética

As três principais vias de administração de cocaína usadas são: intranasal (“snifada”), intravenosa (injectada) e inalação (fumada). Existe ainda a ingestão (oral), mas não é tão usada. Dependendo da via de administração usada, a cocaína pode ser absorvida pelas membranas mucosas, tracto gastrointestinal e pulmões, respectivamente.

Pela via intravenosa a absorção é máxima pois toda a droga passa imediatamente para a circulação sanguínea. Pela via intranasal, a cocaína é absorvida ao nível das membranas mucosas sendo essa absorção limitada devido ao efeito vasoconstritor desta droga. Apenas 20 a 30 % da cocaína “snifada” é absorvida a partir da mucosa nasal para o sangue. Isto acontece porque algumas partículas ficam presas no nariz, sendo só uma pequena parte

absorvida na superfície dos pulmões. Quando a cocaína é vaporizada e fumada, apenas 6 a 32% chega ao plasma (5).

A maior parte da cocaína (cerca de 90%) é metabolizada pelas colinesterases do plasma e do fígado (figura 3), originando metabolitos inativos como o metil éster de ecgonina. Uma pequena fracção (cerca de 10%) é metabolizada pelo citocromo P450 do fígado originando metabolitos hepatotóxicos, tais como a norcocaína e a N-hidroxicocaína. A benzoilecgonina é o metabolito produzido espontaneamente a pH fisiológico. A N-desmetilação de benzoilecgonina produz benzoilnorecgonina. O metabolismo de benzoilecgonina e do metil éster de ecgonina origina ecgonina. Quando fumada a cocaína pode originar o metabolito metil éster de anidroecgonina. Quando consumida juntamente com álcool forma-se no fígado, por transesterificação, o metabolito tóxico cocaetileno (6;7).

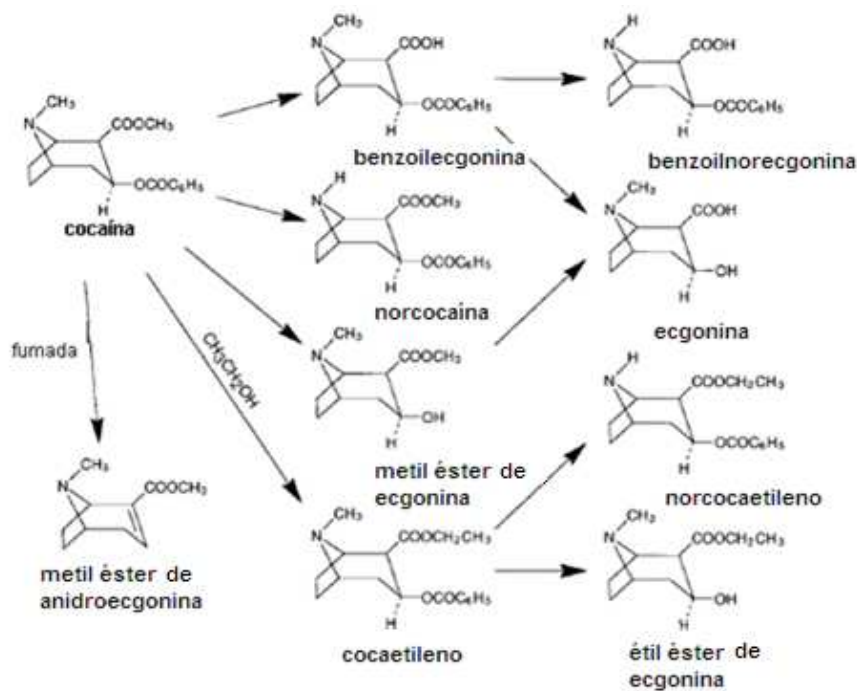


Figura 3: Vias metabólicas da Cocaína [imagem adaptada de (8)].

Farmacodinâmica

As três principais acções da cocaína, responsáveis pelos seus efeitos fisiológicos e psicológicos, são: o seu poder anestésico; o seu efeito vasoconstritor; e o seu poderoso efeito psicoestimulante com fortes qualidades de reforço positivo. Enquanto as duas primeiras acções contribuem para os

efeitos tóxicos severos a nível cardiovascular, a última é responsável pelo abuso compulsivo destas drogas (5).

A cocaína pertence ao grupo das drogas estimulantes pois estimula o sistema nervoso central e apresenta um enorme poder aditivo. Actua a nível molecular bloqueando a recaptação dos neurotransmissores: dopamina, serotonina e norepinefrina, levando assim ao aumento da sua concentração na fenda sináptica.

Os efeitos da cocaína nos vários sistemas de órgãos são o resultado da sua ligação a proteínas membranares (receptores, canais iónicos dependentes de voltagem), proteínas plasmáticas e enzimas metabólicas. Por exemplo, doses hepatotóxicas de cocaína resultam na formação de aductos com proteínas específicas do fígado de rato (9). A baixas concentrações, a ligação da cocaína às proteínas plasmáticas é de, aproximadamente, 91% (10). Ela liga-se à albumina plasmática e também à glicoproteína α 1-ácida (8).

A interacção da cocaína com a proteína depende de dois factores: a concentração da cocaína, e a afinidade entre a proteína e a cocaína. A concentração de cocaína no soro depende de quatro factores: a dose; a via de administração; a ligação da cocaína a proteínas plasmáticas; e a velocidade do metabolismo (11).

1.2.2 Heroína/Morfina

A heroína (figura 4 A) é um opióide semi-sintético extraído da papoila do ópio, *Papaver somniferum*. A morfina (figura 4 B) é um precursor e um metabolito desta droga. Foi isolada em 1806 pelo farmacêutico Hannover Adam Serturmer. Este opiáceo tem propriedades analgésicas sendo, por isso, usado no tratamento da dor aguda ou crónica. Daqui surgiu o seu nome em honra de Morfeu, o deus grego do sono.

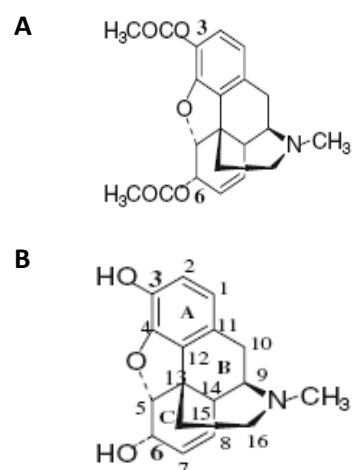


Figura 4: Estrutura das drogas. A: heroína e B: morfina [figura adaptada de (1)].

Farmacocinética

A morfina pode ser administrada por via oral, intranasal (“snifada”), intravenosa (injectada), ou pode ser fumada. Quando administrada oralmente a biodisponibilidade desta droga é baixa, devido ao metabolismo hepático de primeira passagem. Pela via intravenosa a morfina é completamente absorvida (12). Quando “snifada” é absorvida nas mucosas nasais, não sendo esta uma via muito eficiente para a elevação dos níveis séricos. Pode também ser absorvida à superfície dos pulmões, quando fumada, sendo rapidamente absorvida pelos capilares alveolares.

A heroína é rapidamente desacetilada, originando um metabolito activo, a 6-acetilmorfina (6-MAM), que por hidrólise origina morfina (figura 5). A formação de 6-MAM pode ocorrer espontaneamente no meio aquoso.

A morfina é metabolizada principalmente no fígado, sendo posteriormente excretada maioritariamente na urina (cerca de 90% da dose consumida) e aproximadamente 10% nas fezes. A principal via de metabolização usada é a de conjugação com o ácido glucurónico (fig. 5). Nesta via, o grupo hidroxilo fenólico livre sofre glucuronidação e produz morfina-3-glucuronídeo, um metabolito inactivo, altamente solúvel em água. Cerca de 5% da morfina administrada sofre desmetilação, formando um metabolito inactivo – normorfina (8).

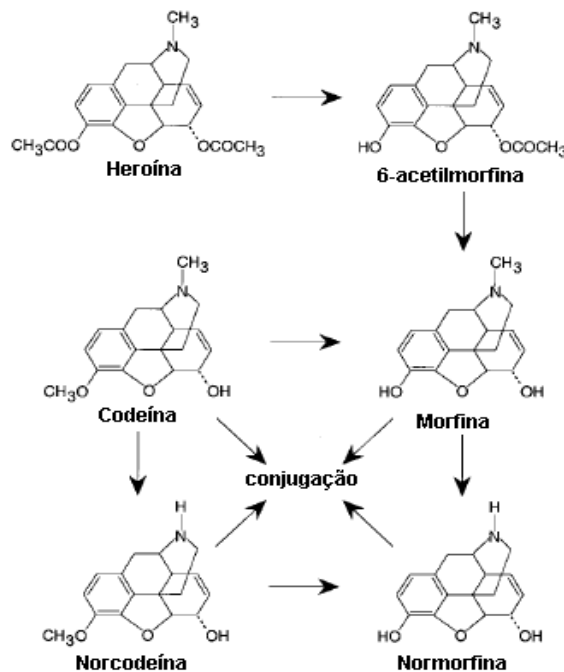


Figura 5: Via metabólica da heroína e morfina [imagem adaptada de (8)].

Farmacodinâmica

A heroína tem dois grupos acetilo (figura 4) que a tornam muito lipofílica facilitando a sua passagem através da barreira hemato-encefálica. Isto é importante porque, quanto mais rapidamente a droga chegar ao cérebro, maior será a concentração atingida e, conseqüentemente, maior o potencial de criar dependência e maior a amplitude dos efeitos tóxicos causados.

No entanto, a heroína precisa de perder esses grupos para poder activar os receptores opióides, pelo que a morfina é considerada o princípio activo da heroína. (13). Por isso, a heroína é considerada uma pro-droga devido ao facto de não ter actividade intrínseca, mas sendo lipofílica atravessa mais facilmente a barreira hemato-encefálica.

A morfina liga-se às proteínas plasmáticas de um modo independente da concentração (14). Ela liga-se principalmente à albumina, cerca de 5% à γ -globulina e 5% à glicoproteína α_1 -ácida. Para além de se ligar a proteínas plasmáticas esta droga liga-se a receptores opióides localizados por todo o corpo, produzindo assim o seu efeito farmacológico sistémico.

Estão descritos três tipos de receptores: os μ (mu), κ (kappa) e δ (delta) (13). Os opiáceos têm propriedades analgésicas devido, principalmente, à sua interacção com os receptores μ . A morfina é um agonista com maior actividade nos receptores μ do que nos κ e alguma actividade nos receptores δ (8).

Se um indivíduo consumir heroína, o composto que vai chegar à mitocôndria será a morfina e não a heroína.

1.2.3 “Speedball”

O consumo de cocaína por consumidores de heroína é muito comum possivelmente, devido ao facto dos efeitos destas drogas serem complementares - estimulante e sedativo - diminuindo assim os efeitos secundários uma da outra(15). Este consumo pode ser: simultâneo, quando as duas drogas são consumidas, juntas ou separadas, ao mesmo tempo – o designado “*speedball*”, ou sequencial, quando as duas drogas são consumidas em alturas diferentes (16).

A combinação simultânea parece possuir um efeito específico. Curiosamente, foi descrita a formação de aductos cocaína-morfina (Coc-Mor), na proporção de 1:1 (figura 6), em misturas de cocaína e heroína, caracterizadas por técnicas de espectroscopia (Raman e RMN) e de electroquímica. Esta interacção pode ocorrer tanto no estado sólido como em solução e observa-se, preferencialmente, para a forma protonada da morfina. Surgem duas novas ligações entre o grupo 3-fenólico e o oxigénio heterocíclico da morfina e, entre o oxigénio do grupo carbonilo e os protões do grupo metil éster da cocaína (1).

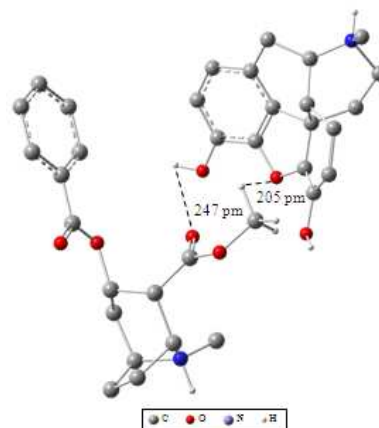


Figura 6: Esquema do aducto cocaína:morfina, na proporção de 1:1 [Imagem adaptada de (1)].

Na mistura cocaína:heroína (Coc:Her) a formação de aductos é mais fraca do que na mistura Coc:Mor porque, na heroína os grupos 3-OH são substituídos por grupos carbonilo. No entanto, como a heroína é rapidamente metabolizada a morfina, os aductos que se formam são maioritariamente cocaína:morfina (1).

A combinação Coc:Her é a mais usada pelos consumidores devido ao facto de a heroína ser mais lipofílica do que a morfina, atravessando mais rapidamente a barreira hematoencefálica obtendo, assim, efeitos mais rápidos. Contudo, a morfina pode ser usada em vez da heroína, o que pode ser vantajoso, uma vez que a solução de heroína é muito instável e rapidamente se transforma em morfina e, *in vivo*, a heroína é metabolizada pelas enzimas do fígado originando morfina.

1.3 Citotoxicidade

A cocaína e a morfina, assim como a maior parte das drogas, são metabolizadas a nível hepático tendo as mitocôndrias um papel central nesse metabolismo. Resultados anteriores mostraram que várias drogas de abuso induzem disfunção mitocondrial sugerindo assim que a mitocôndria é o

principal alvo intracelular da citotoxicidade das drogas. Em células do miocárdio, a cocaína (1 mM) inibe o complexo I da cadeia respiratória (17). Administrações *in vivo* levam à diminuição do estado 3 e do índice de controlo respiratório (ICR) em mitocôndrias hepáticas, e induzem a diminuição da actividade do complexo I, II/III e IV (7). A cocaína induz uma diminuição do potencial transmembranar mitocondrial e dos níveis de ATP em cardiomiócitos (18). Já em neurónios corticais de rato causa uma diminuição do potencial transmembranar mitocondrial e activa a via apoptótica mitocondrial (19). No entanto, a cocaína parece não ter efeito nos estados 3 e 4, ICR, e ADP/O, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (20).

Alguns estudos demonstram ainda que a cocaína induz um aumento da peroxidação lipídica (21) e um aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (22) em cérebro de rato.

A morfina também afecta a função mitocondrial, induzindo a diminuição do estado respiratório 4, aumento do estado 3, ICR e do rácio ADP/O, e inibindo a peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (23). Estudos *in vivo* demonstraram que a administração de morfina diminui os níveis de TBARS, a actividade da Na⁺-K⁺ ATPase e da ATPase total em tecido de cérebro de rato (24).

Na literatura existem poucos estudos sobre o efeito da combinação Mor+Coc, mas existem alguns estudos com Coc:Her, que mostraram que a mistura Coc:Her decrescia o potencial mitocondrial em neurónios corticais de rato (25).

1.4 Mitocôndria

1.4.1 Aspectos gerais sobre a mitocôndria

O termo mitocôndria, criado por Benda em 1898 (26), deriva do grego *mitos* (filamento) e *chondros* (grão) (26). É um organelo presente em todas as células eucarióticas, podendo ter formas e tamanhos variados, dependendo do

tipo de célula e do seu estado fisiológico (27). Existem cerca de 3000 a 5000 mitocôndrias em cada célula humana (28).

Podem ser visualizadas no microscópio óptico, mas detalhadamente só podem ser observadas no microscópio electrónico de varrimento. Têm, geralmente, uma forma oval com um comprimento de 1-2 μm e uma largura de 0,5-1 μm (28).

As mitocôndrias são constituídas por: membrana mitocondrial externa (MME), membrana mitocondrial interna (MMI), matriz envolvida pela MMI, e pelo espaço inter-membranar delimitado pelas duas membranas (figura 7).

A MME, constituída por cerca de 50% de proteínas e 50% de lípidos é altamente permeável, pois possui proteínas formadoras de poros (*porinas*) que permitem a passagem de moléculas pequenas e iões. A MMI é impermeável à maior parte das moléculas pequenas (excepto O_2 , CO_2 e H_2O) e iões (incluindo H^+). Caracteriza-se pela presença de invaginações (cristas), que variam de célula para célula, e de um elevado número de proteínas (cerca de 75% das proteínas mitocondriais). Destas proteínas fazem parte proteínas transportadoras específicas que permitem a troca controlada de metabolitos com o citoplasma e as proteínas que formam a cadeia respiratória e levam à síntese do ATP. A matriz possui grande parte das proteínas mitocondriais, cerca de 67%, e o espaço intermembranar contém cerca de 6% (28;29).

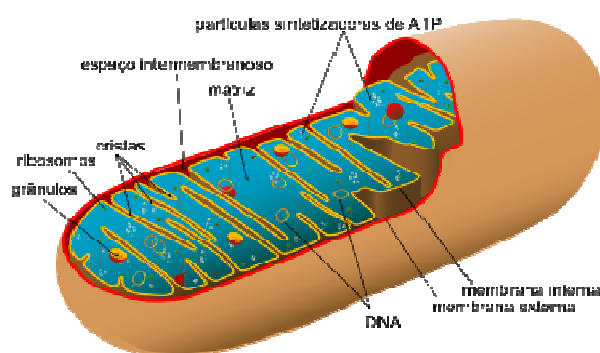


Figura 7: Esquema da constituição da mitocôndria

As mitocôndrias são organelos semi-autónomos pois possuem o seu próprio DNA, uma molécula circular de cadeia dupla, assim como toda a maquinaria para a sua transcrição e tradução. O DNA mitocondrial (mtDNA)

localiza-se na matriz estando, por vezes, ligado à membrana mitocondrial interna. A espécie humana possui dos mtDNA mais pequenos, consistindo numa molécula com 16.569 pares de bases, que codifica: 13 proteínas da cadeia respiratória, 2 RNA ribossómicos (rRNA) e 22 RNA transferência (tRNA). Das 13 proteínas da cadeia respiratória fazem parte: 3 subunidades do complexo IV, 2 subunidades da ATPase (Complexo V), 7 subunidades do complexo I e uma subunidade do complexo III. O código genético das mitocôndrias difere do código padrão usado para genes nucleares eucarióticos e procarióticos (28;29).

Actualmente a mitocôndria é alvo de inúmeros estudos, dada a importância das suas funções para o organismo humano. Entre elas temos o seu papel na homeostasia celular: sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteróides e nucleótidos. Contudo, a sua principal função centra-se no metabolismo energético, nomeadamente na: β -oxidação dos ácidos gordos, ciclo da ureia e na via final comum de produção de ATP – cadeia respiratória. A mitocôndria sintetiza cerca de 95% do ATP requerido pelas células eucarióticas (30).

1.4.2 Ciclo de Krebs

O metabolismo aeróbio na mitocôndria começa com a produção de acetil-coenzima A (acetil-CoA) a partir do catabolismo das três biomoléculas principais a nível bioenergético: açúcares, lípidos e proteínas (figura 8).

