

Isa Maria Miranda Vaz

Avaliação *in vitro* do efeito de antioxidantes e inibidores da apoptose/autofagia na nefrotoxicidade induzida por cationos sintéticas

Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Fernando pessoa
Porto, 2018

Isa Maria Miranda Vaz

Avaliação *in vitro* do efeito de antioxidantes e inibidores da apoptose/autofagia na
nefrotoxicidade induzida por cationas sintéticas

Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Fernando pessoa
Porto, 2018

Avaliação *in vitro* do efeito de antioxidantes e inibidores da apoptose/autofagia na nefrotoxicidade induzida por cationos sintéticas

Trabalho original realizado por:

Isa Maria Miranda Vaz

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho.



O trabalho laboratorial foi realizado na Unidade de Investigação UFP em Energia, Ambiente e Saúde (FP-ENAS), Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto UID/Multi/04546/2013.

Experimental work carried out in UFP Energy, Environment and Health Research Unit (FP-ENAS), University Fernando Pessoa, Porto, Portugal, funded by national funds provided by FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, in the scope of FCT Project UID/Multi/04546/2013.

Publicações e comunicações científicas resultantes da investigação desenvolvida

A. Comunicações em atas de encontros científicos com arbitragem científica

I. Vaz, A. Castro, A.M. Araújo, M.J. Valente, P. Guedes de Pinho, M.D.L. Bastos, M. Carvalho (2018). Autophagy plays a protective role in synthetic cathinones-induced nephrotoxicity. *Toxicology Letters*, Letters 295S, S193.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.867>

T. Carvalho, I. Vaz, A.M. Araújo, F. Remião, M.D.L. Bastos, M. Carvalho (2018). Toxicity of synthetic cathinones in human kidney (HK-2) cells. *Toxicology Letters*, Letters 295S, S240.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.996>

B. Comunicações em poster

Isa Vaz, Ana Castro, Ana M. Araújo, Maria J. Valente, Paula Guedes de Pinho, Maria L. Bastos, Márcia Carvalho (2018). Autophagy plays a protective role in synthetic cathinones-induced nephrotoxicity. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), Bruxelas, Bélgica.

Tiago Carvalho, Isa Vaz, Ana M. Araújo, Fernando Remião, Maria L. Bastos, Márcia Carvalho (2018). Toxicity of synthetic cathinones in human kidney (HK-2) cells. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), Bruxelas, Bélgica.

Resumo

A introdução incessante de novas substâncias psicoativas no mercado das drogas recreativas e consequente consumo humano continuam a ser um desafio considerável em termos de saúde pública e para as políticas no que toca às drogas. Dentre as várias classes de drogas emergentes, destacam-se as catinonas sintéticas. Foram já descritos vários efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas, incluindo lesões renais, sendo que os mecanismos subjacentes a essa nefrotoxicidade não estão ainda esclarecidos. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o potencial nefrotóxico *in vitro* de duas catinonas frequentemente consumidas, nomeadamente a metilona e a 3,4-dimetilmetcatinona (3,4-DMMC), em células epiteliais do túbulo proximal humano (HK-2). A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de redução do MTT e o teste de incorporação do corante vermelho neutro. As alterações morfológicas foram identificadas por microscopia de contraste de fase e de fluorescência utilizando marcação com laranja de acridina. Além disso, com o objetivo de explorar os mecanismos subjacentes à toxicidade observada, foram ainda avaliados os efeitos de antioxidantes (ácido ascórbico e N-acetilcisteína), inibidores da apoptose (Z-VAD e Ac-LETD-CHO) e inibidores da autofagia (3-metiladenina e a wortmanina) na citotoxicidade induzida pelas drogas em estudo. Os resultados obtidos mostraram que ambos os derivados induziram citotoxicidade de modo dependente da concentração e do tempo de exposição, tendo o derivado 3,4-DMMC exibido um maior potencial nefrotóxico. Tanto nas células expostas à metilona como à 3,4-DMMC foi possível observar vacúolos citoplasmáticos, sugerindo a indução de autofagia. Este resultado foi corroborado pela deteção de vesículas acídicas intracelulares após marcação com laranja de acridina. A exposição das células HK-2 às catinonas na presença dos inibidores da autofagia promoveu o aumento da morte celular, evidenciando o papel protetor da autofagia na nefrotoxicidade das catinonas sintéticas. Surpreendentemente, verificou-se igualmente um aumento significativo da morte celular na presença dos inibidores da apoptose, sendo necessários estudos adicionais para elucidar as vias envolvidas. Foi também demonstrado que os agentes antioxidantes estudados potenciaram significativamente a morte celular induzida pela metilona e pela 3,4-DMMC, o que poderá estar relacionado com a inibição da autofagia mediada por espécies reativas de oxigénio e consequente potenciação da morte celular por apoptose. Contudo, serão necessários estudos futuros para verificar esta hipótese.

Avaliação *in vitro* do efeito de antioxidantes e inibidores da apoptose/autofagia na nefrotoxicidade induzida por cationas sintéticas

Palavras-chave: Cationas sintéticas; Nefrotoxicidade; Células HK-2; Morte celular; Antioxidantes; Autofagia; Apoptose

Abstract

The incessant introduction of new psychoactive substances in the recreational drug market and consequent human consumption remains a considerable challenge in terms of public health and drug policy. Among the several classes of emerging drugs, the synthetic cathinones stood out. Several adverse effects have been reported associated with the use of synthetic cathinones, including renal injury but the mechanisms underlying this nephrotoxicity have not yet been elucidated. The aim of this study was to evaluate the nephrotoxic potential, *in vitro*, of two frequently used synthetic cathinones, namely methylone and 3,4-dimethylmethcathinone (3,4-DMMC), in human proximal tubule epithelial cells (HK-2). Cell viability was assessed using the MTT reduction assay and the neutral red dye incorporation assay. The morphological changes were identified by phase contrast and fluorescence microscopy using acridine orange staining. In addition, the effects of antioxidants (ascorbic acid and n-acetylcysteine), apoptosis inhibitors (Z-VAD and Ac-Letd-CHO) and inhibitors of autophagy (3-methyladenine and Wortmannin) were also evaluated to explore the mechanisms underlying the observed toxicity induced by these drugs. The results showed that both derivatives induced cytotoxicity in a concentration-time dependent manner and 3,4-DMMC exhibited a higher nephrotoxic potential. In the cells exposed to both methylone and 3,4-DMMC it was possible to observe cytoplasmic vacuoles, suggesting the induction of autophagy. This result was confirmed by the detection of intracellular acid vesicular organelles in acridine orange-stained cells. The exposure of HK-2 cells to cathinones in the presence of autophagy inhibitors led to increased cell death, evidencing the protective role of autophagy in the nephrotoxicity of synthetic cathinones. Surprisingly, there was a significant increase in cell death in the presence of apoptosis inhibitors, with further studies being needed to elucidate the pathways involved. It was also demonstrated that the antioxidant agents significantly enhanced cell death induced by methylone and 3,4-DMMC, which may be related to the inhibition of autophagy mediated by reactive oxygen species and consequent enhancement of cell death by apoptosis. However, future studies will be needed to verify this hypothesis.

Keywords: Synthetic cathinones; Nephrotoxicity; HK-2 cells; Cell death; Antioxidants; Autophagy; Apoptosis.

Agradecimentos

Esta página destina-se a todas as pessoas que tornaram este caminho possível. Assim, deixo a todos os meus mais sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Márcia Carvalho pela orientação e ajuda ao longo destes dois anos de trabalho prático e na realização desta dissertação. Obrigada pela confiança, paciência e compreensão, pelo tempo despendido em meu auxílio, pela boa companhia em laboratório e ainda por todos os conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Anabela Castro pela ajuda nos procedimentos práticos e sabedoria partilhada.

À Ana Margarida Araújo por estar sempre disponível a ajudar-nos, esclarecer dúvidas e por tudo o que me ensinou no início deste projeto.

Às minhas sempre amigas, desde o primeiro dia, Gisela, Diana, Marta, Patrícia, Telma, Rita e Mica, pela companhia, apoio e por confiarem em mim. Obrigada por todos os momentos maravilhosos que passamos juntas, não há palavras para os descrever. Cada uma de vocês acrescentou algo muito especial e positivo na minha vida e percurso académico.

Ao Tiago, que acompanhou cada dia do meu percurso, do primeiro ao último, por toda ajuda académica e emocional, pela paciência, pelo incentivo e insistência para que eu fizesse sempre melhor. Obrigada por acreditares sempre nas minhas capacidades, pela bondade e por nunca me deixares na mão.

À minha mãe, irmã e cunhado por tornarem este curso possível, por acreditarem sempre em mim e por serem a melhor família que alguém pode ter. Obrigada por tudo.

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Agradecimentos	x
Índice de tabelas	xvii
Lista de abreviaturas	xviii
I. Enquadramento e objetivos da dissertação	1
II. CATINONAS SINTÉTICAS	3
2.1. Perspetiva histórica	3
2.2. Estrutura química	5
2.3. Propriedades e padrões de utilização das cationas sintéticas	9
2.4. Farmacocinética	11
2.5. Farmacodinâmica	17
2.6. Efeitos tóxicos	20
2.7. Tratamento de intoxicações agudas	22
III. PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1. Objetivos do estudo	23
3.2. Materiais e métodos	23
3.2.1. Linha celular HK-2	23
3.2.2. Preparação do meio de cultura	24
3.2.3. Descongelamento de alíquotas celulares	25

3.2.4.	Cultura e subcultura das células HK-2	25
3.2.5.	Congelamento e conservação das células	26
3.2.6.	Incubação com os compostos em estudo	26
3.2.7.	Avaliação da viabilidade celular	30
3.2.7.1.	Ensaio da redução do MTT	30
3.2.7.2.	Ensaio da incorporação do corante vermelho neutro	31
3.2.8.	Microscopia ótica de contraste de fase	31
3.2.9.	Avaliação de autofagia por microscopia de fluorescência com laranja de acridina	32
3.2.10.	Tratamento estatístico	32
3.3.	Resultados	33
3.3.1.	Citotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC em células HK-2	33
3.3.2.	Alterações morfológicas induzidas pela metilona e 3,4-DMMC	35
3.3.3.	Avaliação do efeito da metilona e da 3,4-DMMC na formação de vacúolos autofágicos	36
3.3.4.	Efeito do pré-tratamento com antioxidantes na nefrotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC	37
3.3.5.	Efeito do pré-tratamento com inibidores da autofagia na nefrotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC	37
3.3.6.	Efeito do pré-tratamento com inibidores da apoptose na nefrotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC	39
3.4.	Discussão	41
IV.	CONCLUSÕES	49

V. Bibliografia 50

Índice de Figuras

Figura 1 - Exemplos de embalagens contendo catinonas sintéticas.....	4
Figura 2 - Estrutura química da catinona (A) e estrutura base das catinonas sintéticas (B) (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	6
Figura 3 - Estrutura química dos derivados pertencentes à família das catinonas N-alquiladas (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	7
Figura 4 - Estrutura química das catinonas pertencentes à família das catinonas 3,4-metilenodioxo-N-alquiladas (A) e respectivos análogos não β -ceto (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	7
Figura 5 - Estrutura química de alguns derivados pertencentes à família das catinonas N-pirrolidinas (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	8
Figura 6 - Estrutura química de alguns derivados pertencentes à família das catinonas 3,4-metilenodioxo N-pirrolidinas (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	9
Figura 7 - Estrutura química da α e β -nafirona (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	9
Figura 8 - Metabolismo da catinona em catina e norefedrina (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	13
Figura 9 - Metabolismo de fase I da mefedrona e metabolitos de fase II. [R] redução; [DM] N-desmetilação; [Ox] oxidação (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	14
Figura 10 - Metabolismo de fase I das catinonas 3,4-metilenodioxo-N-alquiladas, sendo que o [R] representa uma redução, [DA] uma N-desalquilação, o [DMN] corresponde à desmetilação e o [M] uma O-metilação (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	15
Figura 11 - Metabolismo de fase I dos derivados pirrolidina, sendo que o [R] representa uma redução; [OH] hidroxilação; [DH] desidrogenação; [Ox] oxidação (adaptado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)).....	17
Figura 12 - Aspeto das células HK-2 após descongelação (A) e após aderência à superfície do frasco com cerca de 90% de confluência (B).....	24

- Figura 13 - Esquema representativo da placa de 96 poços, onde os poços representados a verde correspondem aos poços controlo negativo (células expostas somente ao meio RPMI) e os poços representados a azul correspondem aos poços contendo as 14 concentrações de cationas sintéticas testadas. Os poços periféricos representados a branco contêm água estéril ou meio RPMI.....29
- Figura 14 - Curvas concentração-resposta obtidas para a metilona (A) e 3,4-DMMC (B) na linha celular HK-2 através do ensaio de viabilidade celular do MTT. Dados obtidos com um mínimo de quatro ensaios independentes e concentrações testadas em triplicado, após 24 e 48 horas de incubação. * $p < 0,05$ vs tempo 48h.....34
- Figura 15 - Curvas concentração-resposta obtidas para a metilona (A) e 3,4-DMMC (B) na linha celular HK-2 através do ensaio da incorporação do corante vermelho neutro. Dados obtidos com um mínimo de três ensaios independentes e concentrações testadas em triplicado, após 24 e 48 horas de incubação. ** $p < 0,01$ vs tempo 48h.....34
- Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia invertida de contraste de fase representativas das alterações morfológicas nas células HK-2 expostas a cationas sintéticas (x400). As células HK-2 tratadas com metilona 4 mM por 24h (B), 3,4-DMMC 0,25 mM por 24h (C) e 3,4-DMMC 0,5 mM por 48h (D) exibem um maior número de vacúolos intracelulares (pontas das setas pretas) quando comparadas a células controlo (A)....
.....35
- Figura 17 - Imagens obtidas por microscopia de fluorescência com marcação com o laranja de acridina evidenciando a formação de vacúolos ácidos em células HK-2 controlo (A) e tratadas com 3,4-DMMC 0,5 mM (B) ou metilona 4 mM (C) por 24h (ampliação de 200x).....36
- Figura 18 - Efeito dos antioxidantes ácido ascórbico (AA; 0,5 mM) e N-acetilcisteína (NAC; 2 mM) na viabilidade das células HK-2 expostas à 3,4-DMMC (A e B, respetivamente) e metilona (C e D, respetivamente), após 24h de incubação. Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), de pelo menos quatro ensaios independentes, realizados em triplicado. **** $p < 0,0001$ vs. controlo. # $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$ 38

Figura 19 - Efeito dos inibidores autofágicos 3-metiladenina (3-MA; 1 mM) e wortmanina (Wort; 5 μ M) na viabilidade das células HK-2 expostas à 3,4-DMMC (A e B, respetivamente) e metilona (C e D, respetivamente), após 24h de incubação. Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), de pelo menos quatro ensaios independentes, realizados em triplicado. ****p<0,0001 vs. controlo. ###p<0,001, ####p<0,0001.....39