Os açúcares após a glicólise, que ocorre no citoplasma, dão origem a piruvato. Este entra na matriz mitocondrial e, por descarboxilação oxidativa, origina acetil-CoA. Os lípidos decompõem-se em ácidos gordos livres que, posteriormente, geram acetil-CoA por β -oxidação. As proteínas decompõem-se em aminoácidos, e estes sofrem desaminação oxidativa gerando acetil-CoA (29).

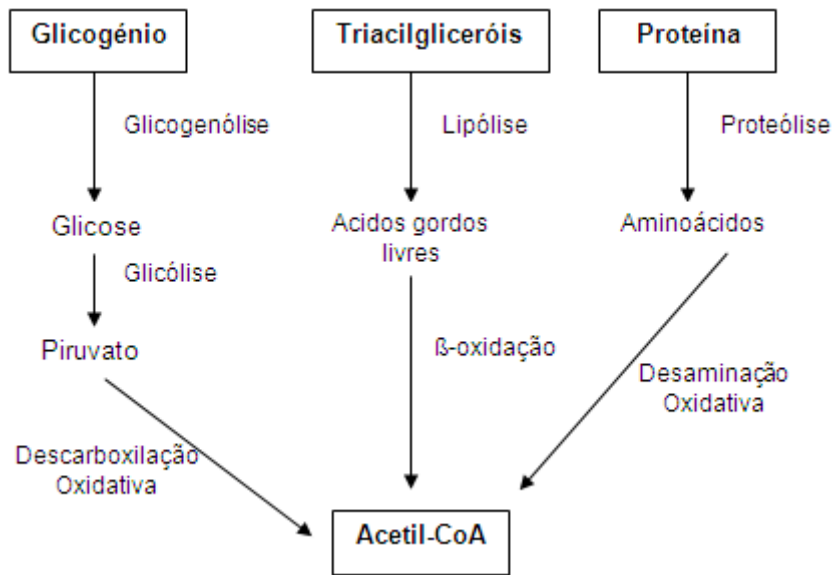


Figura 8: Produção de Acetil-CoA a partir de açúcares, lípidos e proteínas.

Posteriormente a acetil-CoA é metabolizada no ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico. Este ciclo é um conjunto de 8 reacções metabólicas que ocorrem na matriz mitocondrial (figura 9). Estas reacções são mediadas por um conjunto de enzimas, destacando-se as descarboxilases e as desidrogenases.

Na primeira reacção, a acetil-CoA entra no ciclo de Krebs e reage com oxaloacetato, através do carbono metilo e do grupo carbonilo, respectivamente, por acção da enzima citrato sintase. Forma-se um composto intermédio bastante energético (citroil-CoA), que rapidamente se transforma em citrato pela libertação da coenzima A.

Na segunda reacção, o citrato, por acção da enzima aconitase transforma-se em isocitrato. A reacção envolve a formação de um intermediário, o cis-aconitato, que se obtém por desidratação do citrato. Posteriormente, forma-se isocitrato, por hidratação do cis-aconitato através da reacção com a mesma aconitase. Para que a aconitase consiga captar H₂O é necessário a presença Fe²⁺ (co-factor).

A formação de α-cetoglutarato por descarboxilação oxidativa (reacção 3), implica um conjunto de três reacções que se iniciam por desidrogenação do isocitrato, por acção da isocitrato desidrogenase na presença de NAD⁺ (que se reduz a NADH), formando assim oxalosuccinato. Depois o Mn²⁺ liga-se ao grupo carbonilo deste composto, estabilizando o enol e provocando a libertação

de CO₂. Na última reacção, dá-se uma hidrogenação, com rearranjo do híbrido de ressonância.

Na formação de succinil-CoA (reacção 4) por descarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato liberta-se novamente NADH. Esta reacção é catalisada pelo complexo multienzimático α -cetoglutarato desidrogenase, na presença de coenzimas e grupos prostéticos (tiamina pirofosfato, ácido lipóico, CoA, FAD e NAD⁺), e é activada pelo Ca²⁺.

Na quinta reacção, a succinil-CoA é convertida em succinato pela succinil-CoA sintetase que quebra a ligação tiol-éster (S-CoA). Da quebra da ligação tiol-éster resulta uma grande libertação de energia que é utilizada para converter GDP em GTP (na presença do nucleósido difosfato cinase).

Posteriormente, a succinato desidrogenase vai oxidar o succinato a fumarato. Esta enzima faz parte do complexo II da cadeia respiratória, estando intimamente ligada à membrana mitocondrial interna (esta é a única enzima do ciclo que não se localiza na matriz mitocondrial). O FAD liga-se covalentemente a esta enzima reduzindo-se nesta reacção a FADH₂, ao captar os electrões libertados pelo succinato. Após esta reacção de redução, os electrões são encaminhados para a quinona, sendo utilizados para a formação de ATP através de fosforilação oxidativa.

Na sétima reacção, a enzima fumarase hidrata o fumarato formando malato. Em condições fisiológicas é uma reacção reversível.

Na última reacção do ciclo, a formação de oxaloacetato é catalisada pela enzima malato desidrogenase na presença de NAD⁺, com formação de NADH. Esta reacção no sentido directo é endergónica porém, na presença de uma baixa concentração de oxaloacetato na célula (devido à entrada num novo ciclo), e da oxidação de NADH a NAD⁺ pela respiração mitocondrial, a reacção dá-se no sentido da formação de oxaloacetato (29).

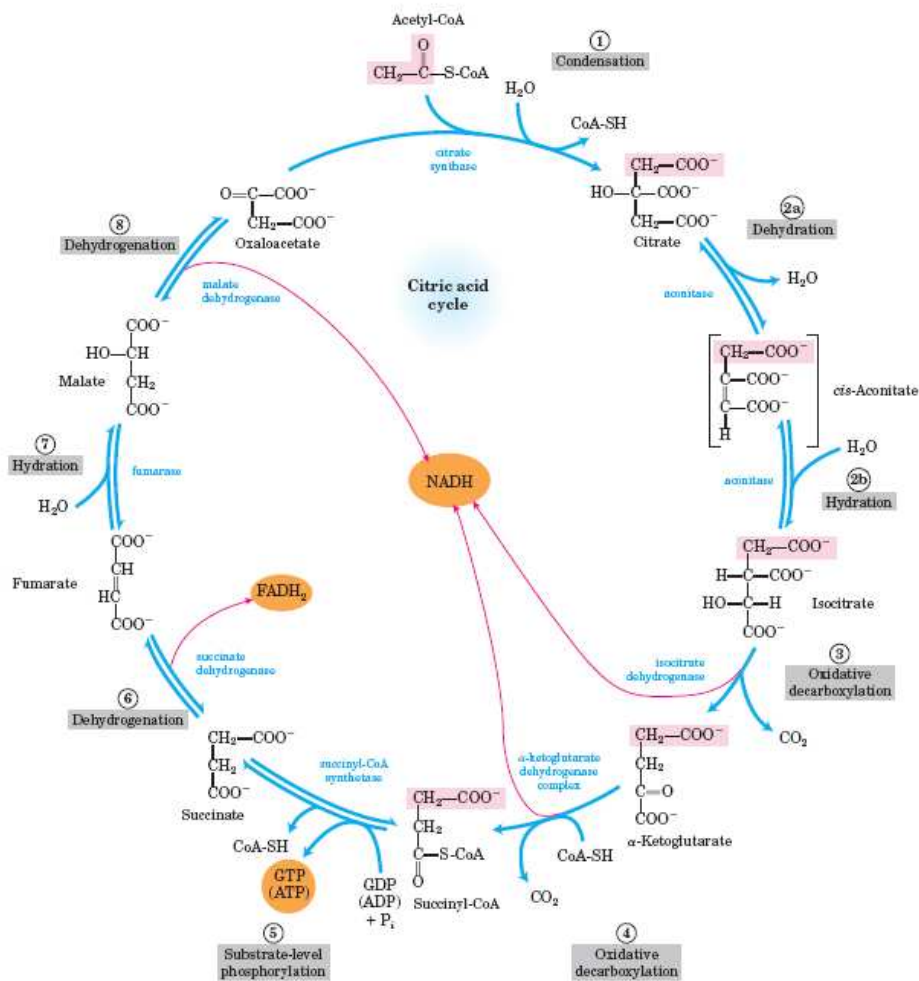


Figura 9: Ciclo de Krebs [imagem adaptada de (29)].

1.4.3 Fosforilação Oxidativa

Os electrões, transportados pelo NADH e pelo FADH₂ (provenientes do ciclo de Krebs), percorrem a cadeia respiratória em etapas sucessivas, seguindo um gradiente de potenciais redox, desde um estado reduzido até um aceitador final, o oxigénio molecular (26). Este fluxo de electrões, através dos complexos proteicos (cadeia respiratória), leva ao bombeamento de prótons (H⁺) para fora da matriz mitocondrial. Gera-se assim um gradiente de pH e um potencial eléctrico transmembranar, criando uma força protomotriz. Esta força permite que os H⁺ entrem novamente na matriz mitocondrial, através de um complexo enzimático, impulsionando assim a síntese de ATP. O conjunto destes processos denomina-se fosforilação oxidativa (28;29).

A cadeia respiratória, localiza-se na membrana mitocondrial interna, e compreende quatro complexos proteicos (figura 10): o complexo I (NADH:ubiquinona oxidoreductase), o complexo II (succinato:ubiquinona oxidoreductase), o complexo III (ubiquinona:citocromo c oxidoreductase) e finalmente o complexo IV (citocromo c oxidase). A cadeia respiratória mitocondrial possui ainda dois transportadores de electrões, ubiquinona e citocromo c.

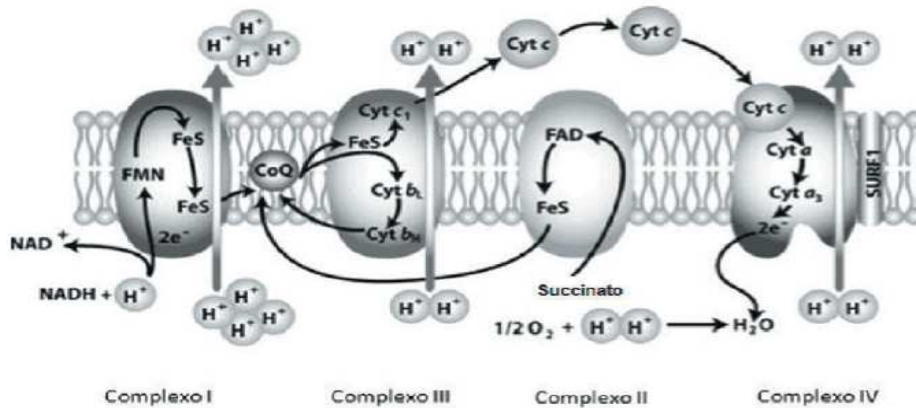


Figura 10: Representação esquemática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial [imagem adaptada de (31)].

O citocromo c é uma pequena proteína solúvel, que transporta os electrões do complexo III para o complexo IV. A ubiquinona (ou coenzima Q), devido ao facto de ser hidrofóbica, difunde-se facilmente no interior da membrana mitocondrial interna, transportando os electrões do complexo I e II para o complexo III (ciclo Q). A ubiquinona passa por três estados de oxidação: a forma totalmente oxidada (Q); a forma semiquinona (QH.), que após a adição de um H^+ e de um electrão facilmente perde um H^+ , gerando o radical semiquinona (Q.-); e o ubiquinol (QH_2) que se forma após a adição de mais um H^+ e um electrão.

O complexo I é formado por mais de 40 cadeias polipeptídicas. Tem como grupos prostéticos o mononucleótido flavina (FMN) e sete centros ferro-enxofre (2Fe-2S e 4Fe-4S). Cada proteína de Fe-S só fixa 1 electrão de cada vez e não liberta ou capta H^+ . Os átomos de ferro nestas proteínas variam entre o estado Fe^{2+} (reduzido) e Fe^{3+} (oxidado). Numa primeira etapa, a NADH-desidrogenase catalisa a oxidação do $NADH_2$ em NAD^+ . Os 2 electrões e os 2 H^+ resultantes são captados pela FMN, que deste modo é reduzida a $FMNH_2$. A

seguir, as proteínas de Fe-S, portadoras de potenciais redox superiores ao da FMNH₂, captam os electrões. A FMN, ao perder os seus dois electrões, perde igualmente os dois H⁺ para o espaço inter-membranar. Os electrões captados pelas proteínas Fe-S são então encaminhados para a ubiquinona. Para além dos electrões a ubiquinona transporta também dois H⁺ capturados na matriz. Portanto, o fluxo de electrões através do complexo I leva ao bombeamento de quatro H⁺ para fora da matriz mitocondrial (28;29). A rotenona, um inibidor específico deste complexo, evita a transferência de electrões do complexo I para a ubiquinona ao bloquear o local de ligação da ubiquinona no complexo I. O complexo I pode ser “alimentado” com glutamato/malato (glu/mal), que entra no ciclo de Krebs e levam a produção de NADH.

O complexo II é constituído por cinco grupos prostéticos: dinucleótido de adenina e flavina (FAD), três centros 2Fe-2S e heme b. A transferência de electrões ocorre do FADH₂ para a coenzima Q, no entanto não ocorre bombeamento de H⁺. Consequentemente, menos ATP é formado da oxidação do FADH₂ do que do NADH₂ (29). O complexo II pode ser “alimentado” adicionando succinato a preparações de mitocôndrias isoladas.

O complexo III, ou complexo b-c₁, contém pelo menos 11 cadeias polipeptídicas diferentes e funciona como um dímero. É constituído pelos citocromos b, c₁ e c. Os citocromos são proteínas que possuem como grupo prostético, um heme, isto é, uma estrutura molecular tetraporfírica (como se encontra na hemoglobina) que encerra um ião ferro, o qual se pode encontrar alternativamente no estado ferroso Fe²⁺ ou no estado férrico Fe³⁺, consoante se encontre reduzido ou oxidado. Além dos grupos heme, esta enzima contém também um centro 2Fe-2S denominado Centro de *Rieske*. O citocromo b é uma proteína intrínseca com um potencial redox superior ao da hidroquinona. Consequentemente, o citocromo b é capaz de captar um electrão da hidroquinona e, neste acto, o H⁺ correspondente é transportado para o espaço inter-membranar. O citocromo c₁, por sua vez, possuindo um potencial redox superior ao do citocromo b, está em condições de oxidar este último. Finalmente o citocromo c, que é uma proteína extrínseca, oxida o citocromo c₁. Note-se que, como os citocromos só transportam um electrão de cada vez, será necessário que cada um sofra duas oxido-reduções para que a ubiquinona “descarregue” os seus dois electrões e dois H⁺ (28;29).

O complexo IV, ou complexo citocromo-oxidase, também funciona como um dímero, sendo que cada monómero apresenta 13 cadeias polipeptídicas diferentes. É constituído pelos citocromos a e a_3 . O citocromo a_3 , no lugar do ferro tem cobre e é, de todos, o que possui maior poder redox. Este complexo contém dois grupos hemes e três iões de cobre. Os electrões transitam do citocromo c, para o citocromo a e, finalmente, para o citocromo a_3 . Por último, o citocromo a_3 cede os electrões ao oxigénio, levando à formação de água. Quatro protões são captados da matriz reduzindo uma molécula de O_2 a duas moléculas de H_2O . Outros quatro protões são bombeados da matriz para o espaço intermembranar, por um mecanismo que permanece desconhecido (28;29)

Em 1961, Peter Mitchell propôs a hipótese quimiosmótica. Esta sugere que o transporte de electrões pela cadeia respiratória leva ao bombeamento de H^+ para fora da matriz mitocondrial. Gera-se, assim, uma força proto-motriz que impulsiona a síntese de ATP através da acção de um complexo enzimático localizado na membrana mitocondrial interna, designado por ATP sintetase (Complexo V) (28;29).

Este complexo é também designado de F_0F_1 -ATPase, em que “F” significa “factor de acoplamento”, “o” significa “sensibilidade a oligomicina” e “1” representa o “primeiro local catalítico” onde ocorre a fosforilação do ADP, gerando ATP. É constituído por dois componentes principais: o componente F_1 , solúvel em água, projectado para a matriz mitocondrial contendo o local catalítico; e o componente F_0 , insolúvel em água, inserido na membrana mitocondrial interna, e responsável pela passagem de protões.

O componente F_1 é constituído por cinco tipos de cadeias peptídicas: três α , três β , uma γ , uma δ e uma ϵ (figura 9). As subunidades δ e ϵ permitem a ligação de F_1 à membrana, podendo também desempenhar algum papel funcional. A subunidade γ desempenha um papel funcional, regulando a passagem de protões de F_0 para o local catalítico de F_1 . A subunidade α e β estão relacionadas com a catálise enzimática, sendo que a subunidade α pode ter um papel regulador da actividade enzimática. O componente F_0 é constituído por um anel com cerca de 10 a 14 subunidades c inseridas na membrana; uma subunidade a, que se liga pelo lado de fora; e duas subunidades b (figura 11) (26;29;32;33).

É possível separar os componentes da ATP sintetase. Isoladamente, o componente F_1 é uma enzima que hidrolisa ATP, sendo, por isso, designado F_1 ATPase. Por sua vez, o componente F_0 , quando isolado do F_1 , funciona como um canal exclusivo de prótons sendo, assim, capaz de dissipar completamente o gradiente de prótons (34).

A síntese de ATP, catalizada pela ATP sintetase, pode ser facilmente invertida devido à falta de gradiente de prótons. Ou seja, F_0F_1 vai hidrolisar o ATP até o gradiente ser restabelecido, funcionando, assim, como ATPase (33;35).

Desacopladores do gradiente de prótons, como o FCCP ou o CCCP, aumentam o consumo de O_2 porque “desligam” a cadeia respiratória da síntese de ATP.

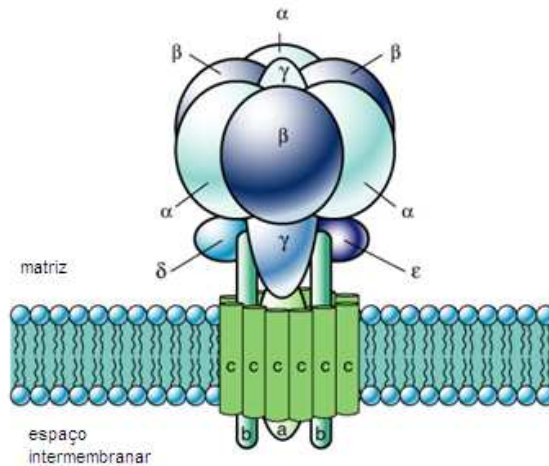


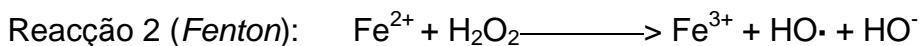
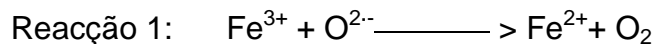
Figura 11: Esquema da ATP sintetase (adaptado de John Wiley and Sons, 1999)

1.4.4 Stresse Oxidativo e mitocôndria

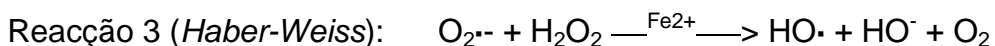
A mitocôndria é o principal local de formação de ROS na célula, devido à fuga de electrões da cadeia respiratória (36). Isto é, quando a mitocôndria funciona normalmente, os electrões passam de complexo para complexo, e o O_2 converte-se em água no decorrer do processo de respiração. No entanto, uma pequena quantidade de electrões pode passar directamente para o oxigénio molecular que se transforma em radical livre sob a forma de $O_2^{\bullet-}$, que pode ser convertido em H_2O_2 , causando efeitos prejudiciais no organismo.

O stresse oxidativo ocorre devido a um aumento da formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de espécies reactivas de azoto (RNS), e/ou devido a uma diminuição das defesas antioxidantes do organismo. A produção destas espécies oxidantes pode conduzir a diversas formas de lesão celular e a sua cronicidade pode estar relacionada com o envelhecimento e com o desenvolvimento de numerosas doenças.

As ROS incluem os radicais livres, que são átomos ou moléculas com existência independente, contendo um ou mais electrões não emparelhados nas orbitais externas. Exemplo de radicais livres são o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Além destes, o H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, é considerado uma espécie reactiva de oxigénio, sendo capaz de atravessar as membranas lipídicas e induzir lesão oxidativa longe do seu local de produção. Esta molécula é formada principalmente na mitocôndria, a partir do $O_2^{\bullet-}$, por acção da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) (figura 9) (37). O HO^{\bullet} é o radical mais potente. Contudo, devido ao seu tempo de semi-vida muito curto, actua perto do seu local de produção. Este radical provém maioritariamente da reacção de *Fenton* (reacção 2) (38). Em condições fisiológicas normais, o ferro encontra-se armazenado em proteínas, como por exemplo a ferritina, mantendo os níveis de ferro livre intracelular dentro dos limites fisiológicos. No entanto, em várias condições patológicas, o ferro é libertado dessas proteínas levando a um excesso de ferro livre. Esse ferro livre é reduzido a Fe^{2+} na presença do $O_2^{\bullet-}$ (reacção 1). Na presença de Fe^{2+} e de H_2O_2 forma-se o HO^{\bullet} (reacção 2).



O $O_2^{\bullet-}$ pode ainda reagir com o H_2O_2 , na presença de metais como o ferro, originando a chamada Reacção de *Haber-Weiss*, na qual se produz O_2 , ião hidroxilo HO^- e HO^{\bullet} (reacção 3).



A produção mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ ocorre, principalmente, nos complexos I e III. No complexo I observa-se o aumento da produção de ROS, como o $O_2^{\bullet-}$, quando a cadeia respiratória está a funcionar normalmente, na presença de rotenona e durante a transferência reversa de electrões (39). Os complexos I e III contribuem para a produção de $O_2^{\bullet-}$, através do ciclo da ubiquinona. Esta produção ocorre durante a síntese de ATP ou quando se utilizam desacopladores da actividade mitocondrial (36;40). A produção de $O_2^{\bullet-}$ aumenta na presença de inibidores, como a antimicina A (AA), uma vez que esta aumenta a produção de ubiquinona parcialmente reduzida (41).

As ROS atacam ácidos nucleicos, proteínas e lípidos membranares causando alterações nas biomoléculas que podem conduzir à morte celular.

O DNA mitocondrial é o principal alvo das ROS, uma vez que estas são produzidos na mitocôndria e o seu DNA não possui histonas protectoras e mecanismos completos de reparação. Como o DNA mitocondrial codifica algumas proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa, a sua fragmentação ou mutação pelas ROS pode causar disfunção mitocondrial. Por este motivo, pensa-se que este processo tem um papel importante no envelhecimento e pode estar envolvido em processos de carcinogénese.

Entre as lesões resultantes do ataque dos radicais livres a proteínas destaca-se a formação de grupos carbonilo, como resultado da oxidação das cadeias laterais de aminoácidos e da clivagem de ligações peptídicas (42). A formação de grupos carbonilo é um processo irreversível que pode, por vezes, conduzir à perda de função da proteína. As estruturas peptídicas que apresentem alguns grupos carbonilo podem vir a ser degradadas pelo proteossoma. No entanto, quando a carbonilação é severa, acumulam-se proteínas alteradas e desnaturadas, devido à formação de grandes agregados que são resistentes à degradação. Estes agregados podem inibir a actividade do proteossoma e pensa-se que estão na origem de várias doenças neurodegenerativas (42;43). Deste modo, um bom método para avaliar a oxidação proteica mediada por ROS é a quantificação de grupos carbonilo.

Quanto à componente lipídica, as ligações duplas dos resíduos dos ácidos gordos polinsaturados constituintes dos fosfolípidos membranares das células animais tornam-nos mais susceptíveis ao ataque das ROS e, conseqüentemente, ocorre a peroxidação lipídica (44). As membranas

peroxidadas tornam-se rígidas, perdem a sua permeabilidade selectiva e podem perder a sua integridade. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a peroxidação de ácidos gordos polinsaturados usualmente envolve três processos operacionalmente definidos: iniciação, propagação e terminação. A fase da iniciação ocorre com a formação de um radical lipídico (L•), pela subtracção de um átomo de hidrogénio a um lípido polinsaturado (LH), por uma espécie química com elevada reactividade. A fase de propagação da peroxidação lipídica decorre da interacção do oxigénio molecular com o L•, com formação do radical peroxilo (LOO•), que subtrai hidrogénio de outros ácidos gordos, resultando no hidroperoxilo (LOOH) (45). Com a ajuda de metais catalíticos, a decomposição dos hidroperóxidos resulta na formação de uma série de produtos, entre eles, os aldeídos quimicamente reactivos como o malondialdeído (MDA). Este, sendo um dos compostos medidos pela reacção com o ácido tiobarbitúrico, tem sido amplamente utilizado para calcular a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, células e tecidos (46).

Para evitar os danos causados pelas ROS, o organismo apresenta vários mecanismos de defesa, com potencial capacidade de neutralização das acções dos radicais livres, denominados antioxidantes. Estes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são os primeiros a agir, evitando a acumulação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , e incluem, entre outros, a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (figura 12). Quanto aos não enzimáticos, destacam-se as vitaminas E e C.

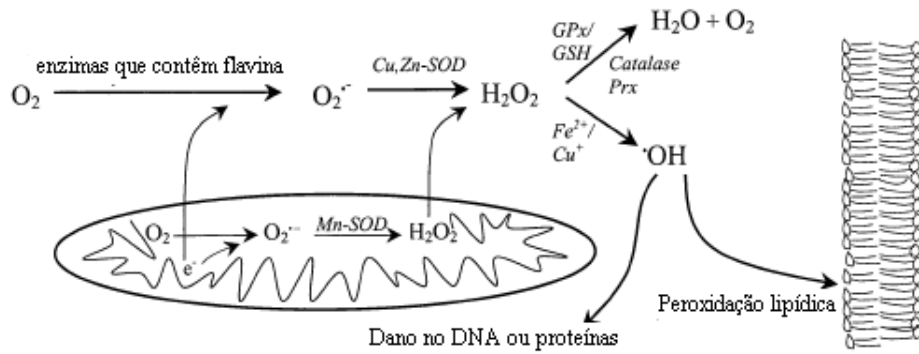


Figura 12: Sistema oxidativo e antioxidante das células. O $O_2^{\bullet-}$ é produzido no citosol, por enzimas contendo flavina, e na mitocôndria, devido à fuga de electrões da cadeia respiratória. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 . O H_2O_2 pode ser convertido em água pela glutatona peroxidase (GPx) ou pela catalase. No entanto, pode também ser convertido em OH^{\bullet} , através da reacção de *Fenton*, provocando danos no DNA, proteínas e lípidos [imagem adaptada de (44)].

1.4.5 Transporte de cálcio (Ca^{2+}) pela mitocôndria

O transporte de nucleótidos de adenina, fosfato inorgânico (Pi), iões de cálcio (Ca^{2+}) e substratos respiratórios pela mitocôndria é feito, directa ou indirectamente, utilizando a energia do gradiente electroquímico de protões. Esta energia, resultante da respiração mitocondrial, é também, como já foi referido (secção 1.4.1), usada pela mitocôndria na síntese de ATP.

Destes transportadores destaca-se o sistema transportador de Ca^{2+} , que confere à mitocôndria um papel central na regulação do metabolismo celular. A mitocôndria possui dois sistemas de transporte de Ca^{2+} que, funcionando integradamente, regulam a concentração de Ca^{2+} no citoplasma e na matriz mitocondrial, controlando, assim, a actividade dos sistemas enzimáticos aí localizados.

Um desses sistemas de transporte é do tipo *uniporter*, sendo o Ca^{2+} transportado do citoplasma para a matriz mitocondrial à custa da energia do potencial eléctrico transmembranar (processo electroforético). A mitocôndria tem também um transportador independente, do tipo *antiporter*, que transporta Ca^{2+} da matriz para o citoplasma por troca com 2 H^+ ou 2 Na^+ (transporte electroneutro).

1.4.6 Permeabilidade transitória mitocondrial (PTM)

Quando exposta a concentrações de cálcio suprafisiológicas, a mitocôndria acumula-o, levando a um aumento da permeabilidade da MMI. Este aumento da permeabilidade, designado por permeabilidade transitória mitocondrial (PTM), deve-se à abertura do poro de permeabilidade transitória (PPT) (47). A abertura do PPT permite a entrada de água e solutos para a matriz causando um aumento do volume mitocondrial (*swelling*) (figura 13), ruptura total ou parcial da mitocôndria, despolarização mitocondrial, liberação do cálcio intramitocondrial e liberação de componentes intermembranares que induzem a apoptose.

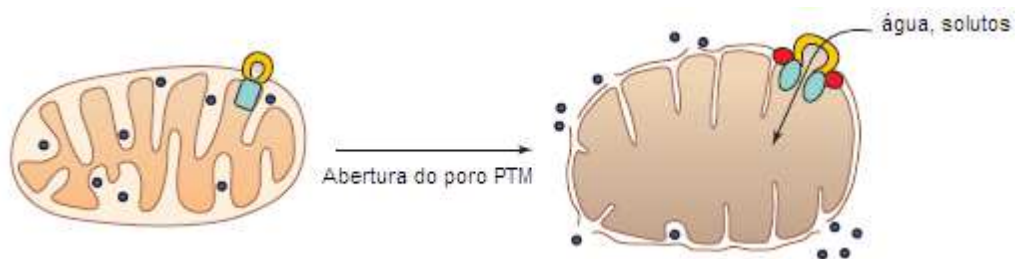


Figura 13: Abertura do PPT e consequente aumento do volume mitocondrial (*swelling*) [adaptado de (48)].

Estudos anteriores sugerem que o PPT está implicado na homeostase do cálcio (49) e em processos associados a morte celular (50).

A abertura do PPT é regulada por vários factores. O stresse oxidativo é um dos factores que contribui para a sua abertura (51), assim como: a presença de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, acima de uma dada concentração; concentrações reduzidas de nucleótidos de adenina (ATP e ADP) (52); o aumento da concentração de fosfato inorgânico; a despolarização mitocondrial; os reagentes ditiólicos; os ligandos do transportador de nucleótidos; e as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bid (53). A abertura do poro pode ser inibida pela ciclosporina A (Cys A) devido à interacção com as proteínas que constituem o PPT (54) ou pela acidificação da matriz mitocondrial (55).

A composição molecular do PPT ainda não se encontra completamente esclarecida. Porém, sabe-se que é um complexo multi-proteico constituído por:

uma proteína transportadora de nucleótidos de adenina (ANT) localizada na MMI; um canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) situada na MME; ciclofilina D da matriz; creatina cinase (CK) do espaço intermembranar; hexocinase (HK) da MME; receptor de benzodiazepinas (PBR) da MME; e proteínas Bax e Bcl-2 (figura14) (47;48;56-59).

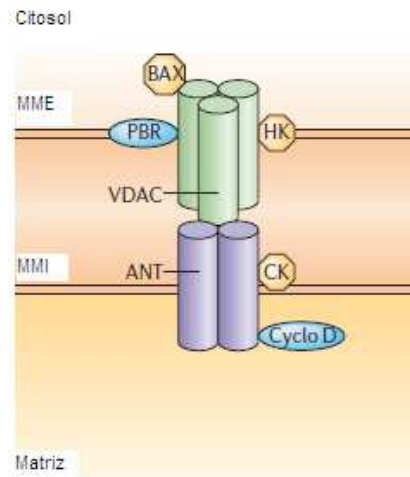


Figura 14: Constituição molecular do PPT [adaptado de (2)].

Capítulo II - Objectivos

2. Objectivos

O consumo de cocaína combinado com heroína, designado “speedball”, é muito comum entre os consumidores de drogas de abuso. A enorme adesão a este tipo de consumo deve-se aos efeitos complementares destas drogas: estimulante e sedativo.

Neste trabalho usamos morfina porque a heroína rapidamente é metabolizada a morfina. Assim num consumidor de heroína, a mitocôndria hepática será provavelmente mais exposta à morfina do que à heroína. Além disso, não nos foi possível ter acesso a heroína no período de execução deste trabalho.

Estudos já publicados mostraram que estas drogas induzem disfunção mitocondrial e sugerem que a sua combinação poderá ter efeitos específicos.

Uma vez que o fígado é um órgão essencial no metabolismo e detoxificação destas drogas, e que a mitocôndria tem um papel central no metabolismo da célula hepática, as mitocôndrias de fígado são um bom modelo de estudo *in vitro* dos efeitos directos das drogas.

Neste trabalho, usando a fracção mitocondrial isolada do fígado de rato, pretendeu-se efectuar uma avaliação dos efeitos da combinação Mor+Coc ao nível mitocondrial e compará-lo com os efeitos da cocaína e morfina usadas isoladamente. Para tal procedeu-se ao estudo dos efeitos da Mor+Coc na actividade mitocondrial, nomeadamente na sua função bioenergética, na permeabilidade transitória mitocondrial, assim como na acumulação de cálcio. Numa segunda fase avaliou-se o efeito das drogas e sua combinação na susceptibilidade da fracção mitocondrial ao stress oxidativo medindo a peroxidação lipídica e a formação de H₂O₂.

Este trabalho tem importância no âmbito forense dado que permite esclarecer se o consumo combinado destas duas drogas tem um efeito aditivo (quando o efeito final é igual a soma dos efeitos de cada uma das drogas envolvidas), sinérgico (quando o efeito final é maior do que a soma dos efeitos de cada uma das drogas separadas) ou antagonista (o efeito de uma das drogas é diminuído, inactivado ou eliminado quando se combina com outra droga) a nível hepático. Pode também surgir um novo efeito proveniente dos

aductos Mor-Coc que se formam na combinação. Isto permite-nos entender, por exemplo, se a morte por *overdose* ocorre mais rapidamente do que se fosse consumida a mesma concentração de apenas uma dessas drogas.

Capítulo III - Métodos

3.1 Isolamento das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a partir do fígado de ratos machos da estirpe Wistar, com cerca de 200-300 g de peso corporal e 8 a 10 semanas de idade, de acordo com o método descrito previamente (60), com algumas alterações. O isolamento consistiu em três etapas principais: homogeneização, centrifugação diferencial e lavagem.

A homogeneização permite a desintegração do tecido e o rompimento das células para libertar os organelos celulares.

A centrifugação diferencial é o método mais utilizado para separar organelos celulares. Baseia-se na utilização de velocidades e tempos de centrifugação diferentes levando à sedimentação de estruturas cada vez menores e menos densas. Assim, retirando em cada centrifugação o sedimento (“*pellet*”) será possível obter suspensões de núcleos, e sequencialmente de mitocôndrias, lisossomas, peroxissomas, microssomas e, por fim, os ribossomas livres.

Os últimos passos da centrifugação consistem na lavagem das mitocôndrias com meio apropriado.

Os meios utilizados no isolamento de mitocôndrias devem conter:

- Soluções isotônicas de sacarose – evitam alterações osmóticas que podem levar à ruptura dos organelos.
- Tampão Tris ou HEPES – mantém o pH a 7,4 de modo a evitar processos autolíticos e aglutinação de partículas, favorecidos pela diminuição de pH provocada pela homogeneização.
- Albumina deslipidada (BSA) - para complexar ácidos gordos livres, ésteres de acil-CoA e lisofosfolípidos, evitando que estes promovam alterações estruturais na membrana mitocondrial.
- EDTA (ou EGTA) – complexa o excesso de Ca^{2+} contaminante no meio. Este Ca^{2+} pode funcionar como dissociador energético das mitocôndrias e também como co-factor das fosfolipases.

Todo o material utilizado no isolamento de mitocôndrias deve ser mantido previamente em gelo, mantendo a temperatura entre 0 a 4°C, de modo a serem minimizados os processos líticos promovidos por fosfolipases e proteases durante as operações de isolamento.

Os animais foram sacrificados por deslocamento da cervical e decapitação, após a qual se procedeu à remoção do fígado da cavidade torácica. Seguidamente, o fígado foi colocado num copo contendo tampão de homogeneização, a 4°C (250 mM de sacarose, 10 mM HEPES, 0,5 mM EGTA, pH 7,4 e BSA dislipidificada a 0,1%). Com o auxílio de uma tesoura o fígado foi triturado em pequenos fragmentos, que foram lavados várias vezes com o tampão de homogeneização, de modo a remover o excesso de sangue. Após as lavagens, o fígado foi homogeneizado num homogeneizador de vidro do tipo “*Potter Elvehjem*”, contendo aproximadamente 60 ml de meio de homogeneização, com um pistão rodando a 250 rotações por minuto, até se obter uma suspensão homogénea.

O homogeneizado foi centrifugado a 1075 *g*, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C, para remover os núcleos, células fragmentadas e intactas, incluindo eritrócitos e outros componentes densos das células. Após se terem retirado os tubos da centrífuga, aspirou-se cuidadosamente a gordura que ficou à superfície e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo.

O sobrenadante foi então centrifugado, a 11950 *g*, durante 10 minutos, para obter a fracção mitocondrial. O sobrenadante obtido foi desprezado por aspiração e a fracção mitocondrial sedimentada (cor castanha) foi depois ressuspensa em tampão de lavagem (250 mM sacarose, 10 mM HEPES pH 7,4) com o auxílio de um pincel.