Figura 20 - Efeito dos inibidores apoptóticos Ac-LETD-CHO (100 μ M) e Z-VAD (100 μ M) na viabilidade das células HK-2 expostas à 3,4-DMMC (A e B, respetivamente) e metilona (C e D, respetivamente), após 24h de incubação. Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), de pelo menos quatro ensaios independentes, realizados em triplicado. ****p<0,0001 vs. controlo. ###p<0,001, ####p<0,0001....40

Índice de tabelas

Tabela 1 - Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas de 3,4-DMMC.....	27
Tabela 2- Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas de metilona.....	28
Tabela 3 - Valores de EC ₅₀ calculados a partir das curvas de concentração-resposta obtidas para a metilona e 3,4-DMMC, após 24 e 48 horas de exposição, nos ensaios do MTT e NR.....	35

Lista de abreviaturas

AA	Ácido ascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BCL-2	do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
CASP9	Caspase-9
COMT	Catecol <i>O</i> -Metiltransferase
CYP	Citocromo P450
DAT	Transportador da dopamina
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamina Tetracético
EMCDDA	do inglês <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro bovino fetal (do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
Flefedrona	<i>p</i> -Fluorometcatinona
GSH	Glutationa reduzida
HBSS	do inglês <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HK-2	do inglês <i>Human Kidney-2</i>
HPV-16	Papiloma Vírus Humano-16
LC3	do inglês <i>Light Chain 3</i>
MAO	Monoamina Oxidase
MBDP	N-metil-1,3-benzodioxolilpentanamina
MDA	Metilenodioxianfetamina
MDBP	N-metil-1,3-benzodioxolilpentanamina
MDEA	3,4-Metilenodioxietanfetamina
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina ou <i>ecstasy</i>
MDPBP	3,4-Metilenodioxi- α -pirrolidinobutirofenona
MDPPP	3,4-Metilenodioxi- α -pirrolidinopropiofenona
MDPV	Metilenodioxipirovalerona
MEPH	Mefedrona
METH	Metanfetamina
Metilona	3,4-Metilenodioximetcatinona

MOPPP	4-Metoxi- α -pirrolidinopropiofenona
MPBP	4-Metil- α -pirrolidino-butiropfenona
MPHP	4-Metil- α -pirrolidinohexanofenona
MPPP	4-Metil- α -pirrolidinopropiofenona
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
NET	Transportador da noradrenalina
NSP	Novas Substâncias Psicoativas
NR	do inglês <i>Neutral Red</i>
PBS	Solução tampão de fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered solution</i>)
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SERT	Transportador da serotonina
VMAT-2	Transportador Vesicular de Monoaminas 2
Wort	Wortmanina
α-PPP	α -Pirrolidinopropiofenona
α-PVP	α -Pirrolidinovalerofenona
3-MA	3-Metiladenina
3,4-DMMC	3,4-Dimetilmetcatinona
4-MEC	4-Metiletcatinona
5-HT	Serotonina

I. Enquadramento e objetivos da dissertação

O mercado das drogas cresceu exponencialmente em número e complexidade nas últimas décadas com a introdução contínua de novas substâncias psicoativas (NSP), também designadas por “drogas legais”. Este termo abrange substâncias psicotrópicas na sua forma natural ou obtidas por síntese que, aquando do seu surgimento, se encontravam fora do controlo das autoridades. Atualmente, muitas dessas substâncias já adquiriram um estatuto ilegal em vários países, contudo continuam facilmente acessíveis em sites da Internet (Arunotayanun and Gibbons, 2012; Coppola and Mondola, 2012; Prosser and Nelson, 2012).

Dentre as várias classes de NPS, destacam-se as catinonas sintéticas que ganharam notoriedade no contexto recreacional devido aos seus efeitos estimulantes semelhantes aos de anfetaminas clássicas (Coppola and Mondola, 2012; Prosser and Nelson, 2012). Foram produzidas inicialmente, no final dos anos 20 do século passado, para fins terapêuticos devido às suas propriedades antidepressivas e anorexígenas (Kelly, 2011). Contudo, os efeitos tóxicos associados levaram à sua inutilização médica e entrada no mercado das drogas recreativas em 2005, tendo a mefedrona recebido particular atenção pois foi a primeira a ser conhecida como “legal high” em vários países, antes de ser submetida às medidas de controlo europeu, em 2010 (EMCDDA, 2015a).

As catinonas sintéticas são vulgarmente conhecidas por “sais de banho”, uma vez que são vendidas como tal e ainda rotuladas como impróprias para consumo humano, de forma a evitar o controlo das autoridades na venda destas substâncias (Valente *et al.*, 2014). Surgiram então no mercado com os mais variados nomes, nomeadamente “Ivory Wave”, “White Lightning” e “Vanilla Sky”. Através de pequenas alterações na sua estrutura química são facilmente produzidos novos derivados da catinona, estando constantemente a surgir novas moléculas no mercado das drogas recreativas. Isto dificulta o controlo por parte das autoridades, sendo difícil a implementação de legislação sobre as mesmas (German *et al.*, 2014; McGraw and McGraw, 2012).

O uso dos análogos sintéticos da catinona tem vindo a crescer de forma exponencial nos últimos anos e, juntamente com a sua utilização, os casos de intoxicação, criando um importante desafio para a comunidade científica e para as autoridades (Spiller *et al.*, 2011).

Alguns estudos recentes demonstraram a toxicidade das catinonas sintéticas a nível hepático (Luethi *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2016) e neuronal (Valente *et al.*, 2017a; Valente *et al.*, 2017b). Contudo, não existem até ao momento estudos que avaliem o potencial tóxico destas substâncias a nível renal.

Este trabalho teve como objetivo estudar a nefrotoxicidade *in vitro* de duas catinonas sintéticas existentes no mercado, a metilona e a 3,4-DMMC. Para esse efeito, foi utilizada a linha celular imortalizada HK-2 (Human Kidney-2) proveniente do túbulo proximal humano.

Na primeira parte desta dissertação foi efetuada uma revisão bibliográfica sobre o estado da arte referente às catinonas sintéticas, incluindo a sua toxicocinética, toxicodinâmica, padrões de consumo, efeitos tóxicos e mecanismos associados. Para a recolha dessa informação, procedeu-se à pesquisa e análise de artigos científicos publicados no PubMed, Science Direct e B-on, desde Outubro de 2017 a Julho de 2018. As palavras-chave utilizadas ao longo da pesquisa foram: “Synthetic cathinones”, “Toxicity”, “HK-2 cells”, “Cell death”, “Antioxidants”, “Apoptosis” e “Autophagy”. Foi ainda recolhida informação em livros didáticos e websites governamentais através do monitor de busca “Google”.

Na segunda parte do trabalho apresentam-se os objetivos do trabalho experimental, os protocolos experimentais e o tratamento estatístico utilizado, bem como os resultados obtidos e respetiva discussão.

Por último, apresentam-se as conclusões finais do trabalho bem como todas as referências bibliográficas utilizadas na elaboração desta dissertação.

II. CATINONAS SINTÉTICAS

2.1. Perspetiva histórica

A planta *khat* (*Catha edulis*), originária do corno de África, possui um conjunto de alcaloides fenilalquilamina, as catinonas naturais. Descoberta por Peter Forskal, durante uma expedição entre 1761 e 1763, esta planta era usada pelos povos nativos de África devido aos seus efeitos psicoestimulantes (Valente *et al.*, 2014). Assim, os homens juntavam-se para as designadas “khat sessions” onde mastigavam as folhas frescas da planta. Esta prática causa um certo grau de euforia, que pode durar até três horas, e permanece até aos dias de hoje em algumas tribos de indígenas africanos, nomeadamente na zona do Congo, Uganda, Quênia, Zâmbia, Malawi e Tanzânia. As folhas frescas da planta contêm diversos compostos incluindo taninos, terpenóides, flavonóides, aminoácidos, esteróis e minerais. As folhas são apanhadas nas primeiras horas da manhã e vendidas embrulhadas em folha de bananeira para manter a frescura (Balint *et al.*, 2009; Coppola and Mondola, 2012).

A emigração dos povos para os EUA e Europa, bem como o aumento da distribuição e mercados levou à globalização da mastigação e utilização das folhas da planta, que durante muito tempo esteve confinada aos locais onde a planta crescia. Contudo, a mastigação da *khat* é pouco comum na Europa, verificando-se maioritariamente nos emigrantes provenientes das zonas africanas onde a planta tem origem. Isto deve-se ao facto da planta ter um tempo de vida curto, entre a colheita e o consumo. Para além disso, a mastigação é uma via de administração pouco efetiva e com um aparecimento demorado dos efeitos pretendidos (Feyissa and Kelly, 2008; Griffiths *et al.*, 2010).

O principal composto psicostimulante presente na planta *khat* é a catinona, um alcaloide natural a partir do qual foram sintetizadas, no século XX, as catinonas sintéticas, análogos da catinona (Coppola and Mondola, 2012). Substâncias como a bupropiona, pirovalerona e a metilona foram inicialmente sintetizadas com propósitos terapêuticos, como antidepressivos e anorexígenos. Contudo, os seus efeitos psicoativos levaram à utilização indevida destas substâncias no mercado das drogas recreativas (Markantonis *et al.*, 1986; Prosser and Nelson, 2012).

As catinonas sintéticas passaram então a ser consumidas como alternativas “legais” a drogas clássicas como as anfetaminas e a cocaína, tornando-se conhecidas como “legal highs”, uma vez que estas não estavam inicialmente sob o controlo das autoridades policiais. Desta forma, as catinonas sintéticas emergiram no mercado das drogas recreativas de forma crescente, representando juntamente com os canabinóides sintéticos mais de dois terços das NPS existentes no mercado (Karila *et al.*, 2015). Durante o ano de 2014, cerca de 31 catinonas sintéticas foram reportadas pela primeira vez, perfazendo assim um total de 77 catinonas, tornando-as o segundo maior grupo de substâncias monitorizadas pelo *European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction* (EMCDDA) (EMCDDA, 2015a). Segundo o Relatório Europeu sobre drogas de 2018, foram notificadas cerca de 71 000 apreensões de NSP, sendo que as catinonas sintéticas representaram 33% dessas apreensões. Estas substâncias representaram um total de quase 1,9 toneladas de droga apreendida, ou seja, este foi o grupo de drogas mais apreendidas em termos de quantidades em 2016 (EMCDDA, 2018).

Estas substâncias eram inicialmente adquiridas livremente em lojas especializadas (“smartshops”) e permanecem facilmente acessíveis em websites da Internet, com os mais diversos nomes, nomeadamente “Blue Silk”, “Charge +”, “Ivory Snow”, “Ivory Wave”, “Ocean Burst”, “Purple Wave” ou “Vanilla Sky” (Figura 1). De forma a escapar ao controlo das autoridades, as catinonas sintéticas são comercializadas sob a designação de “sais de banho” ou “fertilizantes para plantas” e rotuladas como impróprias para consumo humano (Fass *et al.*, 2012).



Figura 1. Exemplos de embalagens contendo catinonas sintéticas (Fonte: Google imagens - A [<https://clearminds.wordpress.com/2016/12/03/synthetic-drugs-part-2-bath-salts/>] e B [<http://allthingswildlyconsidered.blogspot.com/2011/06/bath-salts-outside-tub.html>])

2.2. Estrutura química

As catinonas sintéticas são derivados fenilalquilamina muito semelhantes às anfetaminas, sendo também designadas de β -ceto-anfetaminas. Tal designação deve-se ao facto das catinonas sintéticas possuírem um grupo ceto no carbono β da cadeia alquilamina ligado a um anel benzénico (Figura 2) (Coppola and Mondola, 2012). Os derivados da catinona possuem um centro quiral que se pode apresentar na forma de estereoisómero S ou R, com diferentes potências. Os derivados disponíveis no mercado negro são maioritariamente misturas racémicas, ao passo que a catinona natural presente na planta *khat* está na forma de enantiómero S. Relativamente à síntese da catinona e dos seus derivados, esta pode ser feita clandestinamente por oxidação de um precursor com uma substituição feniletanolamina, através da utilização de permanganato de potássio em ácido sulfúrico ou outro agente oxidante. De forma a obter uma melhor estabilidade, muitos destes compostos são vendidos sob a forma de sal (Katz *et al.*, 2014).

As diferentes estruturas químicas das catinonas sintéticas implicam diferentes lipofilias. Estas podem diferir no comprimento da cadeia substituinte no carbono alfa ou no azoto, influenciando assim a lipofilia da molécula, sendo este parâmetro tanto maior quanto maiores as cadeias de carbono adicionadas. A lipofilia está relacionada com a capacidade da molécula atravessar a Barreira Hemato-Encefálica (BHE), ou seja, os compostos mais lipofílicos, nomeadamente a 3,4-metilenodioxipirovalerona (MDPV) e a 3,4-metilenodioxo- α -pirrolidinopropiofenona (MDPPP), têm maior capacidade para atravessar essa mesma barreira, o que se traduz numa maior potência. Para além disso, a MDPV possui na sua estrutura química um átomo de azoto ligado a 3 carbonos formando uma amina terciária, responsável pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos (Banks *et al.*, 2014; Coppola and Mondola, 2012).

A partir da estrutura base, as catinonas podem ter diversos substituintes, podendo assim ser divididas em quatro famílias.

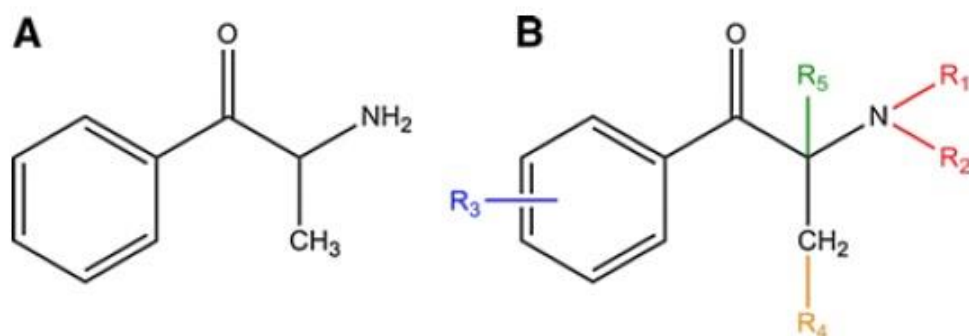


Figura 2. Estrutura química da catinona (A) e estrutura base das catinonas sintéticas (B) (adaptado de (Valente *et al.*, 2014)).

O primeiro grupo é o das **catinonas N-alquiladas** e inclui compostos que foram primeiramente sintetizados para fins medicinais, como é o caso da dietilpropiona e dimetilpropiona, com propriedades anorexígenas e a bupropiona, possuindo um grupo N-t-butil e um cloro na posição 3 do anel, como antidepressivo. A N-alkilação pode ocorrer na posição R₁, R₂, R₃, R₄, formando as diferentes catinonas pertencentes a esta família, nomeadamente a etcatinona, efedrona, mefedrona, flefedrona, bufedrona, 4-metiletcatinona (4-MEC), pentedrona e 3,4-dimetilmetcatinona (3,4-DMMC), que foram introduzidas no mercado das drogas recreativas (Figura 3) (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014).

A partir da adição de um grupo 3,4-metilenodioxo no anel benzénico, surge a família das **catinonas 3,4-metilenodioxo-N-alquiladas**. A metilação na posição R₁ produz a metilona, ao passo que, se esta substituição ocorrer em R₄ obtém-se a pentilona, ambas pertencentes a este grupo. Para além destes compostos, também a etilona e a butilona pertencem a esta família, que é estruturalmente semelhante às 3,4-metilenodioxianfetaminas, como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), a 3,4-metilenodioxietanfetamina (MDEA), a N-metil-1,3-benzodioxolilbutanamina (MBDB) e a N-metil-1,3-benzodioxolipentanamina (MBDP) (Figura 4).

Avaliação *in vitro* do efeito de antioxidantes e inibidores da apoptose/autofagia na nefrotoxicidade induzida por cationas sintéticas

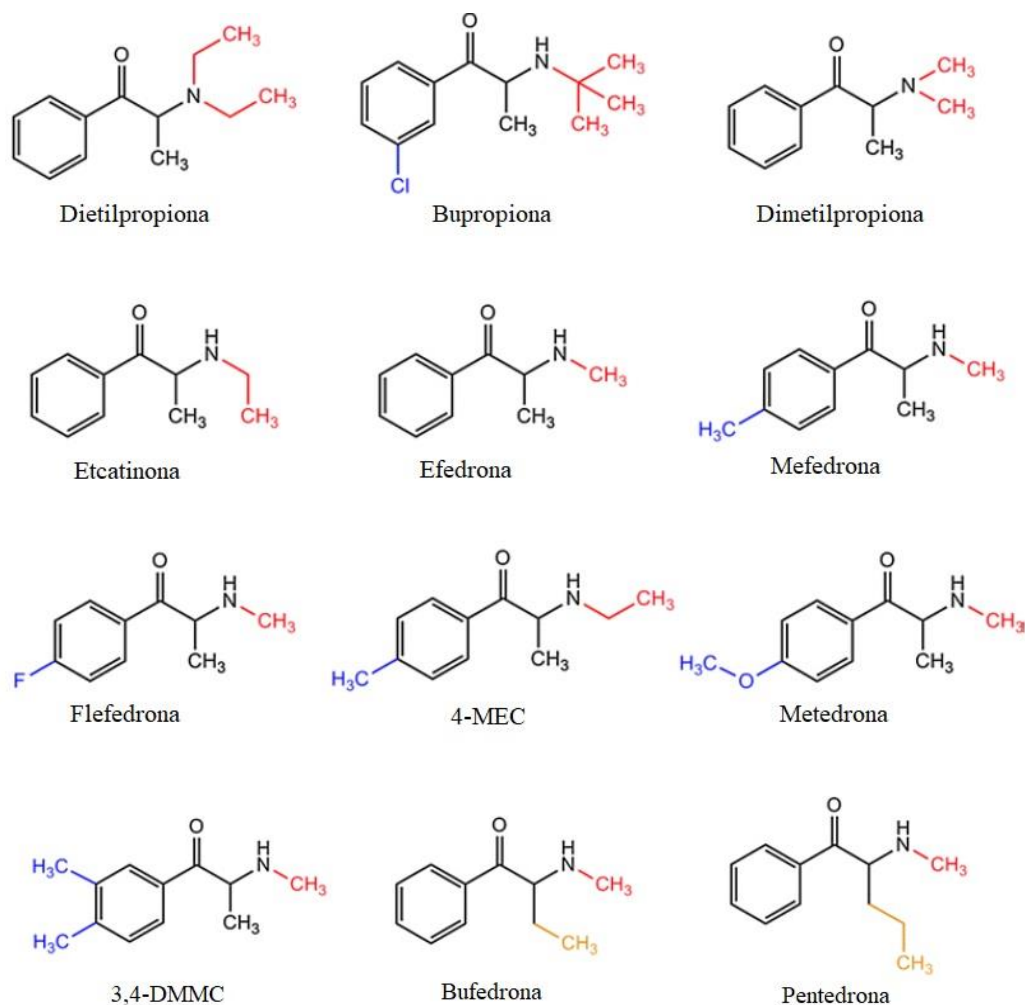


Figura 3. Estrutura química dos derivados pertencentes à família das cationas N-alkuíladas (adaptado de (Valente *et al.*, 2014)).

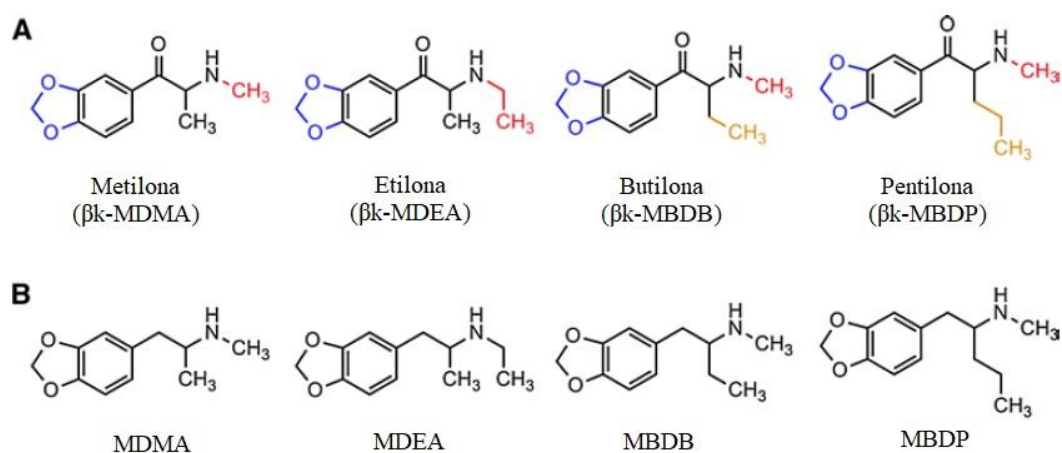


Figura 4. Estrutura química das cationas pertencentes à família das cationas 3,4-metilenodioxí-N-alkuíladas (A) e respetivos análogos não β-ceto (adaptado de (Valente *et al.*, 2014)).

A terceira família apresenta uma substituição pirrolidinil no átomo de azoto, sendo designadas de **cationas pirrolidinofenonas**. As substituições mais comuns nesta família são uma cadeia lateral metilo, etilo ou propilo no carbono α (Zaitso *et al.*, 2009). Nesta família podemos encontrar moléculas como a α -pirrolidinopropiofenona (α -PPP), o 4-metil- α -pirrolidinopropiofenona (MPPP) (que resulta da metilação do anel benzênico da α -PPP), o 4-metil- α -pirrolidinobutiropfenona (MPBP), a pirovalerona e o 4-metil- α -pirrolidinohexanofenona (MPHP) (Figura 5).

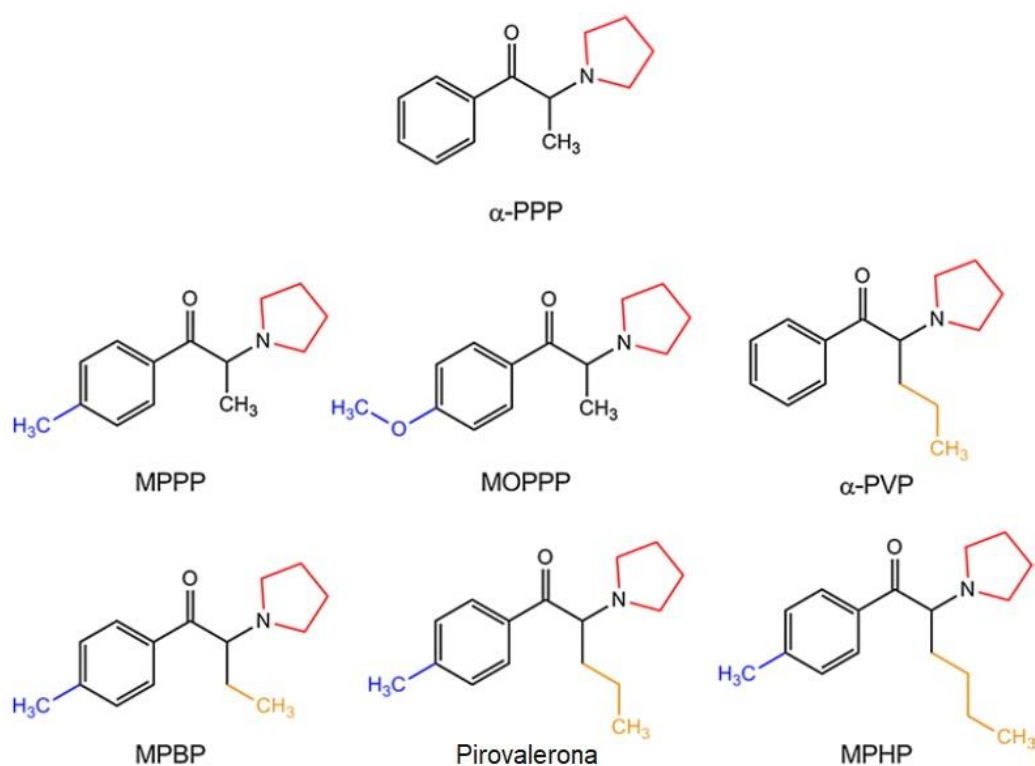


Figura 5. Estrutura química de alguns derivados pertencentes à família das cationas N-pirrolidinas (adaptado de (Valente *et al.*, 2014).

A partir da combinação da segunda e terceira família, obtemos a família das **cationas 3,4-metilenodioxi-N-pirrolidina** (Figura 6). Este grupo apresenta as substituições presentes na família das cationas 3,4-metilenodioxi e da família N-pirrolidina e inclui a MDPPP, 3,4-metilenodioxi- α -pirrolidinobutiropfenona (MDPBP) e a MDPV.

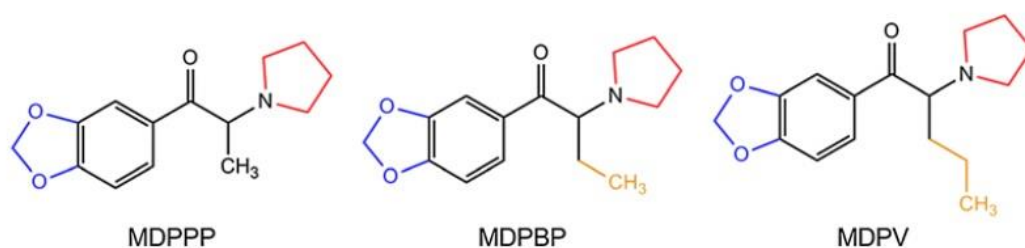


Figura 6. Estrutura química de alguns derivados pertencentes à família das catinonas 3,4-metilenodioxo *N*-pirrolidinas (adaptado de (Valente *et al.*, 2014).

Existe ainda a nafirona (Figura 7), que não se insere em nenhum dos outros grupos. Esta molécula apresenta um anel naftilo, que nunca se verificou em nenhuma outra catinona até à data, e pode apresentar-se na forma de isómeros α e β -nafirona (Valente *et al.*, 2014).

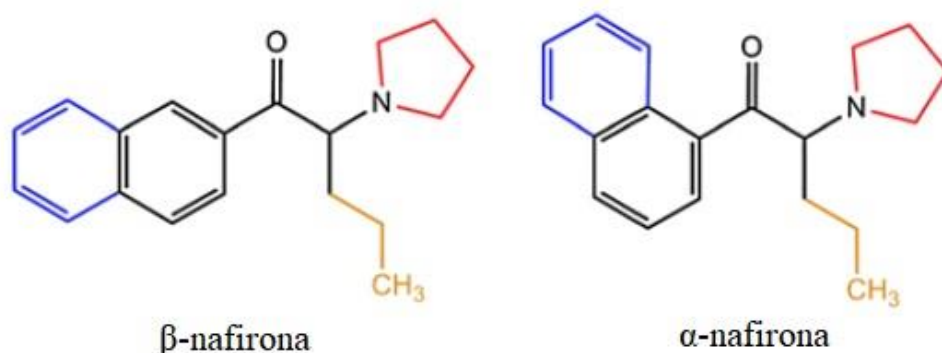


Figura 7. Estrutura química da α e β -nafirona (adaptado de (Valente *et al.*, 2014).

2.3. Propriedades e padrões de utilização das catinonas sintéticas

As catinonas sintéticas encontram-se normalmente sob a forma de pó amorfo ou cristalino e de cor branca ou acastanhada (Coppola and Mondola, 2012). Estas são normalmente transportadas sob a forma de pó para os distribuidores, onde podem ser transformadas em comprimidos ou cápsulas para posterior venda (German *et al.*, 2014).

A metilona foi primeiramente reportada em 2004, sendo vendida como um ambientador de baunilha, na forma de uma solução líquida (Karila *et al.*, 2015). Por sua vez, a mefedrona apresenta-se na forma de sal e é vendida em misturas racémicas contendo o estereoisómero S e R. Relativamente a este composto, os utilizadores descrevem um odor

característico semelhante a uma mistura de cloro, baunilha e urina, tal como é descrito para a MDPV, quando exposta ao ar (Valente *et al.*, 2014).

As vias de administração mais comuns são a insuflação nasal e a ingestão. Atribui-se o nome de “bombing” ao método em que o composto na forma de pó é enrolado em papel de cigarro e ingerido. Para a utilização nasal ou “snorting”, existe o “keying” que consiste em mergulhar uma chave no pó e inalá-lo. Apesar de menos comuns, a administração retal, gengival, inalatória e intravenosa ou intramuscular também já foram descritas. O “eyeballing” é outra técnica também reportada, onde as catinonas são inseridas no olho (Karila *et al.*, 2015; Prosser and Nelson, 2012).

Para as folhas de *khat*, a via oral é a mais comumente utilizada, através da mastigação das folhas ou da preparação de infusões. Para se obterem efeitos estimulantes, a dose de folhas varia normalmente de 100 a 500 g. Comparativamente aos compostos sintéticos utilizados, a dose de folhas tem de ser muito superior de forma a obter os efeitos pretendidos, devido à baixa quantidade de alcaloides psicostimulantes na planta.