Completo-se o volume dos tubos com meio de lavagem e realizaram-se uma terceira e quarta centrifugações a 11950 *g*, durante 10 minutos, com o objectivo de lavar as mitocôndrias. Após a última centrifugação, o sedimento mitocondrial foi ressuspensa num pequeno volume de tampão de lavagem e transferido para um microtubo. A suspensão de mitocôndrias foi mantida em gelo durante o decorrer das experiências, sendo esta estável durante 6-8 horas após o isolamento. Não se realizando ensaios no dia do isolamento, a suspensão foi congelada a -80 °C.

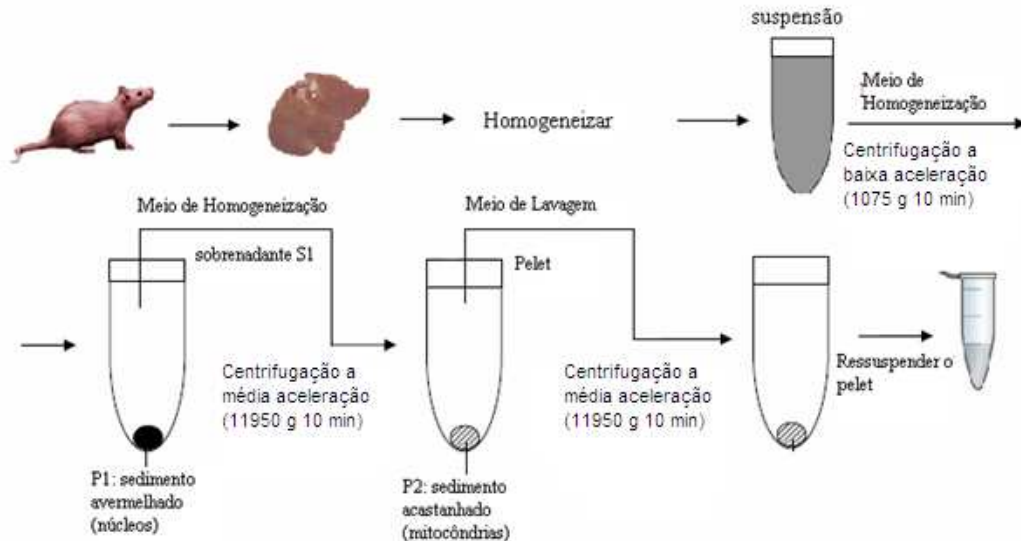


Figura 15: Esquema do isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.

3.2 Quantificação da proteína – Método do Biureto

A concentração de proteína da fracção mitocondrial foi quantificada pelo método do biureto (61).

O método do biureto baseia-se na utilização de uma reacção química da proteína com um reagente designado por “reagente de biureto”, consistindo em sulfato de sódio pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.15%, tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.6%, hidróxido de sódio (NaOH) 3% e iodeto de potássio (KI) 0.1%. O tartarato é utilizado como agente complexante para manter o cobre em solução e o KI actua como redutor prevenindo a oxidação do cobre.

O reagente de biureto contém cobre (Cu^{2+}) que, em meio alcalino, reage com as ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, formando ligações covalentes com quatro ligações peptídicas vizinhas (ião coordenado por quatro ligações peptídicas). Produz-se assim um complexo cobre-proteína que confere à solução uma cor púrpura, sendo a intensidade da cor formada proporcional ao conteúdo proteico da amostra. A leitura é efectuada num espectrofotómetro a 540 nm, comprimento de onda no qual este complexo absorve maximamente.

As amostras da suspensão mitocondrial (20 µl) e os padrões de albumina foram adicionados a tubos contendo 50 µl de desoxicolato de sódio (DOC). Prepararam-se 5 padrões de BSA, da forma apresentada na tabela 1, com as seguintes quantidades de BSA: 0 mg; 0,5 mg; 1 mg; 1,5 mg; e 2 mg. (tabela 1). O desoxicolato de sódio (DOC) é um detergente que solubiliza as membranas, de modo a libertar a proteína que se encontre ligada a estas.

As absorvências dos padrões e das amostras foram lidas ao fim de 10 minutos de reacção após a adição do reagente de biureto a 540 nm, num espectrofotómetro. A concentração de proteína na nossa amostra foi calculada a partir da curva padrão.

Tabela 1: Preparação dos tubos para quantificação da proteína

Proteína (mg)	H ₂ O (µl)	DOC 10% (µl)	BSA 0,4% (µl)	Tampão de lavagem (µl)	Reagente de Biureto (µl)
0	500	50	0	20	2000
0,5	375	50	125	20	2000
1,0	250	50	250	20	2000
1,5	125	50	375	20	2000
2,0	0	50	500	20	2000
Amostra	500	50	20 µl mitocôndria	0	2000

3.3 Determinação polarográfica da actividade respiratória das mitocôndrias

O consumo de O₂ pelas mitocôndrias isoladas foi determinado polarograficamente com um eléctrodo de O₂ do tipo Clark (62) ligado a um registador. O eléctrodo de oxigénio foi calibrado com água no início de cada ensaio. Os ensaios foram realizados a 30°C numa câmara de reacção aberta e sob agitação magnética contínua e suave.

As reacções iniciaram-se por adição de 1 mg de suspensão mitocondrial a 1 ml de meio de reacção contendo 130 mM sacarose, 50 mM KCl, 2,5 mM KH_2PO_4 , 5 mM HEPES e 2 mM MgCl_2 , a pH 7,4.

A adição dos substratos respiratórios 10 mM glutamato/5 mM malato (substrato do complexo I) ou 5 mM de succinato (substrato do complexo II) induziu uma ligeira estimulação na velocidade de consumo de O_2 pelas mitocôndrias (estado respiratório 2). Quando se utilizou succinato como substrato respiratório adicionou-se também ao meio de reacção um inibidor do complexo I – rotenona (3 μM). Posteriormente, a adição de 125 nmol de ADP originou uma estimulação substancial da actividade respiratória (estado respiratório 3), resultante do consumo do potencial de membrana para fosforilar o ADP a ATP. Após a fosforilação do ADP adicionado, o potencial de membrana é restabelecido e a velocidade respiratória retoma uma velocidade de consumo inicial (estado respiratório 4). A posterior adição de 125 nmol de ADP seguido de 1 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina, que inibe o sistema fosforilativo por impedir a passagem de prótons pela fracção F_o do complexo V, induz uma redução de consumo de oxigénio para valores próximos dos iniciais (estado oligomicina). O consumo de oxigénio nestas condições resulta do estado funcional da cadeia respiratória e da permeabilidade membranar mitocondrial, excluída a fuga a H^+ pela fracção F_o do sistema fosforilativo.

A adição de 1 μM de FCCP, um ionóforo para prótons que permite o seu transporte através da membrana interna mitocondrial, induz o colapso do potencial mitocondrial e a dissociação da cadeia respiratória do sistema fosforilativo (estado FCCP). A taxa máxima da velocidade do consumo de oxigénio é atingida, dado que o potencial mitocondrial não é restabelecido. O ensaio permite avaliar os efeitos das drogas ao nível da cadeia respiratória mitocondrial, visto não ocorrer qualquer interferência do sistema fosforilativo na resposta do sistema de transporte de prótons.

Os perfis/registos de consumo de O_2 foram analisados de forma a obter os diversos parâmetros informativos (figura 16). As velocidades do consumo de oxigénio foram calculadas a partir da calibração do eléctrodo fazendo corresponder a concentração de oxigénio de 236 nmol O_2/ml do meio de respiração a 30°C, a 300 mm do papel do registador. O índice de controlo respiratório, ICR, foi determinado pelo quociente entre a velocidade de

consumo de oxigénio na presença de ADP (estado 3 da respiração) e a velocidade do consumo de oxigénio após o consumo do ADP adicionado (estado 4 da respiração) é utilizado como critério de integridade mitocondrial. O ADP/O, quociente entre a quantidade de ADP adicionada (em nmol) e o O₂ consumido durante o estado 3 (em nanoátomos de oxigénio, nAtg) para fosforilar todo o ADP, indica a eficiência da fosforilação oxidativa (63). Os parâmetros descritos foram determinados na ausência e na presença de 0,2, 0,4, e 1 mM de cocaína, morfina ou com a sua combinação (morfina seguida de cocaína 1:1) incubadas durante 1 minuto com a suspensão mitocondrial.

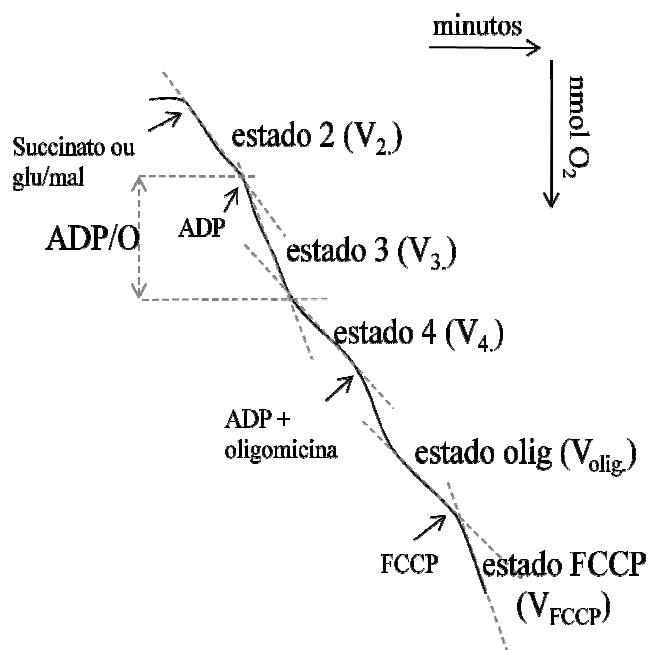


Figura 16: Registo polarográfico tipo obtido com o eléctrodo de O₂, onde estão registadas as diferentes velocidades de consumo de oxigénio pela mitocôndria.

3.4 Determinação do potencial eléctrico transmembranar da mitocôndria

O potencial eléctrico transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi medido através do registo contínuo da distribuição do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP⁺) através das membranas mitocondriais. Utilizámos um eléctrodo

selectivo para TPP⁺ preparado no nosso laboratório de acordo com Kamo *et al.* (64).

Este eléctrodo foi construído utilizando-se um tubo de cloreto de polivinilo (PVC), com cerca de 3 mm de diâmetro e 80 mm de comprimento, selado numa das extremidades com uma membrana sensível ao ião TPP⁺. O tubo foi enchido com TPPCl 10 mM e introduziu-se no interior do tubo um eléctrodo de referência interno de Ag/AgCl, de modo a ficar mergulhado na solução interna de referência. Como eléctrodo de referência externo foi usado o eléctrodo de calomelanos Ag/AgCl₂. Os dois eléctrodos foram ligados a um aparelho de pH, e o sinal correspondente à diferença de potencial gerada entre os eléctrodos foi medido num registador Kipp & Zonen, após passagem por um circuito de compensação de voltagem basal.

Os ensaios foram realizados a 30 °C, numa câmara de reacção aberta e sob agitação magnética contínua e suave, em 1 ml do meio de reacção contendo 130 mM sacarose, 50 mM KCl, 2,5 mM KH₂PO₄, 5 mM HEPES e 2 mM MgCl₂ a pH 7,4 suplementado com 3 µM de TPP e 1 mg da suspensão mitocondrial de fígado, que foi incubada durante 1 minuto na ausência ou na presença de 0,2, 0,4 e 1 mM de cocaína, morfina ou com a sua combinação (morfina seguida de cocaína 1:1). As reacções foram iniciadas pela adição de substratos respiratórios, 10 mM glutamato/5 mM malato ou 5 mM de succinato (neste caso adicionou-se ao meio rotenona 3 µM), permitindo o desenvolvimento do potencial máximo de polarização. O ciclo fosforilativo foi induzido por adição de 125 nmol de ADP. Após a fosforilação de todo o ADP adicionado ocorre a repolarização da membrana mitocondrial interna e o restabelecimento do potencial da membrana (figura 17). Após recuperação do potencial, adicionaram-se simultaneamente 125 nmol de ADP e 1 µg de oligomicina (estado oligomicina).

Do registo efectuado retirámos os seguintes dados: potencial máximo, despolarização induzida por ADP e tempo de fosforilação (figura 17). O $\Delta\Psi_m$ foi calculado como o descrito por Kamo *et al.* (64), de acordo com a seguinte equação:

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

sendo *v* o volume mitocondrial, *V* o volume do meio de incubação e ΔE o valor da deflexão do potencial eléctrico desde a linha basal. Nesta equação assume-

se que a distribuição do TPP^+ entre a mitocôndria e o meio é feita de acordo com a equação de Nernst. Como valor da matriz mitocondrial foi assumido o valor de $1.1 \mu\text{l/mg}$ de proteína. A correcção devida à contribuição da ligação passiva do TPP^+ às membranas mitocondriais não foi efectuada, visto a finalidade das nossas experiências não consistir na determinação dos valores absolutos do potencial mitocondrial, mas sim em avaliar as alterações relativas nos potenciais, induzidas pelas drogas em estudo.

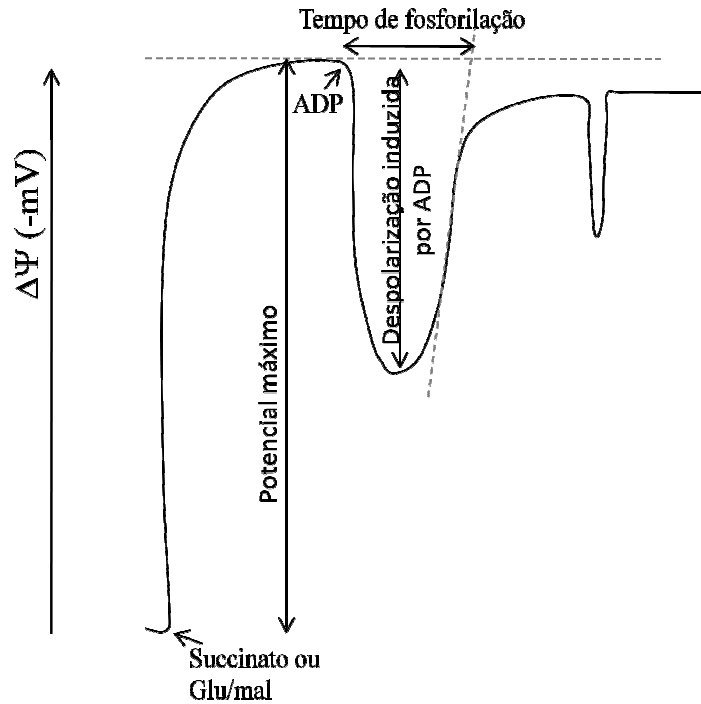


Figura 17: Registo tipo, obtido na determinação do potencial de membrana avaliado com um eléctrodo de TPP^+ , onde estão registadas as variações de potencial que ocorrem nas mitocôndrias.

3.5 Avaliação da actividade da ATPase mitocondrial

A actividade da ATPase mitocondrial foi medida através da determinação dos H^+ , libertados durante a hidrólise do ATP. A produção de H^+ foi observada continuamente com um aparelho de pH, cujo eléctrodo foi introduzido no meio de reacção e as variações de pH foram registadas por um

registador, ligado ao aparelho de pH por intermédio de um circuito intermediário de compensação de voltagem basal (65).

As preparações mitocondriais foram congeladas e descongeladas três vezes, para assegurar a sua lise e assim expor a ATPase. As reacções decorreram a 30°C, em 1,5 ml de meio de ATPase (130 mM sacarose, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM HEPES, pH 7,4), 3 µM de rotenona e 1,5 mg de proteína, numa câmara de reacção aberta e sob agitação magnética constante. As drogas (0,4 e 1 mM), isoladas ou combinadas (1:1), foram incubadas com a proteína durante um minuto antes do início da reacção, pela adição de 1 mM de ATP/Mg²⁺. Os ensaios experimentais foram repetidos na presença 2 µg de oligomicina, de modo a abolir completamente a produção de H⁺ pela ATPase mitocondrial. Assim, a actividade da ATPase foi calculada pela diferença das actividades obtidas na presença e na ausência de oligomicina.

A calibração interna do sistema foi realizada no final de cada experiência, pela adição de quantidades convenientes de ácido clorídrico (HCl) e NaOH.

3.6 Avaliação da acumulação de cálcio (Ca²⁺) pelas mitocôndrias

Como já foi referido anteriormente (secção 1.4.5), a acumulação e a libertação de Ca²⁺ pelas mitocôndrias está relacionada com a PTM. Ao avaliarmos a acumulação de Ca²⁺ pelas mitocôndrias, usando um eléctrodo de Ca²⁺ ou de TPP⁺, podemos avaliar o efeito das nossas drogas no PPT.

3.6.1 Técnica electrométrica (eléctrodo de Ca²⁺)

O método electrométrico, que utiliza o eléctrodo de Ca²⁺, é o método mais vantajoso para estudar o transporte de cálcio pelas mitocôndrias. Tem uma elevada sensibilidade, permite o registo fácil e rápido dos movimentos de Ca²⁺ e envolve uma instrumentação simples e acessível.

O transporte de Ca^{2+} pelas mitocôndrias foi seguido continuamente com um eléctrodo de Ca^{2+} do tipo “transportador neutro” e calibrado para que o potencial gerado pelo eléctrodo tenha uma correlação linear com o logaritmo da concentração de cálcio. O sinal foi registado continuamente por um registador, depois de passar por um sistema intermediário de compensação de potencial. Os ensaios foram realizados a 30°C, numa câmara de reacção aberta e sob agitação magnética contínua.

Colocou-se na câmara de reacção 1ml de meio de *swelling* (200 mM sacarose, 1 mM KH_2PO_4 , 10 μM EGTA, 10 mM HEPES e pH ajustado a 7,4 com Tris), 3 μM de rotenona, 1 mg de mitocôndrias e CaCl_2 numa concentração que induz a despolarização. As drogas, isoladas ou combinadas (1:1), foram adicionadas a este meio à concentração de 1 mM e incubadas durante um minuto antes de se iniciar o registo. O transporte de Ca^{2+} foi iniciado pela adição de 5 mM de succinato. No início e no final dos ensaios o sistema foi calibrado adicionando quantidades conhecidas de CaCl_2 . Realizou-se também um ensaio controlo com ciclosporina A (Cys A), um inibidor específico do PPT.

3.6.2 Efeito da acumulação de Ca^{2+} no potencial transmembranar das mitocôndrias

O método electrométrico, utilizando o eléctrodo de TPP^+ , também pode ser usado para estudar o efeito da acumulação de Ca^{2+} no potencial transmembranar das mitocôndrias.

O sinal foi registado por um registador depois de passar por um sistema intermediário de compensação de potencial. Os ensaios foram realizados a 30°C, numa câmara de reacção aberta, e sob agitação magnética contínua.