Para as catinonas sintéticas, as doses utilizadas podem variar entre algumas mg e 1 g, não havendo conhecimento, por parte dos utilizadores, da pureza do pó que estão a administrar. Em alguns casos ocorre também a utilização concomitante de várias drogas, nomeadamente das catinonas sintéticas com álcool ou canábis de forma a potenciar os efeitos pretendidos ou para contrariar os efeitos indesejáveis como a fadiga, dores e amnésia (Kelly, 2011; Prosser and Nelson, 2012). Para a mefedrona, a via mais comum é a insuflação nasal. Para este composto, a dose pode variar entre 15 a 250 mg na ingestão e 5 a 125 mg para a insuflação, chegando a ser consumido em sessões contínuas com 100 a 200 mg a serem administradas por hora, ao que se dá o nome de “stacking”. Relativamente ao tempo de duração dos efeitos, estes mantêm-se durante 1 a 2 horas, com início 10 a 20 minutos após a inalação. Por outro lado, na ingestão, apesar dos efeitos aparecerem apenas ao fim de 45 minutos, estes podem durar até cerca de 5 horas. A via na qual os efeitos surgem mais rápido (após 10 minutos) é a intravenosa, durando apenas 30 minutos. Numa só sessão, é frequente os consumidores recorrerem a diferentes vias de administração para obter efeitos mais rápidos e duradouros (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014). A injeção das catinonas pode acarretar diversos efeitos desagradáveis, nomeadamente a sensação de queimadura no local da injeção, podendo estes efeitos agravar-se com a repetição das injeções, surgindo a erosão da pele, infeção localizada,

bolhas, abscessos, tecido gangrenado, coágulos sanguíneos, dormência permanente e espasmos (EMCDDA, 2015b).

Na administração intramuscular utilizam-se normalmente doses de 10 a 50 mg. Contudo, em indivíduos que já desenvolveram tolerância aos efeitos psicostimulantes, podem atingir doses de 100 mg (Chavant *et al.*, 2015).

O desconforto nasal é um dos fatores que leva os utilizadores a optarem pela via oral, ou até mesmo retal, intramuscular ou intravenosa, como alternativa à via inalatória. Uma vez que as catinonas sintéticas são solúveis em água são muitas vezes dissolvidas em bebidas e posteriormente ingeridas (German *et al.*, 2014).

No consumo de MDPV, é recorrente a repetição da dose. Apesar desta droga ter a capacidade de proporcionar efeitos estimulantes com apenas 5 mg, a dose pode variar entre 5 e 20 mg. Alguns consumidores relataram o aparecimento de efeitos indesejáveis de “come down” com doses superiores a 15 mg, contudo, já foram também reportadas doses de 200 mg (Psychonaut Web Mapping, 2009). A potência de efeitos para este composto é semelhante para as duas principais vias, oral e nasal, e ocorrem cerca de 30 minutos após o consumo, sendo a duração para a via nasal e oral de 2 a 3,5 horas e 7 a 8 horas, respetivamente. A metilona foi inicialmente vendida em tubos contendo 5 ml e as doses administradas variavam entre as 100 e 300 mg, sendo as doses consideradas pesadas a partir dos 250 mg. Ao fim de 15-20 minutos iniciam-se os efeitos que se prolongam durante 3 horas, podendo alguns deles ser sentidos durante 24 horas (Valente *et al.*, 2014).

2.4. Farmacocinética

A concentração de catinona presente na planta *khat* é aproximadamente 78 a 343 mg por 100 g da planta fresca. Os seus efeitos psicostimulantes aparecem cerca de meia hora após a mastigação, perdurando por um período de três horas (Valente *et al.*, 2014).

Quando a planta é mastigada, há a deglutição dos sucos, ocorrendo a absorção em duas fases distintas: a primeira, a nível da mucosa oral, e a segunda no estômago e intestino delgado. Segundo Toennes (2003), durante a mastigação a maioria dos alcaloides da planta são extraídos através da saliva, uma vez que os ensaios *in vivo* demonstraram que apenas 10% da quantidade inicial dos mesmos foi encontrada nos resíduos da folha após

a sua mastigação. A cavidade oral é então exposta a uma alta concentração de alcaloides, assumindo um papel relevante na absorção destes, enquanto que o estômago/intestino delgado recebem o suco das folhas que é deglutido (Feyissa and Kelly, 2008; Toennes *et al.*, 2003).

Estudos indicam que a concentração plasmática de catinona é dependente da dose ingerida, ao contrário do tempo para atingir o pico de concentração, que se verificou ser independente da quantidade consumida (Valente *et al.*, 2014).

Após absorção e metabolização da catinona, menos de 7% da quantidade administrada aparece inalterada na urina, sendo a maioria eliminada na forma de metabolitos, a catina e norefedrina (Feyissa and Kelly, 2008). Assim, a quantidade de norefedrina excretada na urina é superior à ingerida, uma vez que a primeira surge da combinação da norefedrina ingerida a partir da planta com a que resulta do metabolismo da catinona (Toennes and Kauert, 2002).

Relativamente aos derivados sintéticos da catinona, a dose administrada varia consoante o composto em questão, a sua potência e efeitos, e, ainda, a via de administração (Valente *et al.*, 2014). As catinonas sintéticas têm uma capacidade diminuída para atravessar a BHE, uma vez que estas possuem um grupo β -ceto que confere um aumento da sua polaridade. Em comparação com as anfetaminas, existe a necessidade de utilizar doses mais elevadas das catinonas sintéticas para obter efeitos com potência semelhante, uma vez que as primeiras têm maior capacidade para atravessar a BHE devido à ausência do grupo β -ceto (Kelly, 2011).

Numa só sessão de *khat* é frequente a utilização de mais do que uma via de administração para se atingir os efeitos pretendidos mais rapidamente e de forma duradoura. As principais vias utilizadas são a via oral e intranasal, apresentando um início de ação semelhante, que ocorre ao fim de 15-30 minutos (Karila and Reynaud, 2011).

Após serem absorvidas, a catinona sofre reações metabólicas de fase I, onde ocorre a redução do grupo β -ceto, que é transformado em álcool, através da ação das enzimas microsossomais hepáticas, formando-se desta forma a catina e a norefedrina (Figura 8). A catinona apresenta dois estereoisómeros, a S-catinona e a R-catinona, que sofrem metabolismo estereoseletivo transformando-se em norefedrina e catina, respetivamente (Valente *et al.*, 2014).

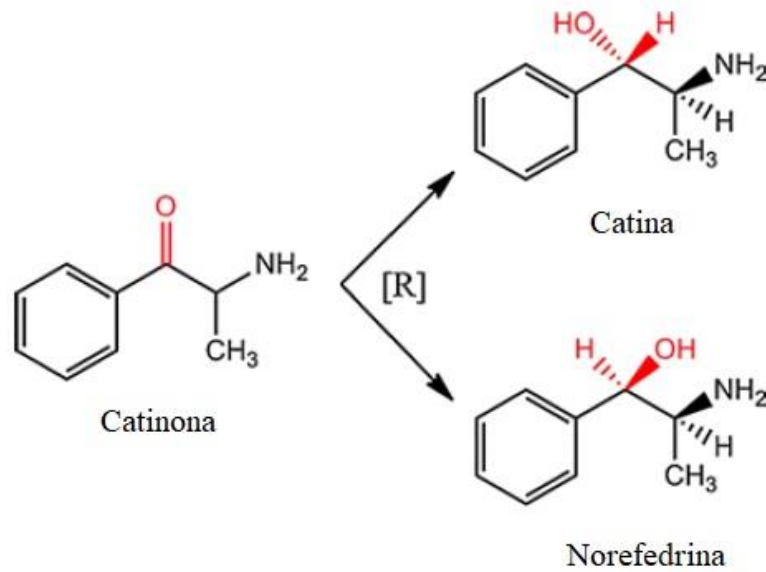
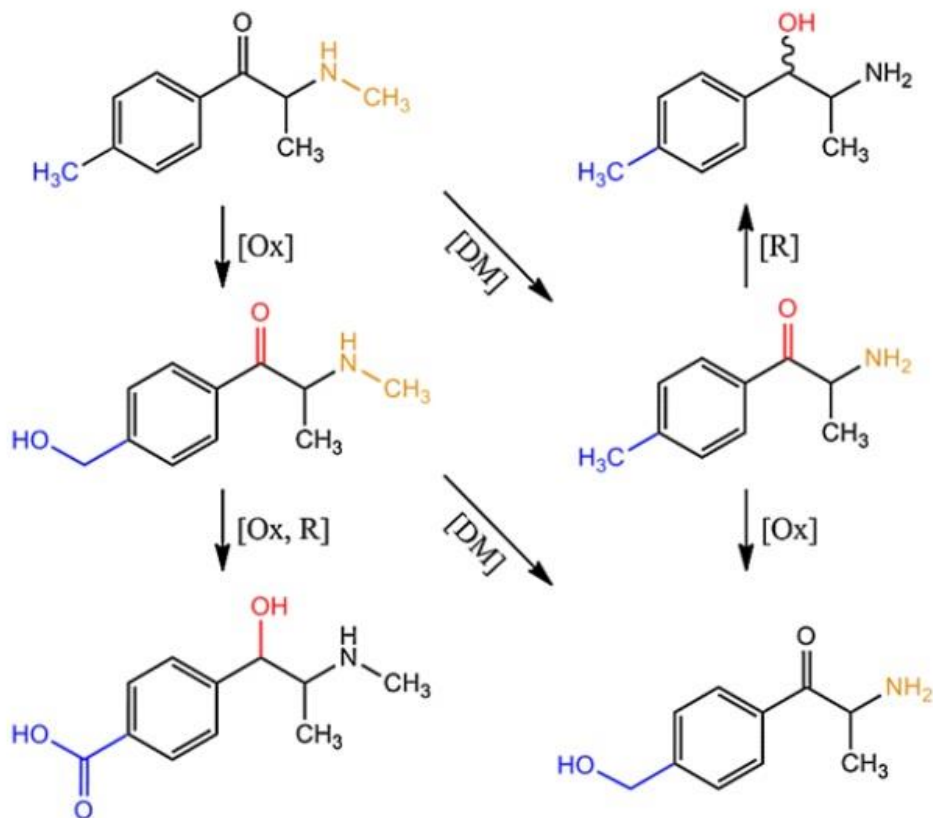


Figura 8. Metabolismo da catinona em catina e norefedrina (adaptado de (Valente *et al.*, 2014).

Na família das catinonas N-alkiladas, nomeadamente para a mefedrona, o metabolismo pode ocorrer por diferentes vias (Figura 9). Este composto sintético pode sofrer uma N-desmetilação da amina primária, cujo metabolito resultante pode ser oxidado ou reduzido. Por outro lado, pode ocorrer a oxidação do grupo metilo presente no anel aromático, produzindo-se um álcool que, posteriormente, pode ser oxidado a ácido carboxílico e reduzido no grupo β -ceto. Os metabolitos de fase I podem ser submetidos a reações de fase II, sendo conjugados com o ácido glucurónico ou ião sulfonato e, posteriormente, excretados na urina (Coppola and Mondola, 2012; Debruyne *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Pedersen *et al* (2013) concluiu que a CYP2D6 é a principal isoenzima do citocromo P450 responsável pelo metabolismo de fase I da mefedrona (Pedersen *et al.*, 2013). Ainda dentro desta família de catinonas, encontra-se a flefedrona, que apresenta um metabolismo mais lento comparativamente às restantes catinonas. Isto deve-se ao facto desta apresentar uma ligação C-F, o que a torna mais resistente à hidrólise enzimática, originando compostos mais estáveis (Valente *et al.*, 2014). O seu metabolismo de fase I inclui a hidroxilação do anel fenilo, a redução da porção β -ceto e N-desmetilação, sendo esta última mediada pelo CYP2B6. Contudo, estudos *in vitro* concluíram que as isoenzimas 2D6, 2C19, 2E1 e 3A4 são também capazes de catalisar essa reação. Neste caso ocorrem reações de fase II, isto é, conjugação com ácido

glucurônico e ião sulfonato dos metabolitos obtidos na β -ceto redução (Meyer *et al.*, 2012).

Fase I



Fase II

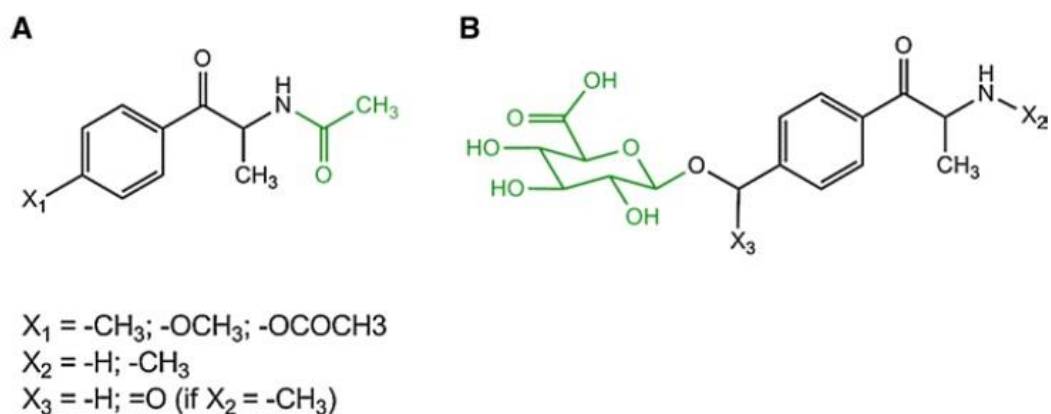


Figura 9. Metabolismo de fase I da mefedrona e metabolitos de fase II. [R] redução; [DM] N-desmetilação; [Ox] oxidação (adaptado de (Valente *et al.*, 2014).

O metabolismo das catinonas 3,4-metilenodiox-N-alkiladas pode ocorrer de três formas distintas, tal como apresentado na Figura 10: i) desmetilação, seguida de *O*-metilação,

mediada pela catecol-*O*-metiltransferase (COMT); ii) *N*-desalquilação, que constitui uma via minoritária; e iii) a redução da porção β -ceto. Os metabólitos hidroxilados resultantes da desmetilação e *N*-desalquilação têm maior probabilidade de sofrer reações de fase II, nomeadamente glucuronidação e sulfonação. Os conjugados resultantes dessas reações são excretados por via urinária juntamente com a fração de droga não metabolizada (Coppola and Mondola, 2012; Prosser and Nelson, 2012).

X₁ = -CH₃, X₂ = H, Metilona

X₁ = -C₂H₅, X₂ = H, Etilona

X₁ = -CH₃, X₂ = CH₃ Butilona

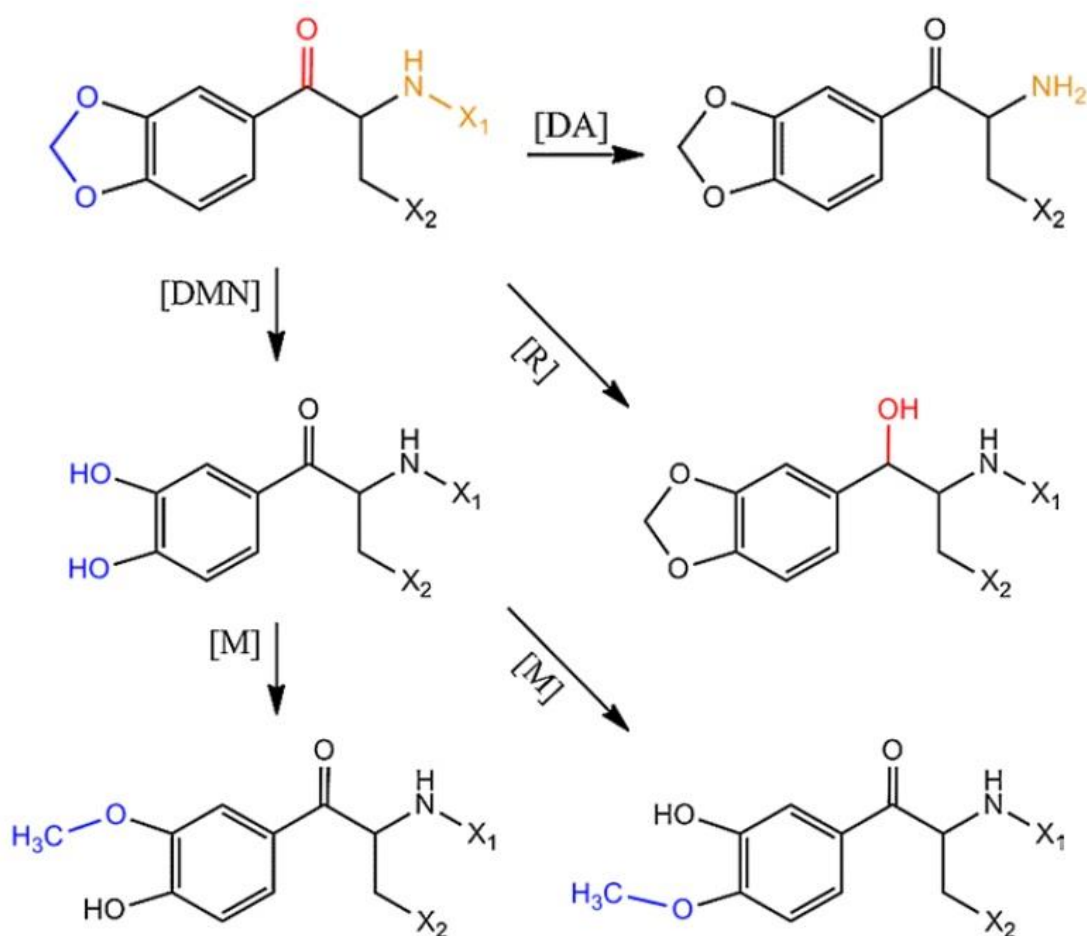


Figura 10. Metabolismo de fase I das catinonas 3,4-metilenodioxiladas, sendo que o [R] representa uma redução, [DA] uma *N*-desalquilação, o [DMN] corresponde à desmetilação e o [M] uma *O*-metilação (adaptado de (Valente *et al.*, 2014).

Para os derivados *N*-pirrolidina, nomeadamente a MDPV e a α -pirrolidinovalerofenona (α -PVP), podem-se verificar vias metabólicas comuns, ocorrendo a conversão do grupo cetona da amina em álcool (Figura 11). Relativamente à MDPV, a abertura do anel

metilenodioxí seguida de desmetilação, produz um catecol e o metoxicatecol pirovalerona, sendo estes os principais metabolitos deste composto. Estes são posteriormente excretados na urina, após serem submetidos à conjugação com o ácido glucurónico ou ião sulfonato. Tanto a MDPV como a α -PVP produzem aminas primárias após a degradação do grupo pirrolidina (Prosser and Nelson, 2012; Valente *et al.*, 2014). Por outro lado, existe também a possibilidade de hidroxilação do anel pirrolidina na posição 2', seguida de desidrogenação, originando, primeiramente, uma cetona e seguidamente um anel lactâmico. Este anel pode ainda abrir formando o respetivo aldeído alifático, sendo que a sua posterior oxidação forma um ácido carboxílico. Os metabolitos que possuem um grupo hidroxilo, estão mais sujeitos às reações metabólicas de fase II (Meyer *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2014). Segundo Springer *et al* (2005), a MDPPP tem também como principal via de metabolização uma desmetilação, catalisada principalmente pela CYP2D6, dando origem ao di-OH-PPP (Springer *et al.*, 2005).

X₁ = -H, α -PVP

X₁ = -3,4-metilenodioxio, MDPV

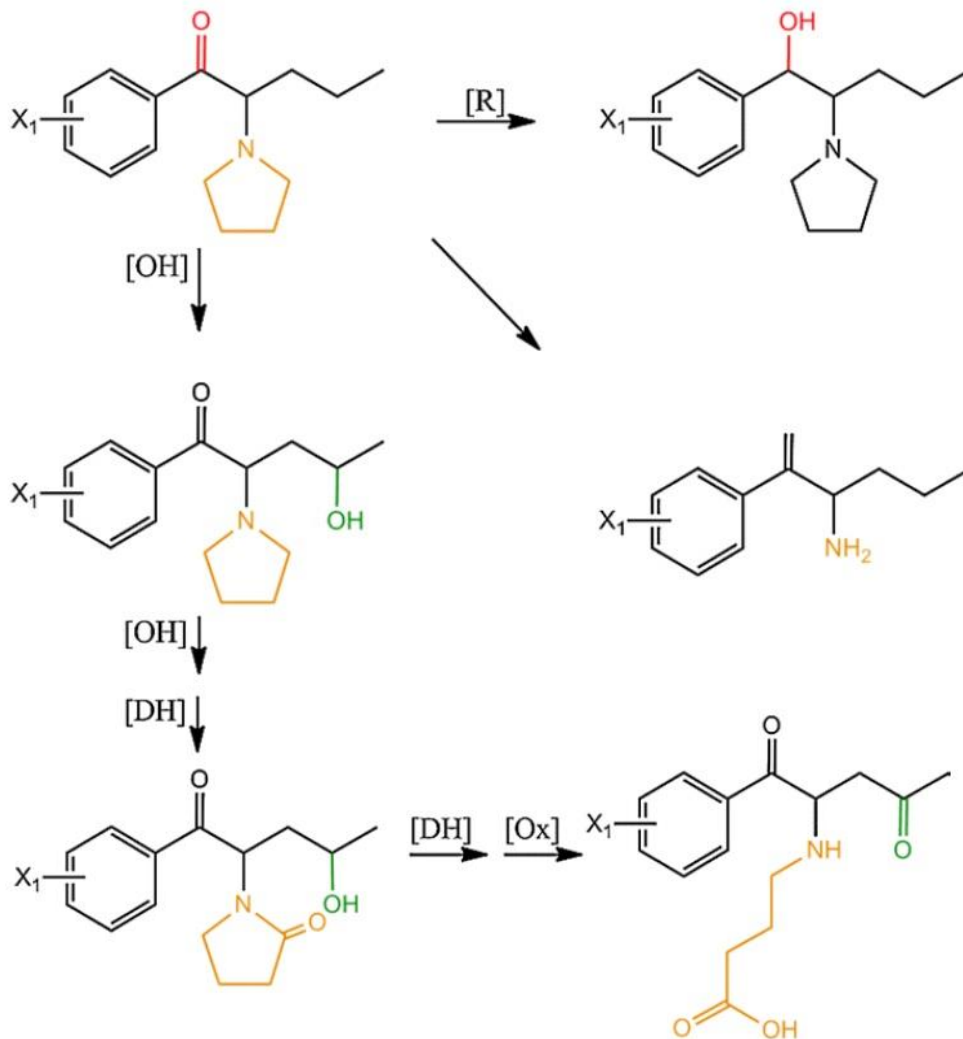


Figura 11. Metabolismo de fase I dos derivados pirrolidina, sendo que o [R] representa uma redução; [OH] hidroxilação; [DH] desidrogenação; [Ox] oxidação (adaptado de (Valente *et al.*, 2014).

2.5. Farmacodinâmica

As catinonas diferem das anfetaminas apenas pela presença de um grupo cetona na posição β , o que torna expectável que esta semelhança estrutural se traduza em efeitos semelhantes (Simmler *et al.*, 2013). A catinona, catina e norefedrina presentes nas folhas da planta *khat* são capazes de induzir a libertação de noradrenalina no sistema nervoso central, sendo a catinona o alcaloide mais potente. Tal como as anfetaminas, a catinona apresenta propriedades estimulantes e efeitos simpaticomiméticos. Além disso, à semelhança das anfetaminas, a presença do grupo metilo na posição α da cadeia feniletilamina previne a inativação da catinona, catina e norefedrina pela monoamina

oxidase (MAO). A catinona exibe maior capacidade de inibição sobre esta enzima que as anfetaminas, sendo mais seletiva para a isoenzima MAO-B. Esta forma da MAO é a responsável pela degradação da dopamina, logo a sua inibição leva a um aumento da disponibilidade da dopamina a nível sináptico (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014).

As catinonas sintéticas exercem o seu efeito através da interação com os transportadores da membrana plasmática, nomeadamente o da dopamina (DAT), o da noradrenalina (NET) e o da serotonina (SERT), tendo como consequência o aumento destas aminas na fenda sináptica (Valente *et al.*, 2014). Segundo (Kelly, 2011), a metcatinona e a metilona demonstraram uma inibição do transportador da dopamina semelhante à metanfetamina e MDMA. A primeira mostrou ainda ter a capacidade de aumentar a dopamina extracelular de forma dependente da dose.

As drogas podem ser classificadas como substratos ou então podem funcionar como bloqueadores aquando da interação com os transportadores de membrana. Assim, quando a droga leva à interrupção do armazenamento vesicular e estimula a libertação dos neurotransmissores, através da alteração do fluxo normal, atuam como substratos, como é o caso das anfetaminas. Por outro lado, a droga exerce um efeito bloqueador quando inibe a recaptação do neurotransmissor da fenda sináptica, como a cocaína (Valente *et al.*, 2014).

A efedrona e a fefedrona são duas drogas com ação inibidora da captação da noradrenalina e dopamina, tendo ainda a capacidade de aumentar a libertação da dopamina. Estudos *in vitro* demonstraram que todas as catinonas tem capacidade de atravessar eficientemente a BHE (Simmler *et al.*, 2013).

A afinidade que as drogas têm para determinados transportadores está associada a alguns dos efeitos que estas exercem. Por exemplo, a afinidade para o SERT tem sido associada a paranoia e alucinações, enquanto que a afinidade para o NET está relacionada com os efeitos simpaticomiméticos das catinonas, estando os efeitos psicostimulantes e o potencial aditivo relacionados com a capacidade destas de inibir o DAT. O facto destas drogas provocarem uma depleção da serotonina e dopamina leva a sintomas de depressão e anedonia (Valente *et al.*, 2014).

Assim, as catinonas sintéticas apresentam dois mecanismos de ação principais, nomeadamente a inibição da recaptação das monoaminas, diminuindo desta forma a

eliminação dos neurotransmissores da fenda sináptica e a libertação dos neurotransmissores das suas reservas intracelulares, as vesículas sinápticas. Esta maior libertação vesicular ocorre devido a alterações no pH das mesmas e ainda pela inibição do transportador vesicular de monoaminas (VMAT2). Este transportador encontra-se na membrana vesicular e realiza o transporte das monoaminas para o interior das vesículas, ou seja, a sua inibição leva a uma acumulação dos neurotransmissores a nível do citoplasma celular (Prosser and Nelson, 2012).

O facto dos farmacóforos das monoaminas endógenas, dos análogos das anfetaminas e das catinonas sintéticas serem iguais, permite fazer previsões relativamente à atividade destes compostos. Por exemplo, a ciclização da cadeia alifática da amina terminal tem como efeito a diminuição da libertação de neurotransmissores, mas não provoca alterações a nível da capacidade da droga para inibir a recaptação dos mesmos. Assim, pequenas modificações na estrutura química, podem levar a alterações significativas na seletividade dos compostos para atuarem a nível dos transportadores (Banks *et al.*, 2014).

A metilona é tão potente como a metanfetamina e MDMA na inibição não seletiva da recaptação das monoaminas. Mais ainda, esta droga tem a capacidade de induzir o transporte inverso dos neurotransmissores (Sogawa *et al.*, 2011). Estudos demonstraram ainda que a mefedrona, etilona, butilona e nafirona são inibidores não seletivos dos transportadores das catecolaminas e, excetuando a nafirona, promovem a libertação de serotonina. Já a MDPV comporta-se como bloqueador seletivo dos transportadores das monoaminas, apresentando maior potência para o DAT e SERT (Valente *et al.*, 2014).

Desta forma, com base na capacidade das catinonas atuarem como substratos ou inibirem os diferentes transportadores das monoaminas, estas podem ser divididas em três grupos: o primeiro grupo inclui a mefedrona, metilona, etilona, butilona e nafirona, que são, então, inibidores não seletivos da recaptação das monoaminas, tal como a cocaína, sendo que todas elas, à exceção da nafirona, levam à libertação de serotonina; o segundo grupo é composto pela catinona, metcatinona e fiefedrona, que são designadas por catinonas “methamphetamine like”, com capacidade de inibir a recaptação das catecolaminas e potenciar a libertação apenas de dopamina; e o último grupo, onde se inserem os derivados pirovalerona, que se comportam como inibidores seletivos da recaptação de catecolaminas mas não atuam como substratos para a sua libertação (Simmler *et al.*, 2013).

2.6. Efeitos tóxicos

As catinonas sintéticas são consumidas com a finalidade de se obter efeitos estimulantes semelhantes aos da cocaína e anfetaminas, como o aumento da empatia, libido, energia e sociabilidade (Coppola and Mondola, 2012). Contudo, estes efeitos podem ser acompanhados de alguns sintomas indesejados, podendo afetar os vários sistemas, nomeadamente cardiovascular, gastrointestinal, respiratório, neurológico, musculoesquelético e oftálmico (Prosser and Nelson, 2012).

Os sintomas decorrentes da utilização destas drogas podem ter diferentes intensidades consoante a dose e o tipo de catinona consumida, a via de administração e as características de cada indivíduo. É relativamente frequente o aparecimento de sintomas desagradáveis como a agitação, confusão, insónias, anedonia, perda de memória a curto prazo, dor de cabeça, bem como tolerância e dependência. Para além disso, a utilização de catinonas sintéticas ocorre muitas vezes em simultâneo com outras substâncias como o álcool, cocaína e MDMA, potenciando assim o aparecimento desses efeitos (Valente *et al.*, 2014).

Foram já reportados vários casos de intoxicação aguda por catinonas sintéticas. Normalmente, os indivíduos intoxicados apresentam sintomas bastante diversos. Estes podem-se dividir em sintomas:

- i) cardiovasculares- taquicardia, dor no peito, hipertermia, hipertensão, alterações do segmento ST e enfarte do miocárdio;
- ii) gastrointestinais- vômitos, náuseas, dor abdominal e falência hepática;
- iii) renais- hiponatremia, hipercalemia, hiperuricemia, aumento da creatinina sérica, lesão renal e insuficiência renal aguda;
- iv) pulmonares- taquipneia, acidose respiratória e falência pulmonar;
- v) do sistema hematológico- coagulação intravascular, anemia e trombocitopenia;
- vi) do sistema nervoso central – insónia, tonturas, dor de cabeça, confusão, temores, convulsões distonia e parestesia;
- vii) do sistema oftálmico – visão turva e midríase;
- viii) e, para além destes, os indivíduos podem apresentar hipertermia, edema cerebral, rash cutâneo, dores ósseas e consequências específicas da

administração intravenosa como infecção local, coágulos sanguíneos, obstrução das veias e abscessos. Os casos mais graves podem culminar em falência multiorgânica e morte (Coppola and Mondola, 2012; German *et al.*, 2014; Karila *et al.*, 2015).