Colocou-se na câmara de reacção 1 ml de meio de *swelling* (200 mM sacarose, 1 mM KH_2PO_4 , 10 μM EGTA, 10 mM HEPES e pH ajustado a 7,4 com Tris), 3 μM de rotenona, 3 μM de TPP^+ e 1 mg de mitocôndrias. As drogas, isoladas e combinadas, foram adicionadas ao meio à concentração de 1 mM, e incubadas durante um minuto antes do início do registo. O transporte de Ca^{2+} foi estimulado pela adição de 5 mM de succinato. Depois de estabilizado o

registro, foram feitas adições sucessivas de CaCl_2 , (40 nmol) até induzir a total despolarização do potencial de membrana mitocondrial. O ensaio foi repetido na presença de ciclosporina A (Cys A), um inibidor específico do PPT, permitindo confirmar a indução da permeabilidade transitória mitocondrial pelo Ca^{2+} .

3.7 Avaliação da peroxidação lipídica

3.7.1 Consumo de oxigénio associado a peroxidação lipídica induzida pela adição do par ADP/ Fe^{2+}

Para avaliar o consumo de oxigénio associado à peroxidação lipídica induzida pela adição de ADP/ Fe^{2+} utilizou-se um eléctrodo de O_2 do tipo Clark, de acordo com o descrito por Sassa e colaboradores (66).

Numa câmara de reacção, à temperatura de 30°C e sob agitação constante, colocou-se 1ml de meio de peroxidação (175 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4), 3 μM de rotenona e 1 mg de mitocôndrias. As drogas (1mM) foram adicionadas a este meio, incubadas durante dois minutos, antes da indução da peroxidação lipídica por adição simultânea de ADP/ FeSO_4 (1 mM/0,1 mM).

Observaram-se os registos de consumo de oxigénio obtidos e avaliou-se, qualitativamente, o potencial antioxidante das drogas isoladas e da sua combinação.

3.7.2 Método de TBARS

Como já foi referido (secção 1.4.4), o método mais utilizado para a avaliação da peroxidação lipídica *in vitro* é o método de quantificação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método reflecte

essencialmente a produção de malondialdeído (MDA) e tem como vantagens o seu baixo custo e a sua fácil execução.

O procedimento utilizado para quantificar TBARS foi baseado no descrito por Rohn e seus colaboradores (67). Esta quantificação foi realizada simultaneamente com o método descrito anteriormente (3.7.1), isto é, durante a avaliação do consumo de oxigénio foram retiradas várias alíquotas de 450 µl, 6 minutos após a adição de ADP/Fe²⁺. Estas alíquotas foram adicionadas a tubos contendo 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) 40%, frio, com o objectivo de parar a reacção de peroxidação lipídica. De seguida, adicionaram-se aos tubos 2 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. Os tubos, tapados com esferas de vidro, foram colocados num banho de água fervente durante cerca de 10 minutos. Após arrefecimento, as amostras foram transferidas para outros tubos para serem centrifugadas, durante 5 minutos, a 1075 g. Posteriormente, transferiu-se o sobrenadante de cada tubo para uma cuvete, e leu-se a absorvância a 530 nm, contra o branco, utilizando um espectrofotómetro.

Por fim, determinou-se a quantidade de TBARS formada, em nmol de TBARS/mg de proteína, através da fórmula: $A = C \cdot L \cdot \epsilon$, sendo A a absorvância, C a concentração de malonildialdeído (MDA), L a largura da cuvete e o ϵ o coeficiente de extinção molar $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.8 Quantificação da produção de H₂O₂

A fuga de electrões que ocorre na cadeia respiratória principalmente ao nível do complexo I e III leva á formação de anião superóxido (O₂⁻), o qual é convertido a H₂O₂ pela superóxido dismutase. Este H₂O₂ poderá provocar danos ao nível do DNA, proteínas e lipídios, daí a importância de medir o efeito das drogas na sua formação.

O efeito da cocaína, morfina ou da sua combinação na produção de H₂O₂ mitocondrial foi avaliado por fluorimetria usando o método descrito por Barja (2002), com algumas modificações (68). Esta metodologia mede a produção de H₂O₂ mitocondrial, que ao reagir com o ácido homovanílico, na presença de peroxidase extraída de rábano, o que torna a reacção específica e

bastante sensível, leva à formação de um dímero fluorescente detectável após excitação a 312 nm, com emissão a 420 nm. O método foi adaptado para medir a produção de H_2O_2 em mitocôndrias intactas, respirando apenas com o substrato adicionado. Pode também ser usado para quantificar os níveis basais de ROS e as mudanças rápidas da taxa de produção de ROS mitocondrial, bem como localizar os principais locais de geração destes radicais na cadeia respiratória na presença de inibidores específicos.

As mitocôndrias de fígado foram incubadas a 30 °C num volume de 500 μ l de meio constituído por 145 mM KCl, 30 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4 , 3 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EGTA, (pH 7,4) suplementado com 0,1 mM de ácido homovanílico e 6 U/ml de peroxidase extraída de rábano. As reacções foram iniciadas por adição dos substratos (10 mM glutamato/5 mM malato e 5 mM de succinato) e decorreram durante 15 minutos. As reacções foram terminadas pela adição de 250 μ l do meio 0,1 M glicina contendo 25 mM EDTA e NaOH (pH 12), a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 1075 g durante 2 minutos e o sobrenadante foi usado para determinação da concentração do H_2O_2 formado por fluorimetria. A produção de H_2O_2 pelas mitocôndrias foi também avaliada na presença de 1 mM de cocaína, morfina, heroína e a combinação Mor+Coc.

Paralelamente, a produção de H_2O_2 foi também determinada na presença de inibidores específicos da cadeia respiratória mitocondrial: 1 μ M de rotenona (inibidor do complexo I) e 10 μ M de antimicina A (inibidor do complexo III). A adição de catalase (uma enzima antioxidante) aos ensaios permitiu confirmar a produção de H_2O_2 pelas mitocôndrias. Adicionalmente, fizeram-se experiências na ausência de substrato de modo a avaliar os valores basais de H_2O_2 produzidos pelas mitocôndrias.

A produção de peróxido de hidrogénio foi calculada usando uma curva padrão de H_2O_2 . Os valores de H_2O_2 foram expressos em nmol/15 min/mg de proteína.

3.9 Análise Estatística

Os dados apresentados correspondem à média \pm SEM de várias experiências independentes, após normalização para o controle. A análise estatística foi realizada no programa Graph Pad Prism v5.0 pelo teste *one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni. Para valores de $P < 0.05$ as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas.

Capítulo IV - Resultados

4.1 Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na respiração das mitocôndrias do fígado

Numa primeira fase do trabalho avaliou-se o efeito das drogas, cocaína, morfina e a sua combinação Mor+Coc (1:1), nos parâmetros respiratórios de mitocôndrias isoladas do fígado de rato.

O estado respiratório 2 ocorre após adição dos substratos glu/mal ou suc (na presença de rot). A figura 18 mostra que nas mitocôndrias incubadas com as concentrações mais elevadas de cocaína e da combinação Mor+Coc (1:1) ocorreu um aumento significativo no consumo de oxigénio.

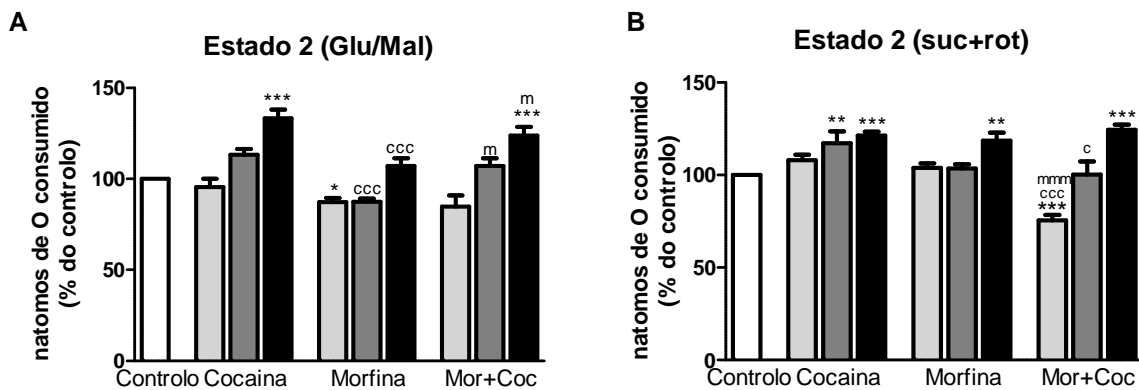
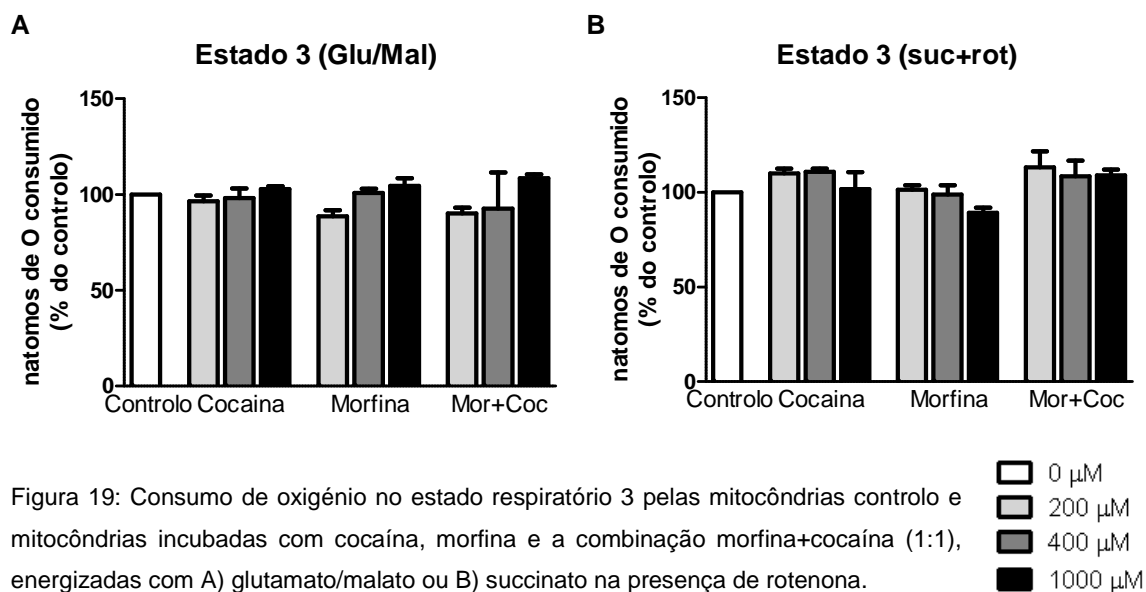
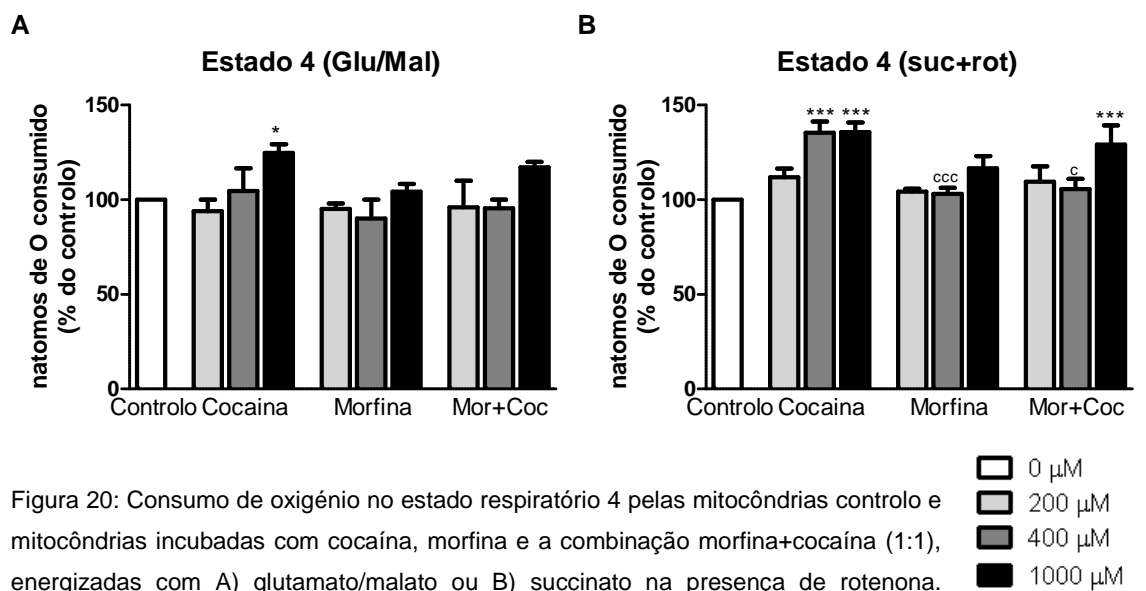


Figura 18: Consumo de oxigénio (estado respiratório 2) pelas mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1), energizadas com A) glutamato/malato ou B) succinato, na presença de rotenona. Análise estatística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; ^c $p < 0.05$, ^{ccc} $p < 0.001$ relativamente à mesma concentração de cocaína; ^m $p < 0.05$, ^{mmm} $p < 0.001$ relativamente mesma concentração de morfina (one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

O estado respiratório 3 é obtido após adição de ADP às mitocôndrias. A figura 19 mostra-nos que as drogas, isoladas ou combinadas, não induzem diferenças significativas no consumo de oxigénio, qualquer que seja o substrato fornecido (glu/mal ou succinato).



Após o consumo de todo o ADP adicionado, as mitocôndrias atingem o estado 4. Como podemos observar na figura 20, as concentrações mais elevadas de cocaína e da combinação Mor+Coc (1:1) induzem um aumento significativo no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas com glu/mal ou com suc (na presença de rot).



Análise estatística: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controle; ^c $p < 0.05$, ^{ccc} $p < 0.001$ relativamente à mesma concentração de cocaína (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

De modo a avaliar a contribuição da permeabilidade passiva da membrana interna a H^+ , avaliou-se o estado oligomícina, que se refere ao consumo de oxigénio obtido após a adição de ADP e oligomícina. Na figura 21 podemos ver que, para qualquer que seja o substrato fornecido (glu/mal ou suc), a oligomícina induz um aumento do consumo de oxigénio em mitocôndrias expostas às concentrações mais elevadas de cocaína e da combinação Mor+Coc (1:1), sugerindo um aumento da permeabilidade passiva a H^+ .

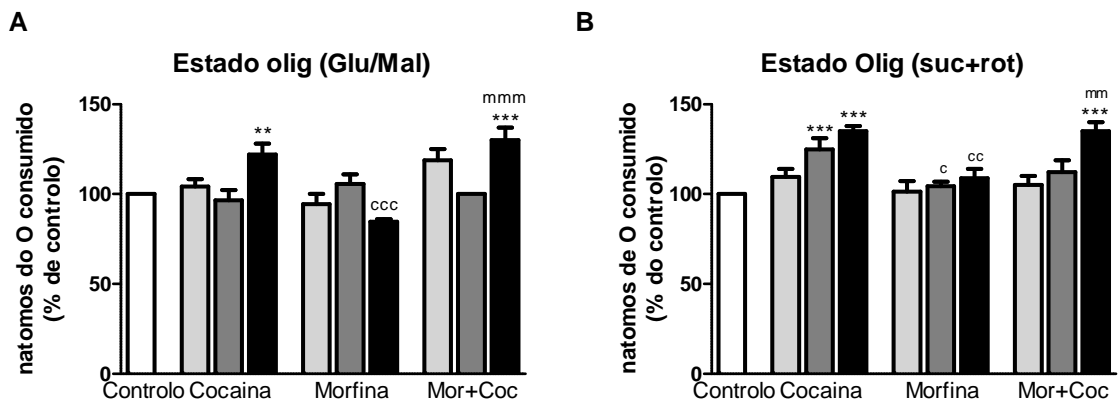


Figura 21: Consumo de oxigénio no estado oligomícina pelas mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1), energizadas com A) glutamato/malato ou B) succinato na presença de rotenona. Análise estatística: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; ^c $p < 0.05$, ^{cc} $p < 0.01$, ^{ccc} $p < 0.001$ relativamente à mesma concentração de cocaína; ^{mm} $p < 0.01$, ^{mmm} $p < 0.001$ relativamente mesma concentração de morfina (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

Após a adição de FCCP, um desacoplador da cadeia transportadora de electrões, o consumo de O_2 pelas mitocôndrias atinge o valor máximo em resultado do desacoplamento mitocondrial (estado FCCP). Na figura 22 é visível que as concentrações mais elevadas de cocaína e da combinação Mor+Coc (1:1) induziram uma diminuição significativa do consumo de O_2 , indicativo do envolvimento directo dos compostos na cadeia respiratória. Como este efeito só se observa quando as mitocôndrias são energizadas com glu/mal, podemos concluir que a inibição observada resulta de efeitos directos ao nível do complexo I.

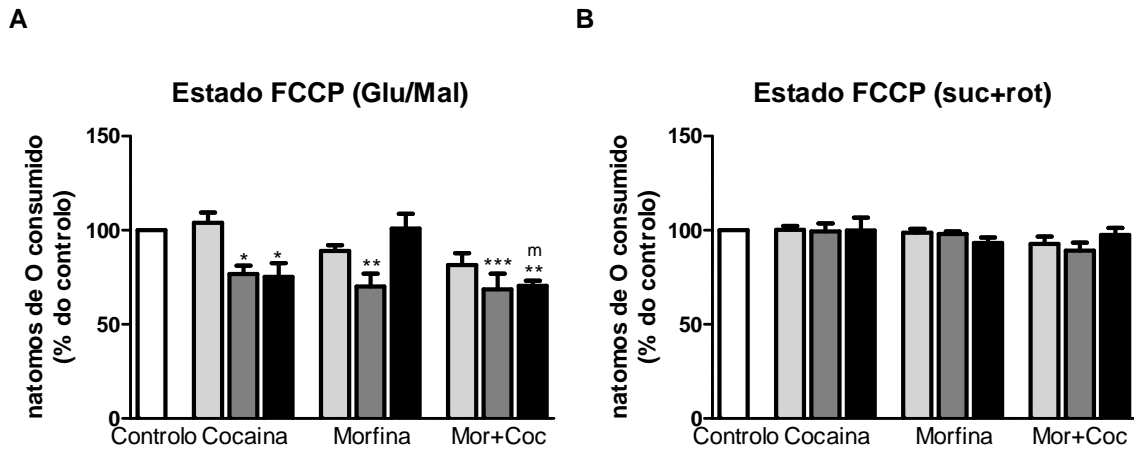


Figura 22: Consumo de oxigénio no estado respiratório FCCP pelas mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1), energizadas com A) glutamato/malato ou B) succinato na presença de rotenona. Análise estatística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; ^m $p < 0.05$ relativamente mesma concentração de morfina (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).