No caso das intoxicações por mefedrona, os doentes apresentaram vasoconstrição nas extremidades, rash cutâneo, despigmentação da pele e bruxismo (Coppola and Mondola, 2012). Por outro lado, os consumidores de MDPV apresentam maior propensão a comportamentos bizarros e alucinações suicidas e os dados existentes indicam que, na Finlândia e Reino Unido, a MDPV foi detetada em 107 intoxicações não fatais e em 99 mortes. Em doses normais (100 a 200 mg), a metilona leva a efeitos de euforia, alerta e aumento de empatia, contudo, os casos de intoxicação associados a esta catinona ocorrem maioritariamente quando há o consumo simultâneo de outras drogas ilícitas (Karila *et al.*, 2015).

Relativamente aos mecanismos subjacentes à toxicidade das catinonas sintéticas, foram já realizados alguns estudos em células hepáticas e neuronais. Valente *et al* (2017a) utilizou um modelo humano de neurónios dopaminérgicos, as células SH-SY5Y, de forma a avaliar o envolvimento da autofagia na neurotoxicidade provocada pela metilona e MDPV. Os resultados mostraram um aumento da vacuolização citoplasmática após exposição às drogas, sugerindo a presença de autofagia. Para além disso, resultados de fluorescência mostraram que os dois compostos testados induzem a formação de vesículas acídicas, havendo ainda o aumento da proteína LC3-II, associada a uma maior formação de autofagossomas. Mais ainda, foi verificado que o antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC) reverteu a produção de espécies reativas e diminuiu a expressão da LC3-II, diminuindo consequentemente a formação de autofagossomas (Valente *et al.*, 2017a). Também em termos de neurotoxicidade das β -cetoanfetaminas, a metilona e a MDPV mostraram induzir a formação de espécies reativas, de forma dependente da concentração, tendo a apoptose sido também um dos mecanismos associados à toxicidade neuronal destas drogas, por ativação da caspase-8 (Valente *et al.*, 2017b).

Também Rosa-Hernandez *et al* (2016) evidenciou num estudo em células endoteliais de cérebro de bovino que a MDPV aumenta a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Rosas-Hernandez *et al.*, 2016).

Um outro estudo conduzido por Valente *et al* (2016) usando a linha celular humana HepaRG e hepatócitos de rato em cultura primária revelou que as catinonas provocaram um aumento na produção de ROS e de espécies reativas de azoto (RNS), havendo uma diminuição parcial da morte celular na presença da NAC e do ácido ascórbico (AA). Ao utilizar um inibidor das caspases 8 e 9, o Ac-LETD-CHO, concluíram que a apoptose é um dos mecanismos inerentes à hepatotoxicidade das catinonas sintéticas, nomeadamente da metilona, 4-MEC, MDPV e pentedrona uma vez que a presença deste inibiu significativamente a morte causada por estes compostos. Assim, puderam concluir que a hepatotoxicidade associada a estas drogas deve-se principalmente ao stress oxidativo e disfunção mitocondrial, estando a apoptose intrínseca e extrínseca envolvida na morte celular observada (Valente *et al.*, 2016).

Mais recentemente, Luethi *et al* (2017) usando células HepG2 verificou que a bupropiona, MDPV, mefedrona e nafirona induziram morte celular de forma dependente da concentração, à exceção da metilona. Estas mostraram causar depleção de ATP e aumento na produção de ROS (Luethi *et al.*, 2017).

2.7. Tratamento de intoxicações agudas

O tratamento de intoxicações por catinonas sintéticas passa apenas pela aplicação de medidas de suporte, não existindo até à data nenhum antídoto (Paillet-Loilier *et al.*, 2014). Nos casos de agitação, psicose, taquicardia e hipertensão, são tratados através da administração de ansiolíticos e antipsicóticos, de forma a minimizar a excessiva libertação de adrenalina e noradrenalina, sendo os fármacos mais utilizados o lorazepam, diazepam, haloperidol e risperidona, sozinhos ou em associação. A ventilação mecânica é normalmente usada para proteger as vias respiratórias. No caso de correr hipertermia, a temperatura corporal é reestabelecida por arrefecimento brusco (Karila *et al.*, 2015; Prosser and Nelson, 2012). O consumo de catinonas sintéticas pode levar ao aparecimento de hiponatremia, por aumento da libertação de vasopressina e edema cerebral. O tratamento consiste na restrição da ingestão de água e administração de soluções hipertónicas, de forma a reestabelecer rapidamente os valores séricos de sódio. No caso do intoxicado apresentar isquemia coronária, o procedimento pode passar pela administração de nitroglicerina, morfina e agentes antiplaquetários, estando os beta-bloqueadores contraindicados uma vez que iriam piorar o estado de hipertensão e vasoconstrição coronária (Mas-Morey *et al.*, 2013).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Objetivos do estudo

Embora muitas catinonas sintéticas tenham perdido o seu estatuto legal em muitos países, continuam a ser consumidas em todo o mundo. O abuso destas substâncias tem sido associado a vários efeitos adversos, nomeadamente, taquicardia, tonturas, agitação psicomotora, delírio, dor no peito, dor abdominal e vômitos (Coppola and Mondola, 2012). Vários casos clínicos referem nefrotoxicidade associada ao consumo de catinonas sintéticas, incluindo falência renal aguda associada a rabdomiólise e necrose tubular aguda (Adebamiro and Perazella, 2012; Borek and Holstege, 2012; Valsalan *et al.*, 2017). Os mecanismos subjacentes à sua nefrotoxicidade não foram ainda elucidados. Estudos recentes avaliando os efeitos neurotóxicos e hepatotóxicos destas drogas demonstraram o envolvimento à indução de stress oxidativo, autofagia e apoptose (Luethi *et al.*, 2017; Rosas-Hernandez *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2017a; Valente *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2017b). Assim, foi objetivo deste trabalho avaliar numa primeira fase o potencial nefrotóxico de duas catinonas sintéticas, a metilona e a 3,4-DMMC, em células renais humanas HK-2 e, posteriormente, os mecanismos subjacentes a essa toxicidade. Para esse efeito, foram utilizados antioxidantes, inibidores da autofagia e da apoptose visando investigar o papel do stress oxidativo, da autofagia e da apoptose na nefrotoxicidade observada.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Linha celular HK-2

Para a realização deste estudo foi selecionado como modelo *in vitro* a linha celular imortalizada HK-2 de células tubulares proximais provenientes de rim humano. Este modelo é bastante utilizado na avaliação da nefrotoxicidade de xenobióticos, permitindo obter resultados semelhantes aos obtidos com células renais recentemente isoladas. A imortalização desta linha celular é feita através da exposição de uma cultura primária ao vírus do papiloma humano (HPV-16), ocorrendo a tradução dos genes E6/E7 sem alterar significativamente o fenótipo e propriedades funcionais das células originárias (Ryan *et al.*, 1994).

As células apresentam diferentes morfologias antes e após aderência à superfície do frasco e/ou poço, como mostra a Figura 12. Todas as operações envolvidas no

manuseamento das células, meio de cultura e soluções a testar foram efetuadas em câmara de fluxo laminar para garantir condições de assepsia e evitar contaminações microbianas.

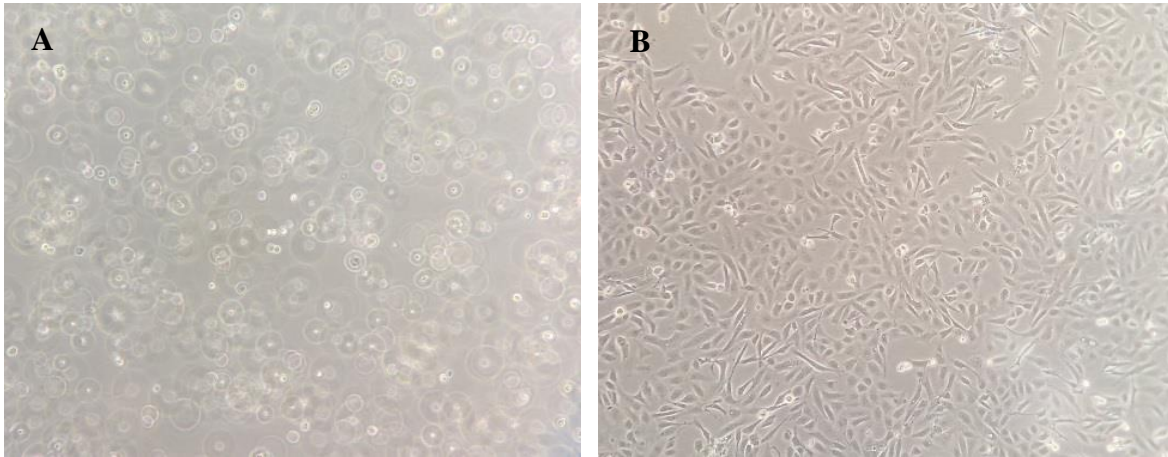


Figura 12. Aspeto das células HK-2 após descongelação (A) e após aderência à superfície do frasco com cerca de 90% de confluência (B).

3.2.2. Preparação do meio de cultura

Para fornecer às células todos os nutrientes necessários ao seu crescimento, foi utilizado o meio RPMI-1640 a 37°C. O meio de cultura encontra-se sob a forma de pó, o que implica a necessidade de preparação prévia. Este é preparado através da dissolução do pó em 1L de água desionizada, onde é adicionado hidrogenocarbonato de sódio (2 g/L), que funciona como um regulador de pH pois as células metabolizam o dióxido de carbono presente na estufa, levando à diminuição do valor de pH. Procede-se ao ajuste do pH do meio com uma solução diluída de HCl até ao valor de 7,2-7,3, seguida de esterilização por filtração, sendo que após esta etapa o pH atinge o valor ideal de 7,4.

O meio é posteriormente suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) com o objetivo de permitir a aderência das células à superfície dos frascos de cultura, fornecendo também os fatores de crescimento necessários. Para além disso, uma solução de antibióticos a 1% (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL) é adicionada ao meio de forma a impedir a proliferação de microrganismos e consequente contaminação das células. O meio assim obtido é denominado de meio completo.

3.2.3. Descongelação de alíquotas celulares

As células HK-2 encontram-se armazenadas a -80°C em criotubos contendo meio de congelação (meio completo com 7,5% de DMSO). Aquando da utilização das células, estas são descongeladas através da adição lenta de 9 ml de meio de cultura a 37°C , sendo a suspensão final transferida para um tubo Falcon. Após centrifugação de 5 minutos a 400 rpm, o sobrenadante foi rejeitado e o pellet ressuspendido em 10 mL de meio de cultura completo. Este procedimento tem como objetivo retirar todos os vestígios de DMSO do meio de congelação, o qual apresenta toxicidade para as células.

Da suspensão obtida são transferidos 5 mL para um frasco de cultura de 25 cm^2 , que é mantido numa estufa de 5% de CO_2 a 37°C até atingir cerca de 80% de confluência, sendo que esse processo demora aproximadamente de 3 dias. É recomendado proceder a três passagens antes das células poderem ser usadas para testar os compostos de forma a atingirem um ritmo de crescimento exponencial, que não se verifica imediatamente após a descongelação. O meio de cultura deve ser trocado a cada 2-3 dias de forma a garantir que as células têm todos os nutrientes necessários ao seu crescimento.

3.2.4. Cultura e subcultura das células HK-2

As células são utilizadas de forma contínua o que leva à necessidade de realizar subculturas das células, fazendo sucessivas passagens celulares para garantir o crescimento das mesmas. Sendo que as células HK-2 crescem em monocamada e exibem inibição por contacto, quando a superfície de adesão do frasco de cultura se encontra preenchida é necessário fornecer-lhes espaço para continuarem a crescer. Assim, quando se observa ao microscópio ótico invertido que as células atingiram aproximadamente 80% de confluência, estas são transferidas para um novo frasco de cultura. A esse processo dá-se o nome de passagem. Primeiramente procedeu-se à tripsinização, ou seja, à desagregação enzimática das células aderidas ao fundo do frasco, através da adição de uma solução de tripsina/EDTA (0,05% e 0,02%). Para tal, o meio de cultura existente no frasco é aspirado e rejeitado, seguido da lavagem do fundo com 1ml de tripsina para retirar os resíduos de FBS que iriam causar a inativação da tripsina, impedindo que esta exercesse a sua ação. Para que as células se destaquem da superfície de adesão procede-se à incubação do frasco, na estufa a 37°C , contendo 2 ml da solução de tripsina. Para que a ação enzimática da tripsina cesse é necessário adicionar 8 ml de meio de cultura

completo, uma vez que a razão tripsina:meio de cultura para inativar a ação da enzima é de 1:4. O volume de meio adicionado pode ser ajustado por excesso consoante o número de frascos pelos quais a suspensão celular será dividida. A essa divisão dá-se o nome de *split* e permite ajustar o tempo decorrente até que as células atinjam os 80% de confluência necessários. Todas as soluções que são adicionadas às células devem estar previamente aquecidas a 37°C, de forma a evitar o stress destas.

3.2.5. Congelação e conservação das células

É necessário congelar alíquotas de células para que possam ser posteriormente descongeladas e utilizadas de novo. Para isso, recorre-se à desagregação enzimática da monocamada de células aderida ao fundo do frasco de forma a se obter uma suspensão celular, que é submetida a uma centrifugação de 400 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante é rejeitado e o pellet é ressuspenso em 2 mL de meio de congelação, sendo essa suspensão dividida em dois criotubos com cerca de 1 mL cada, que são em seguida guardados a -80°C, o mais rapidamente possível, para evitar que o DMSO presente no meio de congelação danifique as células.

3.2.6. Incubação com os compostos em estudo

A primeira etapa deste estudo consistiu na construção de curvas concentração-resposta para a 3,4-DMMC e para a metilona. Para tal, foi necessário preparar soluções stock das drogas, que foram extemporaneamente diluídas em série, por forma a obter uma ampla gama de concentrações cuja avaliação experimental permitisse a descrição de uma resposta completa, ou seja, abrangendo desde a toxicidade nula (0% de morte celular) até à resposta máxima (100% de morte). A gama de concentrações utilizada foi de 0,1 a 10 mM para a metilona e de 0,01 a 3 mM para a 3,4-DMMC.

Todas as soluções testadas de metilona e 3,4-DMMC foram preparadas no momento da utilização, fazendo-se a diluição necessária, como indicado nas Tabelas 1 e 2, a partir da respetiva solução mãe a 50 mM preparada em meio de cultura sem FBS.