A figura 23 mostra-nos o índice de controlo respiratório (ICR), isto é, o quociente entre as velocidades respiratórias do estado 3 e do estado 4. Este índice indica-nos a qualidade da preparação mitocondrial, em termos da integridade estrutural e funcional. A cocaína e a combinação Mor+Coc diminuem significativamente este índice, quer para mitocôndrias energizadas com glu/mal, quer com suc (na presença de rot).

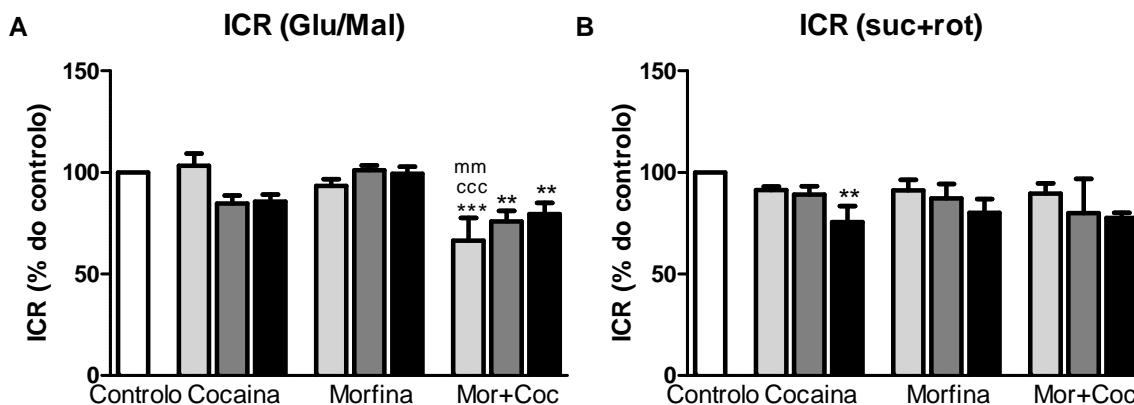
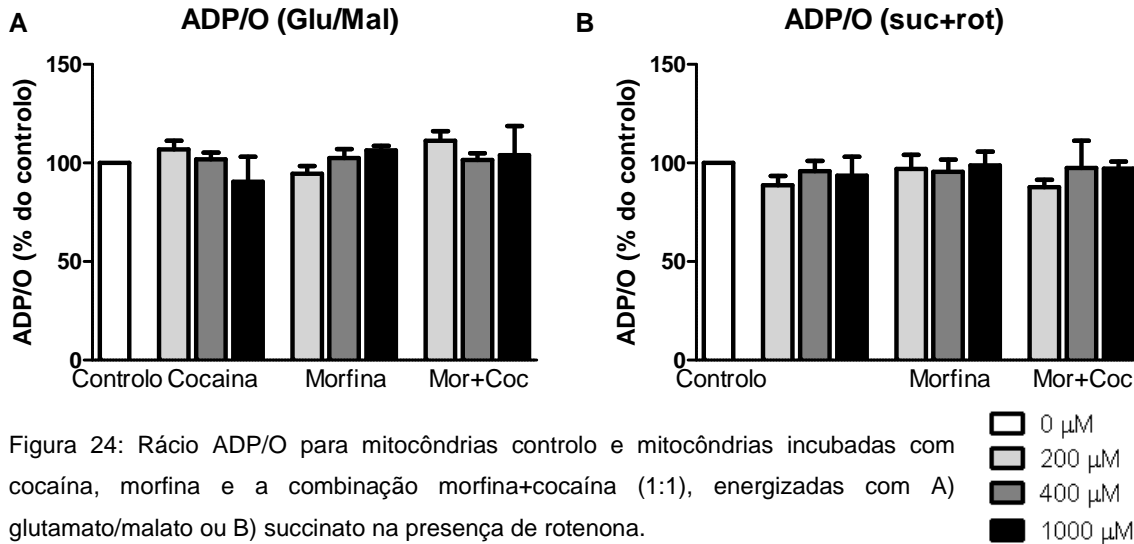


Figura 23: Índice de controlo respiratório (ICR) para mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1), energizadas com A) glutamato/malato ou B) succinato na presença de rotenona. Análise estatística: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; ^{mm} $p < 0.01$ relativamente à mesma concentração de morfina; ^{ccc} $p < 0.001$ relativamente à mesma concentração de cocaína (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

O rácio ADP/O traduz o quociente entre a quantidade de ADP adicionada e o O₂ consumido, para fosforilar o ADP adicionado, e indica a eficiência da fosforilação oxidativa. Como podemos ver na figura 24, nenhuma das drogas isoladas ou combinadas induz alterações no rácio ADP/O.



4.2 Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína no potencial eléctrico transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para além dos parâmetros respiratórios, avaliámos também os efeitos das drogas no potencial transmembranar das mitocôndrias isoladas do fígado de rato. Após a adição de suc ou glu/mal, ocorre a energização das mitocôndrias e atinge-se um potencial máximo correspondente a um estado estacionário característico do estado 2. As concentrações mais elevadas de cocaína e da combinação Mor+Coc (1:1) diminuiram significativamente o $\Delta\Psi_m$ (figura 25).

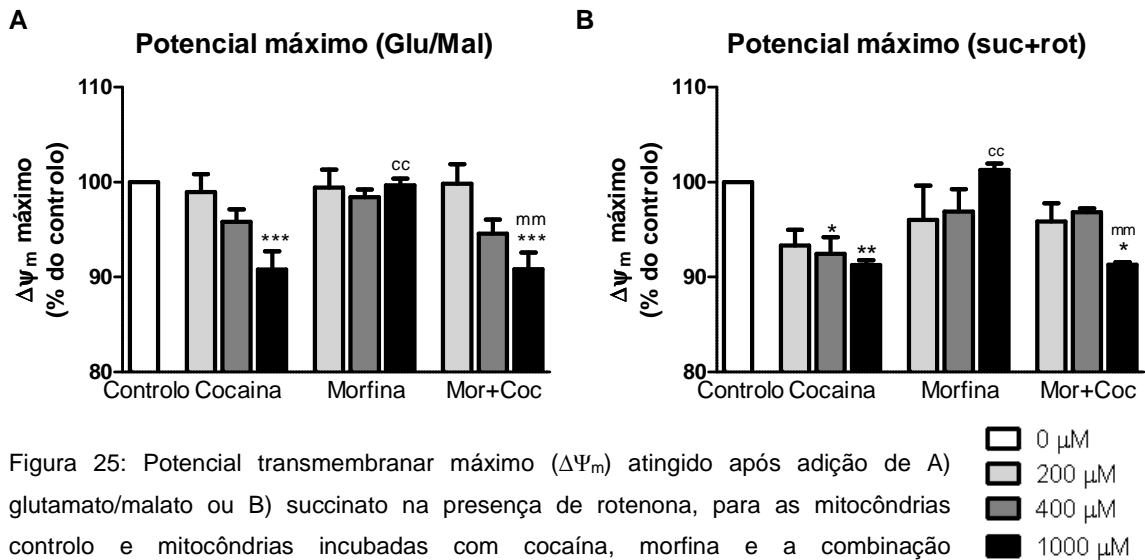


Figura 25: Potencial transmembranar máximo ($\Delta\Psi_m$) atingido após adição de A) glutamato/malato ou B) succinato na presença de rotenona, para as mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1). Análise estatística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; ^{cc} $p < 0.01$ relativamente à mesma concentração de cocaína; ^{mm} $p < 0.01$ relativamente à mesma concentração de morfina (*one-way ANOVA* seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

Após a adição de ADP, o $\Delta\Psi_m$ diminui em cerca de 30 mV, em resultado da acção da ATPsintetase que utiliza a energia da força protomotriz (Δp) gerada pela respiração para fosforilar o ADP adicionado. Na figura 26 podemos ver que as concentrações mais elevadas de cocaína e da combinação Mor+Coc (1:1) induzem uma diminuição significativa da despolarização induzida por ADP, qualquer que seja o substrato fornecido (glu/mal ou suc).

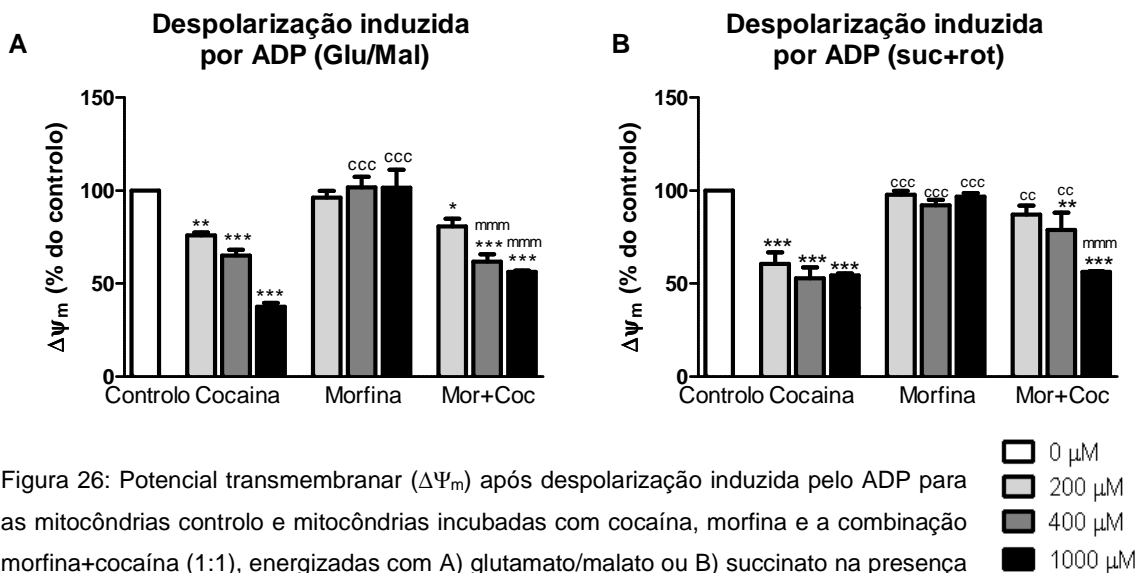


Figura 26: Potencial transmembranar ($\Delta\Psi_m$) após despolarização induzida pelo ADP para as mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1), energizadas com A) glutamato/malato ou B) succinato na presença de rotenona. Análise estatística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; ^{cc} $p < 0.01$, ^{ccc} $p < 0.001$ relativamente à mesma concentração de cocaína; ^{mmm} $p < 0.001$ relativamente à mesma concentração de morfina (*one-way ANOVA* seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

O tempo de fosforilação é o tempo que as mitocôndrias demoram a fosforilar todo o ADP adicionado e, assim, restabelecer o potencial máximo. Como podemos observar na figura 27, as drogas, isoladas ou combinadas, não promovem diferenças significativas no tempo de fosforilação.

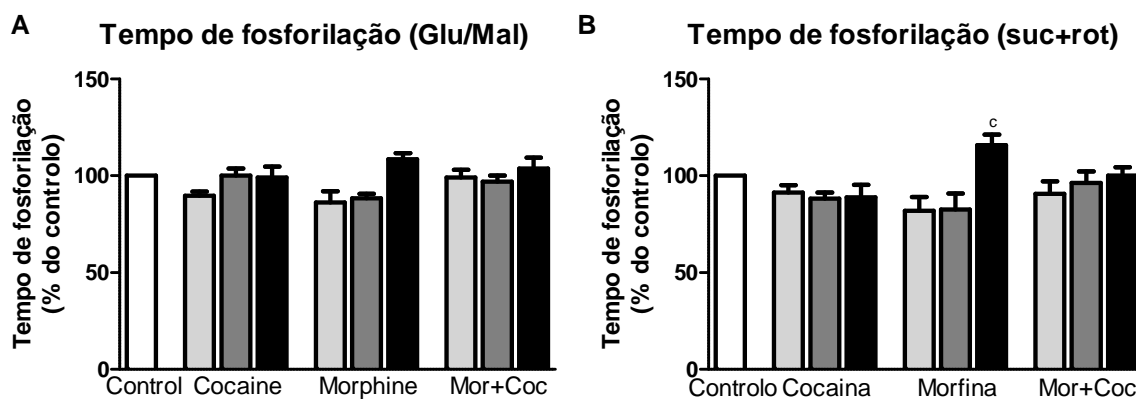


Figura 27: Tempo de fosforilação para as mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1), energizadas com A) glutamato/malato ou B) succinato na presença de rotenona. Análise estatística: $^c p < 0.05$ relativamente à mesma concentração de cocaína (one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).



4.3 Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na actividade da ATPase mitocondrial

Como vimos, a exposição das mitocôndrias à combinação Mor+Coc (1:1) leva a uma diminuição do potencial transmembranar após a despolarização induzida pelo ADP. Isto sugere um possível efeito directo destas drogas na ATP sintetase, pelo que de seguida avaliámos a actividade da ATPase mitocondrial.

A ATP sintetase mitocondrial pode funcionar, em determinadas circunstâncias, como ATPase hidrolisando ATP celular. Optámos por medir a actividade da ATPase e não a da ATP sintetase porque, em termos práticos, podemos usar mitocôndrias congeladas evitando-se a utilização imediata e por tempo limitado de mitocôndrias frescas e acopladas. Adicionalmente, a avaliação da actividade de ATPase em mitocôndrias

congeladas/descongeladas permite a discriminação de efeitos ao nível do componente F_1 da enzima.

A figura 28 mostra-nos o efeito das drogas na actividade da ATPase mitocondrial. Podemos ver que a cocaína, a morfina e a combinação Mor+Coc (1:1), induziram uma diminuição significativa da actividade da ATPase/ATP sintetase. Este efeito parece contradizer os resultados obtidos no estado respiratório 3, onde não se verifica qualquer alteração no consumo de oxigénio, que sugere que nenhuma das drogas tenha efeitos ao nível da ATP sintetase (figura 19). Este efeito inibitório directo ao nível do componente F_1 da enzima sugere que o ATP (para concentrações saturantes – 1 mM) susceptibiliza a enzima tornando-a mais sensível à acção das drogas.

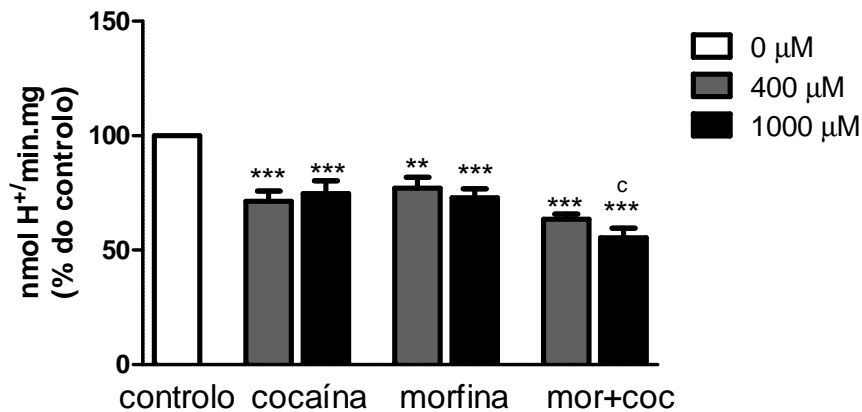


Figura 28: Actividade da ATPase de mitocôndrias controlo e de mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1). Análise estatística: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controlo; ^C $p < 0.05$ relativamente à mesma concentração de cocaína (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

4.4 Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na acumulação de cálcio (Ca^{2+}) pelas mitocôndrias

Para estudar o efeito das drogas na acumulação de cálcio pelas mitocôndrias e no PPT usámos um eléctrodo de Ca^{2+} e um eléctrodo de TPP^+ .

O colapso do $\Delta\Psi_m$ é uma das características da abertura do PPT. A figura 29 representa as alterações de $\Delta\Psi_m$ medidas com o eléctrodo de TPP^+ . Podemos ver as variações de potencial nas mitocôndrias após a adição de

vários pulsos de cálcio (40 nmol). Em mitocôndrias incubadas com succinato, observou-se em todas as condições experimentais que a adição do primeiro pulso de cálcio promoveu uma despolarização seguida de repolarização rápida. A despolarização total mitocondrial só ocorreu após a adição do segundo pulso de cálcio, excepto quando a Cys A, um inibidor específico do PPT, foi adicionado ao meio. Podemos também ver que a cocaína e a combinação Mor+Coc (1:1) induzem uma diminuição da energização promovida pelo suc. No entanto, tanto as mitocôndrias controlo, como as incubadas com cocaína, morfina e a combinação, apresentaram um comportamento semelhante após a adição do segundo pulso de cálcio, isto é, sofreram a abertura do PPT de modo semelhante.

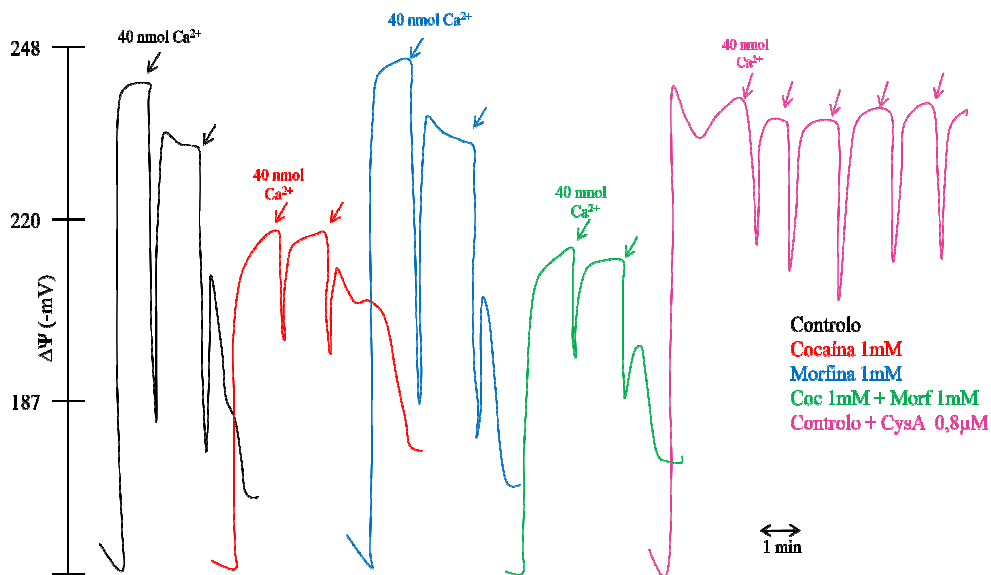


Figura 29: Registo tipo obtido pelo eléctrodo de TPP⁺. Registo das variações de potencial que ocorreram, após a adição de vários pulsos de cálcio (40 nmol), nas mitocôndrias controlo e nas mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1).