A partir de um frasco de cultura com uma confluência de 70-80% procedeu-se à contagem das células para posterior cultura em placa de 96 poços. Após tripsinização, a suspensão celular obtida foi submetida a uma contagem em câmara de Neubauer e posteriormente diluída em meio de cultura completo de forma a que cada poço tivesse uma densidade

celular adequada, de 10.000 células/poço. A suspensão diluída foi então pipetada para os poços da placa, sendo que, nas placas de 96 poços, apenas os 60 poços centrais são preenchidos. Nos poços periféricos são colocados 200 µL de água estéril ou meio RPMI, de forma a evitar fenómenos de evaporação e concentração das soluções a testar.

Tabela 1. Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas de 3,4-DMMC.

	MM	[stock]	V stock	M
	g/mol	mM	µL	mg
3,4-DMMC	227,7	50	263,50	3
1 placa				
Conc. final no poço (mM)	Conc. inicial (mM)	Volume (µl) a pipetar da sol. 50 mM	Volume (µl) de meio de cultura	Vf
3	6	240	1760	2000
		Volume (µl) a pipetar da sol. 6 mM		
2	4	240	120	360
1,6	3,2	192	168	360
1,2	2,4	144	216	360
1	2	120	240	360
0,8	1,6	96	264	360
0,65	1,3	78	282	360
0,5	1	400	2000	2400
0,3	0,6	80	720	800
		Volume (µl) a pipetar da sol. 0,6 mM		
0,2	0,4	240	120	360
0,1	0,2	120	240	360
0,05	0,1	100	500	600
		Volume (µl) a pipetar da sol. 0,1 mM		
0,02	0,04	160	240	400
0,01	0,02	80	320	400

Tabela 2. Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas de metilona.

	MM	[stock]	V stock	M
	g/mol	mM	µL	Mg
Metilona	243,7	50	1723,43	21
2 placas				
Conc. final no poço (mM)	Conc. inicial (mM)	Volume (µl) a pipetar da sol. 50 mM	Volume (µl) de meio de cultura	Vf
10	20	1720	2580	4300
		Volume (µl) a pipetar da sol.20 mM		
8	16	520	130	650
7	14	455	195	650
6	12	390	260	650
5	10	2300	2300	4600
		Volume (µl) a pipetar da sol.10 mM		
4	8	2000	500	2500
3,5	7	455	195	650
3	6	420	280	700
2,5	5	350	350	700
2	4	280	420	700
1,5	3	210	490	700
1	2	140	560	700
0,5	1	70	630	700
		Volume (µl) a pipetar da sol. 2mM		
0,1	0,2	70	630	700

O tempo necessário para que as células cubram satisfatoriamente o fundo dos poços, apresentando uma confluência de aproximadamente 80% é de 24 horas. Após esse período o meio é aspirado de forma suave, sendo colocados 100 µL de meio novo, sem FBS, de forma a que a albumina presente não interfira com os compostos teste. A este volume é posteriormente adicionado 100 µL de cada diluição, em triplicado, no poço correspondente, tal como mostra a Figura 13.

Todos os ensaios realizados incluíram um controlo negativo, efetuado com 200 μ L de meio RPMI sem FBS, e um controlo positivo de morte que consistiu na incubação das células com uma solução de Triton X-100 a 1%.

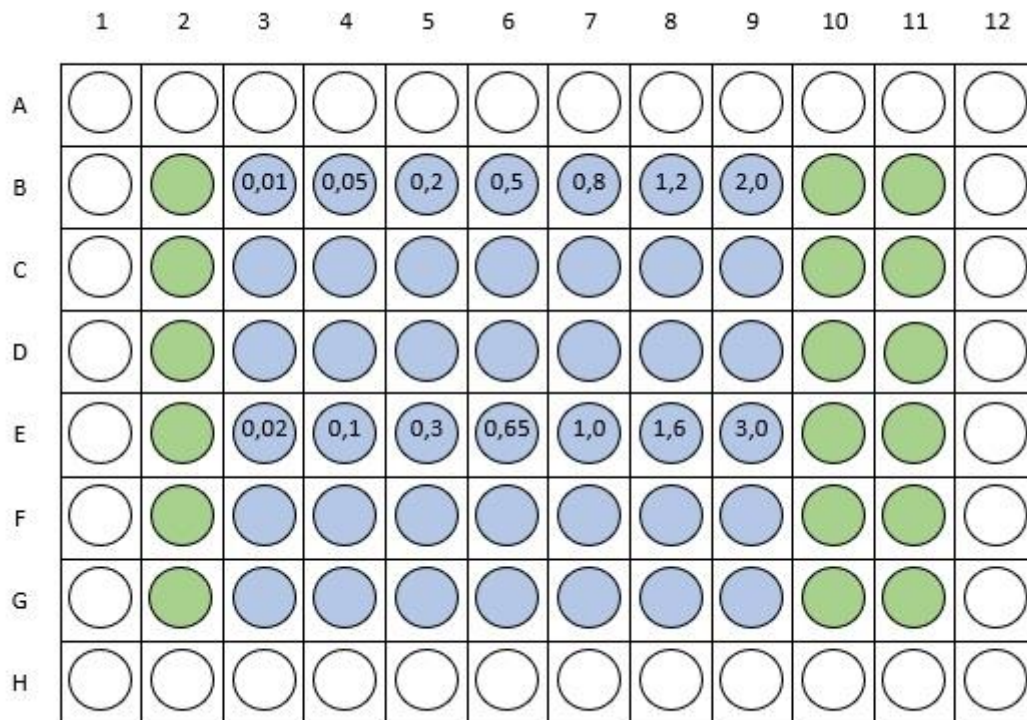


Figura 13. Esquema representativo da placa de 96 poços, onde os poços representados a verde correspondem aos poços controlo negativo (células expostas somente ao meio RPMI) e os poços representados a azul correspondem aos poços contendo as 14 concentrações de catinonas sintéticas testadas. Os poços periféricos representados a branco contêm água estéril ou meio RPMI.

Com base nas curvas obtidas, foi posteriormente selecionada apenas uma concentração de cada catinona, sendo de 4 mM para a metilona e de 0,5 mM para a 3,4-DMMC, para os ensaios subsequentes visando explorar os mecanismos subjacentes à toxicidade observada. Estas concentrações causam aproximadamente 40% de morte celular após 24 h de incubação.

Foram seguidamente avaliados os efeitos de: i) antioxidantes: ácido ascórbico a 0,5 mM e N-acetilcisteína a 2 mM; ii) inibidores da autofagia: 3-metiladenina a 1 mM e wortmanina a 5 μ M e iii) inibidores da apoptose: Ac-LETD-CHO e Z-VAD, ambos a 100 μ M, na citotoxicidade induzida pelas drogas em estudo. As células HK-2 foram pré-

incubadas durante 1 hora com estes compostos e depois incubadas durante 24 horas com os compostos na presença ou ausência das catinonas em estudo.

3.2.7. Avaliação da viabilidade celular

3.2.7.1. Ensaio da redução do MTT

O presente estudo utilizou o MTT, um método colorimétrico, para testar a viabilidade celular, através da função mitocondrial. O MTT (brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio é um composto que forma uma solução amarela após a dissolução do sal. O princípio do método baseia-se na redução do sal de MTT pelas succinato desidrogenases mitocondriais (Chiba *et al.*, 1998; Stockert *et al.*, 2012). Esta reação ocorre apenas nas células viáveis e tem como produto o formazano, um composto insolúvel em água com coloração violeta. As células mortas não têm o metabolismo ativo, e por isso perdem a capacidade de realizar esta redução. Assim, a quantidade de formazano formada e, conseqüentemente, a intensidade da coloração são diretamente proporcionais ao número de células viáveis. Este composto formado apresenta-se sob a forma de precipitado lipossolúvel o que implica a necessidade de usar um solvente orgânico, neste caso o dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais (Riss *et al.*, 2004).

Experimentalmente, o ensaio foi realizado em placas de 96 poços, nas quais a solução de teste dos 60 poços centrais foi aspirada suavemente por vácuo após as 24 e 48 horas de exposição às drogas. Posteriormente, pipetaram-se 200 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL, preparada no momento anterior à adição a partir de uma solução stock a 5 mg/mL. As placas foram então incubadas na estufa de CO₂ durante 1 hora e 30 minutos de forma a que a reação de redução possa ocorrer nas células metabolicamente ativas. Ao fim desse tempo a solução de MTT é cuidadosamente aspirada e são adicionados 100 µL de DMSO por poço, sendo a placa submetida a 3 minutos de agitação, num agitador de placas, a velocidade moderada, de forma a obter uma completa dissolução dos cristais de formazano. A medição da absorvância foi feita em leitor de placas utilizando o comprimento de onda de 545 nm com valor de referência de 630 nm. A solução de MTT é fotossensível, tendo todo o procedimento sido realizado ao abrigo da luz, incluindo a agitação das placas.

3.2.7.2. Ensaio da incorporação do corante vermelho neutro

O vermelho neutro (NR) é um método colorimétrico que se baseia na captação do corante vermelho neutro para o interior dos lisossomas das células vivas. Este corante apresenta uma cor avermelhada a pH ligeiramente ácido e uma carga próxima de zero, o que facilita a sua entrada nos lisossomas através das membranas celulares. Após entrada nos lisossomas, o corante adquire carga positiva o que impede a sua remoção das células viáveis aquando da lavagem (Babich and Borenfreund, 1991; Repetto *et al.*, 2008).

O procedimento para a realização deste teste é semelhante ao do MTT. Após o período de incubação (24 ou 48 horas), foi preparada uma solução de NR a 50 µg/mL e, após aspiração cuidadosa dos 60 poços centrais, foram pipetados 100 µL desta solução para cada poço. A placa foi então colocada em estufa de CO₂, a 37°C, durante 2 horas. Após esse tempo, a solução foi aspirada e todos os poços lavados com 200 µL de HBSS. Por último, são adicionados 100 µL de solução de lise/poço, que é composta por ácido acético (1%), etanol (50%) e água (49%), de forma a que ocorra a lise das células viáveis que retiveram o corante, libertando-o. As placas são seguidamente agitadas durante 10 minutos e a absorvância lida em leitor de placas a 540 nm e com filtro de referência de 630 nm.

A solução de NR é também fotossensível, o que requer que o procedimento seja feito ao abrigo da luz, tal como acontece com o MTT.

3.2.8. Microscopia ótica de contraste de fase

Para verificar a ocorrência de alterações morfológicas nas células renais HK-2 indicativas de mecanismos de morte como a autofagia, as células foram observadas em microscópio ótico invertido de contraste de fase (Nikon eclipse TS100) após exposição às cationonas sintéticas em estudo.

Para tal, as células foram colocadas a crescer em placas de 24 poços contendo lamelas revestidas com poli-L-lisina. Para isso, as lamelas foram previamente esterilizadas (através de radiação UV e álcool a 70°) e lavadas com água estéril seguida de secagem em camara de fluxo laminar. Depois desse processo, as lamelas foram colocadas nos poços e submersas em 250 µL de poli-L-lisina durante 10 minutos e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS estéril. Por fim, adicionou-se a cada poço 1 mL de uma

suspensão celular com uma densidade de 50.000 células/mL. Após o crescimento celular de 24 horas, foram adicionados os compostos a testar.

A observação no microscópio invertido foi realizada após um período de 24 e 48 horas de exposição aos compostos, com ampliação de 100 e 400 vezes.

3.2.9. Avaliação de autofagia por microscopia de fluorescência com laranja de acridina

O marcador fluorescente laranja de acridina é um corante sensível ao pH, capaz de atravessar livremente as membranas celulares, corando o DNA e o citoplasma. Contudo, este adquire carga positiva a pH ácido levando à sua retenção em determinados compartimentos celulares ácidos, nomeadamente lisossomas e autolisossomas, corando-os. Assim, este corante permite marcar autofagossomas, indicando a ocorrência de autofagia. As células marcadas com o laranja de acridina apresentam o citoplasma com coloração verde fluorescente e os compartimentos ácidos corados de vermelho fluorescente, sendo a intensidade da fluorescência proporcional ao grau de acidez (Amaral *et al.*, 2012; Kanzawa *et al.*, 2004).

Para este ensaio usaram-se placas de 24 poços. Foram colocadas lamelas revestidas com poli-L-lisina no fundo dos poços e 50.000 células/poço. Após 24 horas, foram adicionados os compostos a testar, com um tempo de incubação de 24 horas, ao fim do qual, se adicionou às células uma solução de laranja de acridina a 0,1 µg/mL durante 15 minutos e ao abrigo da luz. As lamelas foram posteriormente retiradas dos poços, montadas em lâminas com uma gota de PBS e observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) com uma ampliação de 200 vezes.

3.2.10. Tratamento estatístico

Para a análise estatística e construção dos modelos de regressão não linear foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.

As curvas de mortalidade em função do logaritmo da concentração (mM) obtidas nos ensaios do MTT e NR foram construídas usando a seguinte função logit: $Y = \theta_{\max}/(1+\exp(-\theta_1-\theta_2 \times \log(x)))$, onde θ_{\max} representa o efeito máximo observado, x representa a concentração da droga que se encontra em estudo, θ_1 é o parâmetro de localização e θ_2 representa o declive da curva.

A comparação entre as curvas obtidas para as 24 e 48 horas foi realizada pelo teste t-Student.

Todos os restantes dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM), com n a indicar o número de experiências realizadas. A avaliação da distribuição normal dos dados dos ensaios envolvendo antioxidantes e inibidores foi utilizado o teste D'Agostino & Pearson. A comparação dos resultados entre grupos com distribuição normal foi efetuada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey e para os dados sem distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal Wallis (não paramétrico) seguido do teste de Dunn. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de *p* inferiores a 0,05.

3.3. Resultados

3.3.1. Citotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC em células HK-2

As Figuras 14 e 15 mostram as curvas concentração-resposta obtidas nos testes do MTT e do NR após exposição das células renais HK-2 às cationas sintéticas em estudo, por um período de 24 ou 48 horas.

Podemos verificar que a morte celular tem uma relação proporcional com a concentração de droga testada, ou seja, a viabilidade celular diminui com o aumento da concentração da droga, podendo-se observar esse resultado quer no ensaio do MTT quer no NR, para ambas as cationas estudadas. Esse resultado é observado independentemente do tempo de incubação, isto é, o aumento da concentração leva a um aumento da morte celular tanto às 24 como às 48 horas.

Ao comparar as curvas obtidas nos diferentes tempos de incubação, podemos verificar que a toxicidade provocada por ambas as drogas é dependente do tempo de incubação, avaliada pelo teste do MTT. Contudo, o teste do NR mostrou que para a 3,4-DMMC o tempo de incubação não altera significativamente a toxicidade provocada. Assim, à exceção do resultado obtido no NR para a 3,4-DMMC, quando aumentamos o tempo de incubação com a droga o efeito tóxico induzido na célula é maior.