A diminuição do $\Delta\Psi_m$, associada ao aumento de Ca^{2+} na matriz mitocondrial está relacionada com a abertura do PPT. Assim, testámos a capacidade das mitocôndrias acumularem cálcio na presença das drogas. Na figura 30 temos um registo tipo obtido pelo eléctrodo de Ca^{2+} , que nos mostra a acumulação/libertação do Ca^{2+} por mitocôndrias energizadas com suc. As mitocôndrias controlo e as mitocôndrias incubadas com morfina apresentaram um comportamento semelhante. As mitocôndrias acumulam Ca^{2+} , que rapidamente é libertado devido à abertura do PPT. Note-se que na presença de

Cys A todo o Ca^{2+} é retido no interior das mitocôndrias, devido à inibição da abertura do PPT. As mitocôndrias incubadas com cocaína e com a combinação Mor+Coc (1:1) acumularam menos Ca^{2+} , por isso não ocorreu a abertura do PPT. Esta incapacidade das mitocôndrias acumularem Ca^{2+} pode relacionar-se com a menor energização observada na presença das drogas (figura 29). Aparentemente, a combinação Mor:Coc (1:1) promoveu a indução do PPT numa pequena fracção de mitocôndrias.

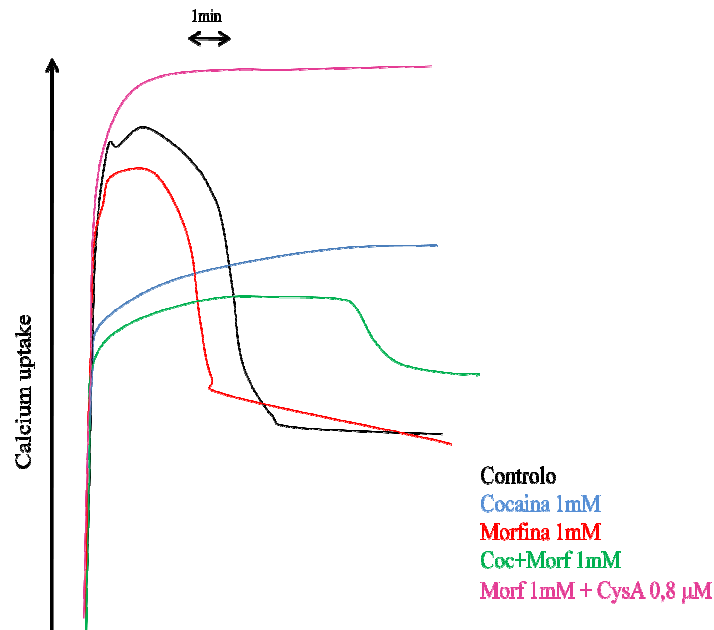


Figura 30: Registo tipo obtido pelo eléctrodo de Ca^{2+} representando os movimentos de Ca^{2+} associados à acumulação/libertação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1).

4.5 Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na peroxidação lipídica

Para avaliar o efeito das drogas na peroxidação lipídica avaliámos o consumo de O_2 através de um eléctrodo de O_2 , e medimos a produção de TBARS.

O consumo de oxigénio pelas mitocôndrias, após indução da peroxidação lipídica por adição do par $\text{ADP}/\text{Fe}^{2+}$, está representado na figura 31. As mitocôndrias controlo e as mitocôndrias incubadas com cocaína

consomem oxigénio a uma velocidade muito semelhante. Por sua vez, nas mitocôndrias incubadas com morfina e com a combinação Mor+Coc (1:1) o tempo de iniciação da peroxidação aumentou e ocorreu uma diminuição, ainda que ligeira, do consumo de O₂, sugerindo um efeito antioxidante das drogas.

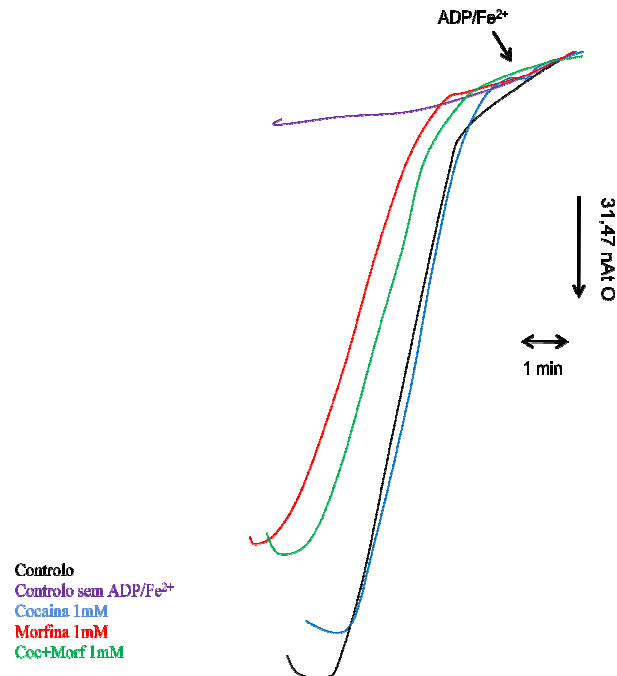


Figura 31: Registo tipo obtido pelo eléctrodo de O₂. Visualiza-se o consumo de oxigénio pelas mitocôndrias controlo e mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1), após indução da peroxidação lipídica por adição do par ADP/Fe²⁺.

A figura 32, mostra-nos a quantidade de TBARS (em nmol/mg de proteína) produzidas pelas mitocôndrias na presença de ADP/Fe²⁺. As mitocôndrias controlo e as mitocôndrias incubadas com cocaína produzem uma quantidade de TBARS semelhante. Por sua vez, as mitocôndrias incubadas com morfina e com a combinação Mor+Coc (1:1) produzem uma quantidade de TBARS significativamente menor, quando comparadas com as anteriores. Este resultado apoia plenamente as conclusões obtidas a partir dos registos do consumo de O₂ (figura 31).

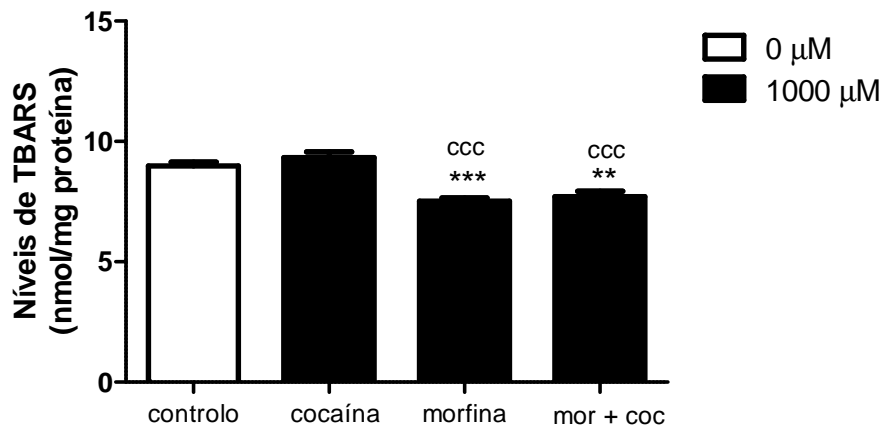


Figura 32: Quantidade de TBARS (em nmol/mg proteína) produzidos pelas mitocôndrias de controle e pelas mitocôndrias incubadas com cocaína, morfina e a combinação morfina+cocaína (1:1). Análise estatística: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente ao controle; ^{ccc} $p < 0.001$ relativamente à mesma concentração de cocaína (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

4.6 Efeito da cocaína, morfina e morfina+cocaína na produção mitocondrial de H₂O₂

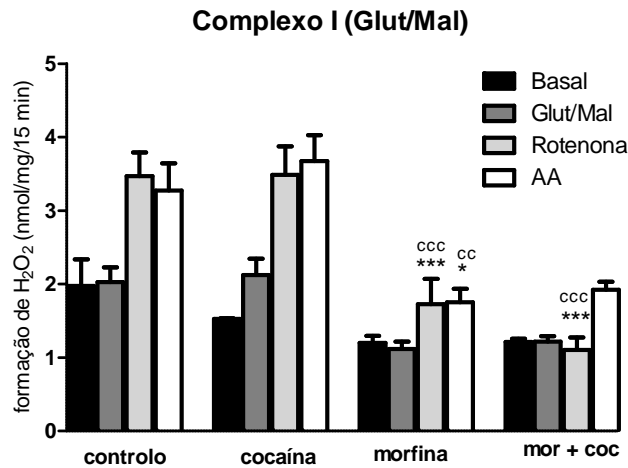
O efeito das drogas e da sua combinação na produção de ROS, foi avaliado através de um método fluorimétrico que nos permite quantificar o H₂O₂ produzido na cadeia respiratória. Permite-nos também localizar possíveis locais de produção de ROS por utilização de diferentes inibidores respiratórios. A AA foi usada para inibir o complexo III e a rot para inibir o complexo I.

Na figura 33 podemos ver que nas mitocôndrias de controle, energizadas com glu/mal, houve uma maior produção de H₂O₂ na presença de rotenona. Este aumento de produção é idêntico ao que ocorre na presença de AA nas mitocôndrias energizadas com glu/mal ou com suc. Isto acontece porque a rot inibe o complexo I e a AA inibe o complexo III. Estes complexos estão referenciados como locais de “fuga” de electrões da cadeia respiratória responsável pela formação de O₂^{•-}.

As mitocôndrias incubadas com cocaína apresentam uma produção de H₂O₂ muito semelhante à das mitocôndrias de controle. As mitocôndrias incubadas com morfina e com a combinação Mor+Coc (1:1) apresentaram uma diminuição

significativa na produção de H_2O_2 , na presença de rot e AA, quando comparadas com as mitocôndrias controlo ou incubadas com cocaína.

A



B

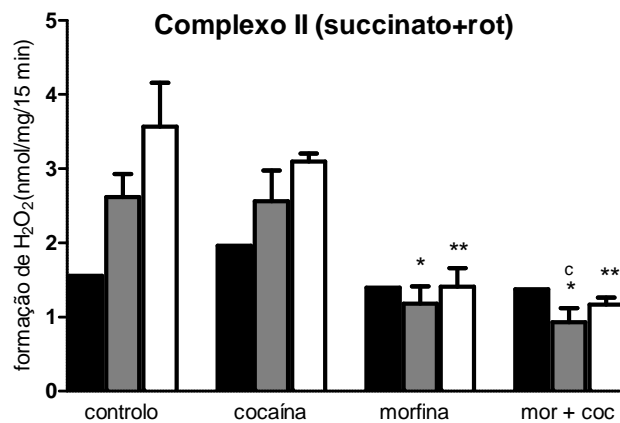


Figura 33: Quantificação da formação de H_2O_2 (nmol/mg/15min) pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com A) glutamato/malato ou B) succinato, na presença de rotenona. Para as mitocôndrias controlo e para as incubadas com cocaína, morfina ou com a combinação morfina+cocaína (1:1) pode observar-se a situação basal (sem substrato), após adição de glu/mal (substrato), após adição de rotenona (inibidor do complexo I), e após adição de antimicina A AA, (inibidor do complexo III). Análise estatística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relativamente à mesma condição de controlo; $^{\circ}p < 0.05$, $^{\circ\circ}p < 0.01$, $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ relativamente à mesma condição de cocaína (*one-way ANOVA* seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

Para determinar se a capacidade antioxidante da morfina na formação de H_2O_2 pelas mitocôndrias é específica desta molécula, testamos também o efeito da heroína. De facto, na figura 34 vemos que as mitocôndrias, energizadas com glu/mal e incubadas com morfina apresentam uma diminuição muito mais acentuada da produção de H_2O_2 do que as mitocôndrias incubadas

com heroína, sugerindo que a morfina é mais eficiente em proteger as mitocôndrias de danos induzidos pelo stresse oxidativo.

A heroína quimicamente contém dois grupos carboxilo (COOH) o que lhe poderá conferir menor poder antioxidante do que a morfina que apresenta dois grupos OH ligados aos anéis benzênicos.

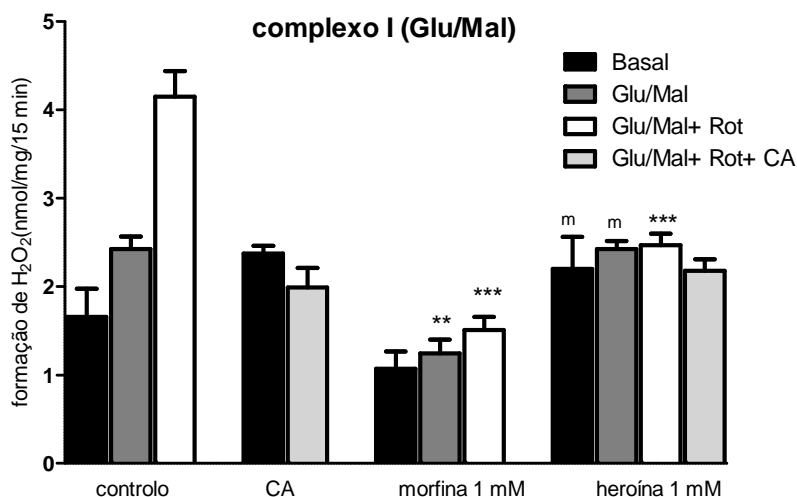


Figura 34: Quantificação da formação de H₂O₂ (nmol/mg/15min) pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato/malato. Para as mitocôndrias controlo e para as incubadas com morfina ou heroína pode observar-se a situação basal (sem substrato), após adição de glu/mal (substrato), após adição de rotenona Rot, (inibidor do complexo I), e após adição de catalase CA, (enzima que decompõem o H₂O₂ em H₂O e O₂). Análise estatística: ** p<0.01, *** p<0.001 relativamente à mesma condição de controlo; ^mp<0.05 relativamente à mesma condição de morfina (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni).

Capítulo V – Discussão

O aumento do consumo de drogas de abuso é um problema de ordem social, nomeadamente de saúde pública. A Coc é a segunda droga ilícita mais consumida na Europa, a seguir à *cannabis* (3). Para além disso, o consumo combinado de drogas também tem aumentado, especialmente o consumo de Her com Coc – *Speedball* (3). Resultados anteriores sugerem que a Coc, a Her e o *speedball* afectam a função mitocondrial em culturas celulares (19;25;69).

Na combinação de Her, ou seu metabolito Mor, e a Coc verifica-se a ocorrência de interacções químicas entre estas moléculas com formação de aductos cocaína-morfina na proporção de 1:1 (1).

Uma vez que as drogas são metabolizadas no fígado, decidimos estudar o efeito directo da Coc, Mor e a combinação Mor+Coc (1:1) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Estudámos vários parâmetros da bioenergética mitocondrial e do stresse oxidativo, de modo a avaliar se a combinação Mor+Coc (1:1) alterava a toxicidade manifestada por estas drogas.

Este trabalho permite-nos esclarecer se o consumo combinado destas duas drogas tem um efeito aditivo, sinérgico ou antagonista, ou se o aducto Mor+Coc (1:1) formado confere à combinação um novo efeito a nível hepático. A nível forense os resultados poderão permitir esclarecer se a morte por *overdose* pode ocorrer mais rapidamente em consumidores de *speedball*, comparativamente a consumidores da mesma dose de apenas uma dessas drogas.

Os nossos resultados demonstram que o efeito da combinação Mor+Coc (1:1) na cadeia respiratória e no potencial mitocondrial são semelhantes aos efeitos induzidos pela cocaína isoladamente. Relativamente ao stresse oxidativo, os efeitos da combinação são semelhantes aos induzidos pela Mor isoladamente.

Em resumo, a combinação (sequencial) das duas drogas não parece modificar os efeitos mitocondriais que cada uma das drogas manifesta, quando usadas isoladamente.

Efeitos da Cocaína

Múltiplas investigações sugerem que a cocaína influencia a função mitocondrial. Uma diminuição significativa do estado respiratório 3 e do ICR foram observadas em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (7) e murganho (70) tratadas com Coc. Em células do miocárdio, a Coc (1 mM) inibe o complexo I da cadeia respiratória (17). No entanto, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, esta droga parece não ter efeitos no estado 3, estado 4, ICR, e ADP/O (20). Ela diminui o potencial transmembranar mitocondrial em cardiomiócitos (18) e em neurónios corticais de rato (19). A toxicidade da Coc numa linha celular neuronal parece ser mediada pela cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que células rho-zero (sem mitocôndrias funcionais) são mais resistentes à Coc do que células rho⁺ (19).

Os nossos resultados comprovam que, de facto, a Coc afecta a cadeia respiratória. Demonstram que as mitocôndrias incubadas com Coc não sofrem alterações no estado 3 (figura 19), no ICR (figura 23), nem no rácio ADP/O (figura 24). O aumento do estado 2 e 4 (figuras 18 e 20) é indicativo de que há um aumento do transporte passivo de H⁺ para o interior da mitocôndria, o que é comprovado pelo aumento do estado oligomicina (figura 21). Ou seja, pode ocorrer um dano bilateral nos fosfolípidos ou a abertura do PPT. Porém, esta abertura do PPT não se verifica nas nossas experiências (figuras 29 e 30) o que nos sugere que os H⁺ entram na mitocôndria por permeabilidade passiva através da membrana. O estado FCCP (figura 22) diminui na presença de Coc unicamente em mitocôndrias energizadas com glu/mal, o que sugere o envolvimento do complexo I. Nestas condições experimentais, o potencial eléctrico transmembranar diminui significativamente (figura 25 **A**) provavelmente devido à inibição do complexo I. A diminuição do potencial máximo (figura 25 **B**) que ocorre nas mitocôndrias energizadas com succinato, na presença de rotenona, será devida à permeabilidade passiva da membrana a H⁺ e à inibição do complexo I pela rotenona. A despolarização induzida por ADP (figura 26) também diminui significativamente nas mitocôndrias incubadas com Coc, o que poderá resultar de um efeito directo da droga na ATP sintetase visto que a actividade desta enzima, mais concretamente a subunidade F₁, diminui na presença de Coc (figura 28).

Aparentemente, o stresse oxidativo induzido pela Coc desempenha um papel importante nas propriedades aditivas desta droga (71). Alguns estudos demonstram que a Coc pode induzir um aumento da peroxidação lipídica em cérebro de ratos expostos *in útero* a esta droga (21). Aumenta, também, os níveis de H_2O_2 em estruturas dopaminérgicas de cérebro de rato (22), e em mitocôndrias cardíacas de rato induz um aumento dos níveis de ROS (72).

No nosso estudo verificamos que a Coc não afecta a peroxidação lipídica nem a formação de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas do fígado de rato (figuras 31-34). O consumo de oxigénio (figura 31), a produção de TBARS (figura 32) e a formação de H_2O_2 (fig. 33-34) é semelhante nas mitocôndrias incubadas com Coc e nas mitocôndrias controlo, sugerindo que no nosso modelo de estudo a Coc não está envolvida em mecanismos de stresse oxidativo.

Efeitos da Morfina

Alguns estudos demonstraram que a exposição à Her conduz à diminuição do potencial transmembranar da mitocôndria e que, em neurónios corticais de rato, induz morte celular pela via apoptótica dependente da mitocôndria (69). Existem também vários estudos realizados com Mor, visto que a Her é rapidamente transformada em Mor e 6-acetilmorfina. Esses estudos demonstraram que a Mor induz a diminuição do estado 4, aumento do estado 3, ICR e do rácio ADP/O e inibe a peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas do cérebro de rato (23). Estudos *in vivo* demonstraram que ela diminui o nível de TBARS, a actividade da Na^+K^+ ATPase e da ATPase total, em tecido do cérebro de rato (24).

No presente estudo, a Mor não afectou nenhum dos parâmetros respiratórios, nem o potencial mitocondrial, induzindo uma diminuição da actividade da ATPase (figura 28) em mitocôndrias isoladas do fígado de rato.

Neste trabalho, a Mor pareceu ter um efeito antioxidante. Observou-se que nas mitocôndrias incubadas com esta droga houve um aumento do tempo de iniciação da peroxidação lipídica e uma diminuição do consumo de oxigénio (figura 31) após iniciação da peroxidação lípidica com o par ADP/Fe^{2+} e uma diminuição da formação de TBARS (figura 32). A observação de que na

presença de Mor havia uma diminuição na produção de H_2O_2 (figura 33) sugere que ela possa ter um efeito “*scavenger*” (capacidade de neutralizar radicais livres). A Her parece não ter a capacidade de proteger a mitocôndria da formação de H_2O_2 (figura 34) quando comparada com a Mor, sugerindo que não apresenta a capacidade antioxidante de Mor, não interferindo nos mecanismos de stresse oxidativo. Estes resultados são idênticos aos obtidos com fígado de ratos tratados cronicamente com Mor, que sugeriram que, *in vivo*, a Mor pode estar envolvida na redução dos níveis de H_2O_2 por um efeito “*scavenger*” (73). No entanto, os nossos resultados são diferentes dos obtidos em estudos anteriores, em que a administração *in vivo* de Mor conduziu a um aumento dos produtos de peroxidação lipídica (aumento dos níveis de TBARS) em tecido de cérebro (24) e fígado de rato (74). Esta diferença pode ser explicada por se tratar de um estudo *in vivo* enquanto o nosso estudo foi *in vitro*.

Estudos anteriores mostraram que a apomorfina, uma molécula quimicamente semelhante à Mor, apresenta uma acção neuroprotectora em estriado de rato. Esta acção deve-se ao facto de ambos os enantiómeros *S*- e *R*-apomorfina apresentarem propriedades antioxidantes (“*scavenging*” de radicais) e quelantes de ferro (75). Provavelmente, na apomorfina, o anel benzénico com os dois grupos hidróxilos é o responsável pela sua acção antioxidante, uma vez que pode receber electrões, evitando assim que estes reduzam o O_2 , levando à formação de radicais livres. Relativamente à Mor, cuja estrutura química é semelhante, é provável que um dos dois anéis benzénicos com o grupo hidroxilo seja o responsável pela sua propriedade antioxidante. Para esclarecer qual desses grupos terá essa propriedade poderíamos comparar a capacidade oxidante da 6-acetilmorfina e da Mor (figura 35).

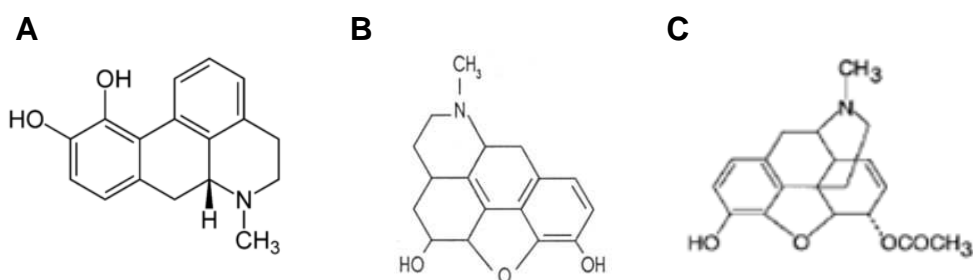


Figura 35: Estrutura de **A)** apomorfina, **B)** morfina e **C)** 6-acetilmorfina [imagem adaptada de (8)]

Efeitos da combinação morfina+cocaína

Como já foi referido, o consumo combinado de Coc e Her é muito comum e está pouco estudado. A combinação destas drogas pode levar à modificação dos efeitos observados para cada uma das drogas em separado. Esta modificação de efeitos pode ser devido à formação de aductos que ocorre entre as duas drogas (1), alterando as suas propriedades químicas.

O objectivo principal deste estudo centrou-se em avaliar se a combinação Mor+Coc (1:1) alterava a toxicidade manifestada por estas drogas em mitocôndrias isoladas do fígado de rato. Usámos concentrações elevadas das drogas (1 mM), não atingidas normalmente em casos reais de consumo (excepto em condições de *overdoses*) e estudámos os efeitos das drogas isoladas e combinadas (1:1).

São muito escassas as publicações relativas ao uso da combinação Mor+Coc, havendo alguns estudos realizados com a combinação coc:her. No nosso estudo laboratorial demonstrou-se, anteriormente, que a mistura coc:her induzia uma diminuição do potencial mitocondrial (25). Nesse estudo, as drogas foram administradas de dois modos diferentes: sequencialmente, a partir de stocks de soluções separadas (Her+Coc), e simultaneamente usando uma solução contendo ambas as drogas (Her:Coc), preparada a partir da mistura das formas sólidas. Observou-se que a neurotoxicidade da combinação era maior na administração simultânea do que na sequencial, provavelmente devido a uma maior interacção química entre as moléculas, e consequentemente a uma possível formação de aductos (25).

Nos nossos resultados, as mitocôndrias do fígado de rato incubadas com a combinação Mor+Coc (1:1) apresentaram um potencial transmembranar significativamente menor (figura 25) do que os controlos. Tal como com a Coc a diminuição da despolarização induzida pelo ADP sugere-nos que esta combinação poderá ter uma acção directa na ATP sintetase, o que se parece confirmar pela diminuição da actividade da ATPase mitocondrial observada (figura 28). Todavia, os resultados obtidos neste trabalho mostram que, apesar de diminuir bastante o potencial eléctrico transmembranar da mitocôndria, a combinação Mor+Coc não afecta a abertura do PPT (figuras 29 e 30). Relativamente aos parâmetros da cadeia respiratória (figuras 18-24), os efeitos

provocados pela combinação Mor+Coc são em tudo semelhantes aos provocados pela Coc. Esta combinação parece, também, apresentar a capacidade antioxidante semelhante à da Mor, mas de uma forma mais ténue (figuras 31, 32 e 34).

É de notar que, neste trabalho, a combinação Mor+Coc não foi preparada em pó, isto é, a Mor e a Coc foram adicionadas sequencialmente (1:1) de soluções stocks separadas. Tal facto pode levar a uma menor formação de aductos Coc-Mor, e consequentemente explicar o facto de termos observado efeitos menos significativos do que os descritos em neurónios corticais (25)

Na tabela 2 sumarizam-se os resultados obtidos para os diversos parâmetros analisados ao longo dos diferentes ensaios.

Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos neste trabalho

	Cocaína	Morfina	Morfina+Cocaína
Cadeia Respiratória		Não afecta nenhum dos parâmetros	
Potencial Mitocondrial	↓ Potencial máximo e a despolarização induzida por ADP	Não afecta	↓ Potencial máximo e a despolarização induzida por ADP
ATPase	↓ Actividade da enzima	↓ Actividade da enzima	↓ Actividade da enzima
PPT	Não afecta a sua abertura	Não afecta a sua abertura	Não afecta a sua abertura
Peroxidação lipídica	Não afecta a formação de TBARS	↓ a formação de TBARS	↓ a formação de TBARS
Formação de H₂O₂	Não afecta	↓	↓

Capítulo VI – Conclusões Gerais

Da análise dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- Os efeitos da Coc predominam nas mitocôndrias incubadas com a combinação Mor+Coc (1:1), visto que quer a Coc quer a combinação levam à inibição da cadeia respiratória.
- Aparentemente esta inibição da cadeia respiratória relaciona-se com a inibição do complexo I.
- A Coc e a combinação Mor+Coc (1:1) diminuem o potencial mitocondrial, provavelmente devido à inibição do complexo I e ao aumento da permeabilidade passiva da membrana mitocondrial interna a H^+ .
- A diminuição da despolarização induzida pelo ADP parece relacionar-se com uma acção directa da Coc e da combinação Mor+Coc (1:1) na ATP sintetase.
- A Mor e a combinação Mor+Coc (1:1) possuem um efeito antioxidante, funcionando como “*scavenger*”, pois ambas diminuem os níveis de TBARS e a formação de H_2O_2 .
- A combinação (sequencial) parece não afectar os efeitos mitocondriais manifestados por cada uma das drogas isoladamente.

Capítulo VII - Bibliografia

Reference List

- (1) Garrido JM, Marques MP, Silva AM, Macedo TR, Oliveira-Brett AM, Borges F. Spectroscopic and electrochemical studies of cocaine-opioid interactions. *Anal Bioanal Chem* 2007 Aug;388(8):1799-808.
- (2) Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2006 Mar;7(3):207-19.
- (3) OEDT (Observatório Anual da Droga e da Toxicodependência 2. A Evolução do fenómeno droga na Europa. 2010. Serviço de Publicações Oficiais das Comunidades Europeias.
Ref Type: Catalog
- (4) United Nations Office on Drugs and Crime. World drug report 2010. 2010. New York, United Nations.
Ref Type: Catalog
- (5) Robert M, Julien MD. A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs. 8. 1997. New york, W.H. Freeman and company.
Ref Type: Edited Book
- (6) Jenkins AJ, Cone EJ. Pharmacokinetics: Drug absorption, distribution, and elimination. 1998.
- (7) Devi BG, Chan AW. Impairment of mitochondrial respiration and electron transport chain enzymes during cocaine-induced hepatic injury. *Life Sci* 1997;60(11):849-55.
- (8) Steven BK. Drug abuse Handbook. 1988. San Francisco, CKS Press.
Ref Type: Edited Book
- (9) Ndikum-Moffor FM, Roberts SM. Cocaine-protein targets in mouse liver. *Biochemical Pharmacology* 2003;66(1):105-13.
- (10) Busto U, Bendayan R, Sellers EM. Clinical pharmacokinetics of non-opiate abused drugs. *Clin Pharmacokinet* 1989 Jan;16(1):1-26.
- (11) Heard K, Palmer R, Zahniser NR. Mechanisms of acute cocaine toxicity. *Open Pharmacol J* 2008;2(9):70-8.
- (12) Warner A, Denson DD. New approaches to pain control: The team approach. 11 ed. Washington, D.C.: American Association for Clinical Chemistry; 1989.
- (13) Hardman JG, Limbird LE. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 1996. New York, McCraw-Hill Companies.
Ref Type: Edited Book
- (14) Milne RW, Nation RL, Somogyi AA. The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the

- metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metab Rev* 1996 Aug;28(3):345-472.
- (15) Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 2007 Mar 24;369(9566):1047-53.
- (16) Leri F, Bruneau J, Stewart J. Understanding polydrug use: review of heroin and cocaine co-use. *Addiction* 2003 Jan;98(1):7-22.
- (17) Yuan C, Acosta D, Jr. Effect of cocaine on mitochondrial electron transport chain evaluated in primary cultures of neonatal rat myocardial cells and in isolated mitochondrial preparations. *Drug Chem Toxicol* 2000 May;23(2):339-48.
- (18) Xiao Y, He J, Gilbert RD, Zhang L. Cocaine induces apoptosis in fetal myocardial cells through a mitochondria-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Jan;292(1):8-14.
- (19) Cunha-Oliveira T, Rego AC, Cardoso SM, Borges F, Swerdlow RH, Macedo T, et al. Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine. *Brain Res* 2006 May 17;1089(1):44-54.
- (20) Boess F, Ndikum-Moffor FM, Boelsterli UA, Roberts SM. Effects of cocaine and its oxidative metabolites on mitochondrial respiration and generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 2000 Sep 1;60(5):615-23.
- (21) Bashkatova V, Meunier J, Vanin A, Maurice T. Nitric oxide and oxidative stress in the brain of rats exposed in utero to cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Aug;1074:632-42.
- (22) Dietrich JB, Mangeol A, Revel MO, Burgun C, Aunis D, Zwiller J. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology* 2005 Jun;48(7):965-74.
- (23) Feng Y, Lu Y, Lin X, Gao Y, Zhao Q, Li W, et al. Endomorphins and morphine limit anoxia-reoxygenation-induced brain mitochondrial dysfunction in the mouse. *Life Sci* 2008 Mar 26;82(13-14):752-63.
- (24) Guzman DC, Brizuela NO, Alvarez RG, Garcia EH, Mejia GB, Olguin HJ. Cerebrolysin and morphine decrease glutathione and 5-hydroxyindole acetic acid levels in fasted rat brain. *Biomed Pharmacother* 2009 Aug;63(7):517-21.
- (25) Cunha-Oliveira T, Rego AC, Garrido J, Borges F, Macedo T, Oliveira CR. Neurotoxicity of heroin-cocaine combinations in rat cortical neurons. *Toxicology* 2010 Sep 30;276(1):11-7.
- (26) Moreno AJM. Mitocôndria- Bioenergética Celular Universidade de Coimbra; 1986.
- (27) Moreira P. Efeito do peptídeo A β ₂₅₋₃₅ no poro de permeabilidade transitória da mitocôndria (um estudo comparativo) Universidade de coimbra; 2002.
- (28) Alberts B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª. 2008. New York, Garland Science.

Ref Type: Edited Book

- (29) Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5. 2002. New York, W.H. Freeman and Company.
Ref Type: Edited Book
- (30) Rickwood D. WMTD-UVM. In Mitochondria: a practical approach. 1-16. 1987. Washington DC, IRL Press Oxford.
Ref Type: Edited Book
- (31) Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. Arquivos de medicina 22, 49-56. 2008.
Ref Type: Magazine Article
- (32) Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. EMBO J 2003 Dec 1;22(23):6182-92.
- (33) Boyer P.D. The ATP synthase — a splendid molecular machine. Ann Rev Biochem 1999;66:717-49.
- (34) Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene. J Biol Chem 1999 Jan 1;274(1):36-40.
- (35) Nicholls D.G. *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*. 1, 93-95. 1982. New York, Academic Press.
Ref Type: Edited Book
- (36) Nohl H, Gille L, Staniek K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. Biochem Pharmacol 2005 Mar 1;69(5):719-23.
- (37) Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. Methods Enzymol 1999;301:188-98.
- (38) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007;39(1):44-84.
- (39) Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry (Mosc) 2005 Feb;70(2):200-14.
- (40) Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. Int J Biochem Cell Biol 2005 Dec;37(12):2478-503.
- (41) Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.
- (42) McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Radic Biol Med 1999 Apr;26(7-8):1034-53.
- (43) Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med 2006 Apr;10(2):389-406.

- (44) Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001 Dec 1;31(11):1287-312.
- (45) Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990 Apr;15(4):129-35.
- (46) Bonnes-Taourel D, Guerin MC, Torreilles J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochem Pharmacol* 1992 Sep 1;44(5):985-8.
- (47) Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002 Feb;84(2-3):153-66.
- (48) Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000 Sep;10(9):369-77.
- (49) Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 1997 Jun 27;89(7):1145-53.
- (50) Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1998 Mar 27;273(13):7770-5.
- (51) Hunter DR, Haworth RA. Ca²⁺-Induced Membrane Transition in Mitochondria .3. Transitional Ca²⁺ Release. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1979;195(2):468-77.
- (52) Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 1979 Jul;195(2):453-9.
- (53) Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998 Apr 20;187(8):1261-71.
- (54) Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995 Jul 17;1241(2):139-76.
- (55) Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999 Oct;79(4):1127-55.
- (56) Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999 Jul 15;341 (Pt 2):233-49.
- (57) Grimm S, Brdiczka D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 2007 May;12(5):841-55.
- (58) Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 2009 Jun;46(6):821-31.
- (59) Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol* 2009 Jun;46(6):850-7.

- (60) Gazzotti P, Malmstron K, Crompton M. Membrane Biochemistry. A Laboratory Manual on Transport and Bioenergetics. 1997. New York, Springer.
Ref Type: Edited Book
- (61) GORNALL AG, BARDAWILL CJ, DAVID MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem 1949 Feb;177(2):751-66.
- (62) Estabrook RW. Membranes of mitochondria and chloroplasts. 172-212. 1967. New York, Van Nostrand.
Ref Type: Edited Book
- (63) CHANCE B, WILLIAMS GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv Enzymol Relat Subj Biochem 1956;17:65-134.
- (64) Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. J Membr Biol 1979 Aug;49(2):105-21.
- (65) Madeira VM, Antunes-Madeira MC, Carvalho AP. Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. Biochem Biophys Res Commun 1974 Jun 18;58(4):897-904.
- (66) Sassa H, Takaishi Y, Terada H. The triterpene celastrol as a very potent inhibitor of lipid peroxidation in mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 1990 Oct 30;172(2):890-7.
- (67) Rohn TT, Hinds TR, Vincenzi FF. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an aminosteroid of the Ca²⁺ pump ATPase and Na⁺/K⁺ pump ATPase of human red blood cell membranes. Biochem Pharmacol 1993 Aug 3;46(3):525-34.
- (68) Barja G. The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. J Bioenerg Biomembr 2002 Jun;34(3):227-33.
- (69) Cunha-Oliveira T, Rego AC, Garrido J, Borges F, Macedo T, Oliveira CR. Street heroin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in rat cortical neurons. J Neurochem 2007 Apr;101(2):543-54.
- (70) Leon-Velarde F, Huicho L, Monge C. Effects of cocaine on oxygen consumption and mitochondrial respiration in normoxic and hypoxic mice. Life Sci 1992;50(3):213-8.
- (71) Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. Brain Res Rev 2008 Jun;58(1):192-208.
- (72) Vergeade A, Mulder P, Vendeville-Dehaut C, Estour F, Fortin D, Ventura-Clapier R, et al. Mitochondrial impairment contributes to cocaine-induced cardiac dysfunction: Prevention by the targeted antioxidant MitoQ. Free Radic Biol Med 2010 Sep 1;49(5):748-56.

- (73) Miskevich DA, Petushok NE, Lelevich VV, Lelevich SV, Borodinskii AN. [Effect of chronic morphine treatment on free radical state]. *Biomed Khim* 2007 Mar;53(2):190-5.
- (74) Horid'ko TM, Hula NM, Stohnii NA, Mehed' OF, Klimashevs'kyi VM, Shovkun SA, et al. [Effect of N-stearoylethanolamine on the lipid peroxidation process and lipid composition of the rat liver in acute morphine intoxication]. *Ukr Biokhim Zh* 2007 Sep;79(5):175-85.
- (75) Grunblatt E, Mandel S, Maor G, Youdim MBH. Effects of R- and S-apomorphine on MPTP-induced nigro-striatal dopamine neuronal loss. *Journal of Neurochemistry* 2001;77(1):146-56.