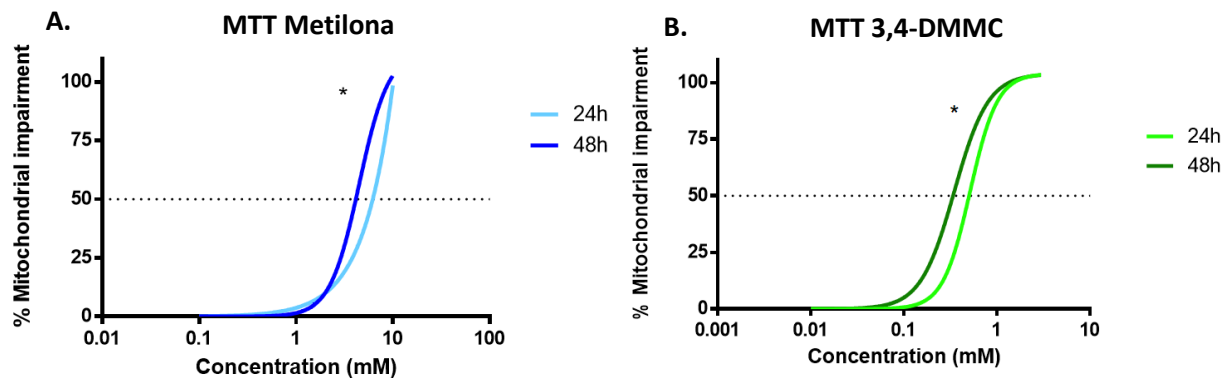


Figura 14. Curvas concentração-resposta obtidas para a metilona (A) e 3,4-DMMC (B) na linha celular HK-2 através do ensaio de viabilidade celular do MTT. Dados obtidos com um mínimo de quatro ensaios independentes e concentrações testadas em triplicado, após 24 e 48 horas de incubação. * $p < 0,05$ vs tempo 48h.

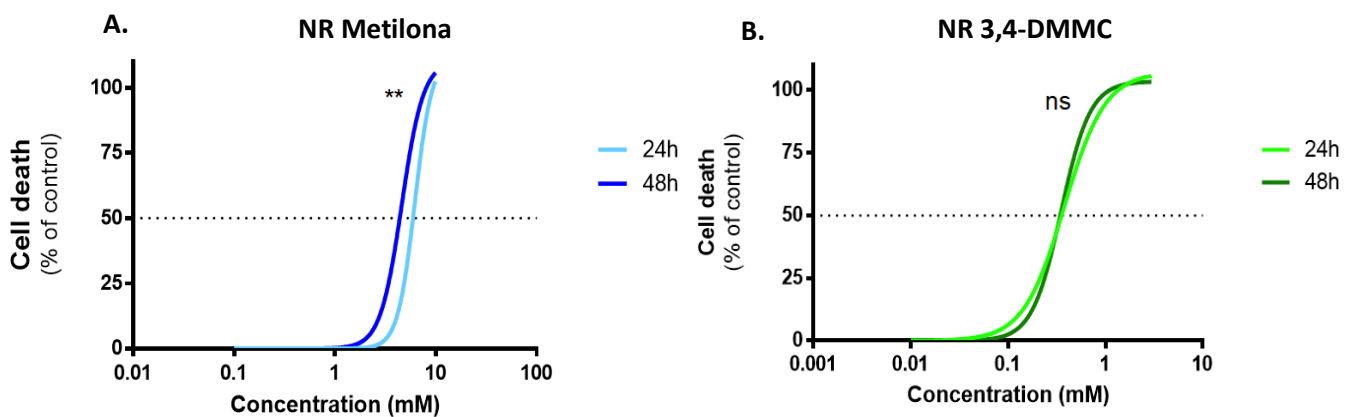


Figura 15. Curvas concentração-resposta obtidas para a metilona (A) e 3,4-DMMC (B) na linha celular HK-2 através do ensaio da incorporação do corante vermelho neutro. Dados obtidos com um mínimo de três ensaios independentes e concentrações testadas em triplicado, após 24 e 48 horas de incubação. ** $p < 0,01$ vs tempo 48h.

A Tabela 3 mostra os valores de EC_{50} calculados a partir das curvas de concentração-resposta obtidas para cada cationa nos ensaios do MTT e NR. Podemos verificar que as sensibilidades apresentadas por cada um dos testes não são significativamente diferentes. Além disso, com base nestes resultados, verificamos que a 3,4-DMMC se revelou mais tóxica para as células renais comparativamente com a metilona, ou seja, a concentração necessária para se obter 50% de morte celular foi menor para a 3,4-DMMC.

Tabela 3. Valores de EC₅₀ calculados a partir das curvas de concentração-resposta obtidas para a metilona e 3,4-DMMC, após 24 e 48 horas de exposição, nos ensaios do MTT e NR.

	MTT		NR	
	Metilona	3,4-DMMC	Metilona	3,4-DMMC
EC ₅₀ 24h	6,213 mM	0,503 mM	5,941 mM	0,355 mM
EC ₅₀ 48h	4,154 mM	0,338 mM	4,391 mM	0,343 mM

3.3.2. Alterações morfológicas induzidas pela metilona e 3,4-DMMC

A observação microscópica das células HK-2 após exposição quer à metilona quer à 3,4-DMMC (figura 16) demonstra claramente a formação de vacúolos intracelulares, para os dois tempos de incubação estudados (24 e 48 horas).

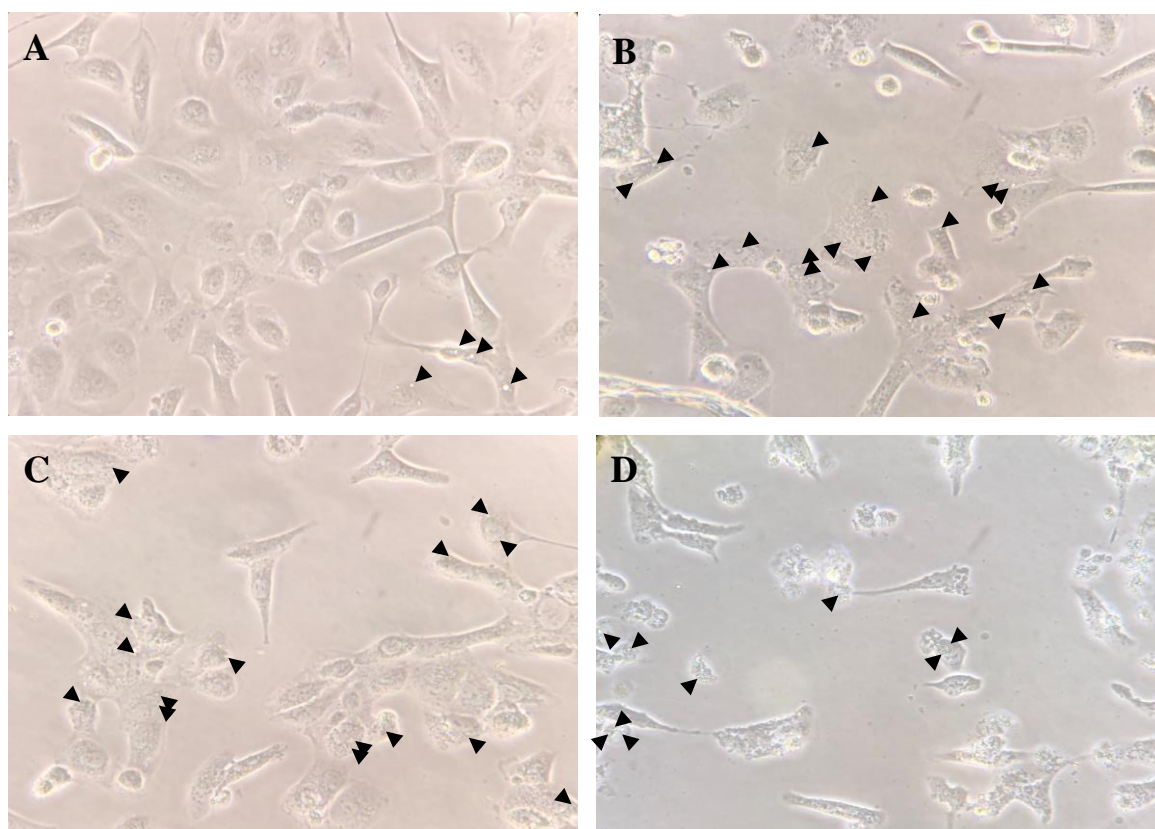


Figura 16. Imagens obtidas por microscopia invertida de contraste de fase representativas das alterações morfológicas nas células HK-2 expostas a catinonas sintéticas (x400). As células HK-2 tratadas com metilona 4 mM por 24h (B), 3,4-DMMC 0,25 mM por 24h (C) e 3,4-DMMC 0,5

mM por 48h (D) exibem um maior número de vacúolos intracelulares (pontas das setas pretas) quando comparadas a células controlo (A).

3.3.3. Avaliação do efeito da metilona e da 3,4-DMMC na formação de vacúolos autofágicos

Para esclarecer a natureza destes vacúolos, estudou-se em seguida a presença de vacúolos autofágicos por microscopia de fluorescência após marcação com laranja de acridina. A retenção deste corante em organelas acídicas como os autofagossomas tem sido descrito como um marcador de autofagia. A intensidade da autofagia pode ser inferida pelo volume do compartimento intracelular ácido (Paglin *et al.*, 2001).

A figura 17 mostra a marcação das células HK-2 com laranja de acridina, onde se pode constatar que as células controlo apresentaram uma fluorescência ácida mínima. Em contrapartida, as células expostas à metilona e 3,4-DMMC por 24 horas apresentaram fluorescência amarela/alaranjada/vermelha dentro das vesículas, enquanto o núcleo e o citoplasma exibem fluorescência verde. Este efeito foi mais evidente para a metilona.

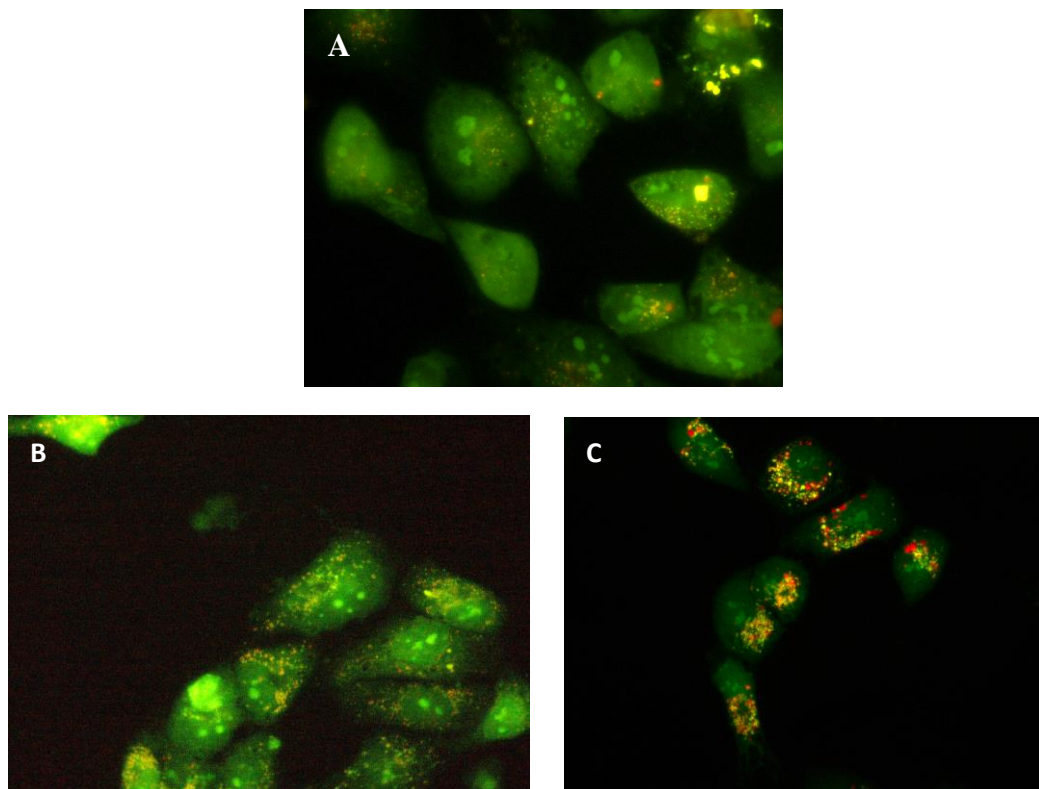


Figura 17. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência com marcação com o laranja de acridina evidenciando a formação de vacúolos acídicos em células HK-2 controlo (A) e tratadas com 3,4-DMMC 0,5 mM (B) ou metilona 4 mM (C) por 24h (ampliação de 200x).

3.3.4. Efeito do pré-tratamento com antioxidantes na nefrotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC

Neste estudo foi avaliado o efeito de dois antioxidantes, o ácido ascórbico e a N-acetilcisteína, na toxicidade induzida pelas cationas sintéticas em estudo. Testou-se então o efeito de cada antioxidante individualmente e em combinação com cada uma das cationas, por um período de 24 horas. Os resultados obtidos revelaram que a utilização de qualquer um dos antioxidantes isoladamente não provocou alterações significativas na viabilidade celular, na concentração e tempo de exposição estudados, o que indica que os resultados obtidos na adição da droga com a NAC ou o AA não se devem a qualquer tipo de toxicidade provocada pelo composto antioxidante de teste. Além disso, verificou-se que a pré-incubação com estes antioxidantes não só não preveniu a toxicidade como ainda aumentou de forma significativa a morte celular induzida pela 3,4-DMMC (Figuras 18A e 18 B) e pela metilona (Figuras 18C e 18D), sendo este efeito mais pronunciado com o AA. Por exemplo, a exposição das células à metilona na presença de AA levou a uma diminuição brusca na viabilidade celular, nomeadamente de $53,7 \pm 2,9\%$ (droga apenas) para $2,1 \pm 0,3\%$, enquanto na presença de NAC essa redução foi mais ligeira ($45,8 \pm 3,2\%$).

3.3.5. Efeito do pré-tratamento com inibidores da autofagia na nefrotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC

Com o intuito de verificar o papel da autofagia na morte celular induzida pelas cationas sintéticas, utilizou-se a 3-metiladenina (3-MA) e a wortmanina (Wort), como inibidores do processo de autofagia.

Como se pode verificar na Figura 19, a pré-incubação das células com a 3-MA não afeta *per si* a viabilidade celular, na concentração e tempo de exposição estudados. No entanto, a pré-incubação com a Wort na concentração de $5 \mu\text{M}$ provocou um decréscimo na viabilidade celular estatisticamente significativo em relação ao controlo. As Figuras 19A e 19B mostram uma diminuição na viabilidade celular quando as células expostas à 3,4-DMMC foram submetidas a uma pré-incubação com a 3-MA ou Wort, respetivamente, comparativamente com a incubação da droga isoladamente. Para a metilona também foi verificada um aumento da morte celular quando ocorria a pré-incubação com estes inibidores (Figuras 19C e 19D).

Avaliação *in vitro* do efeito de antioxidantes e inibidores da apoptose/autofagia na nefrotoxicidade induzida por catinonas sintéticas

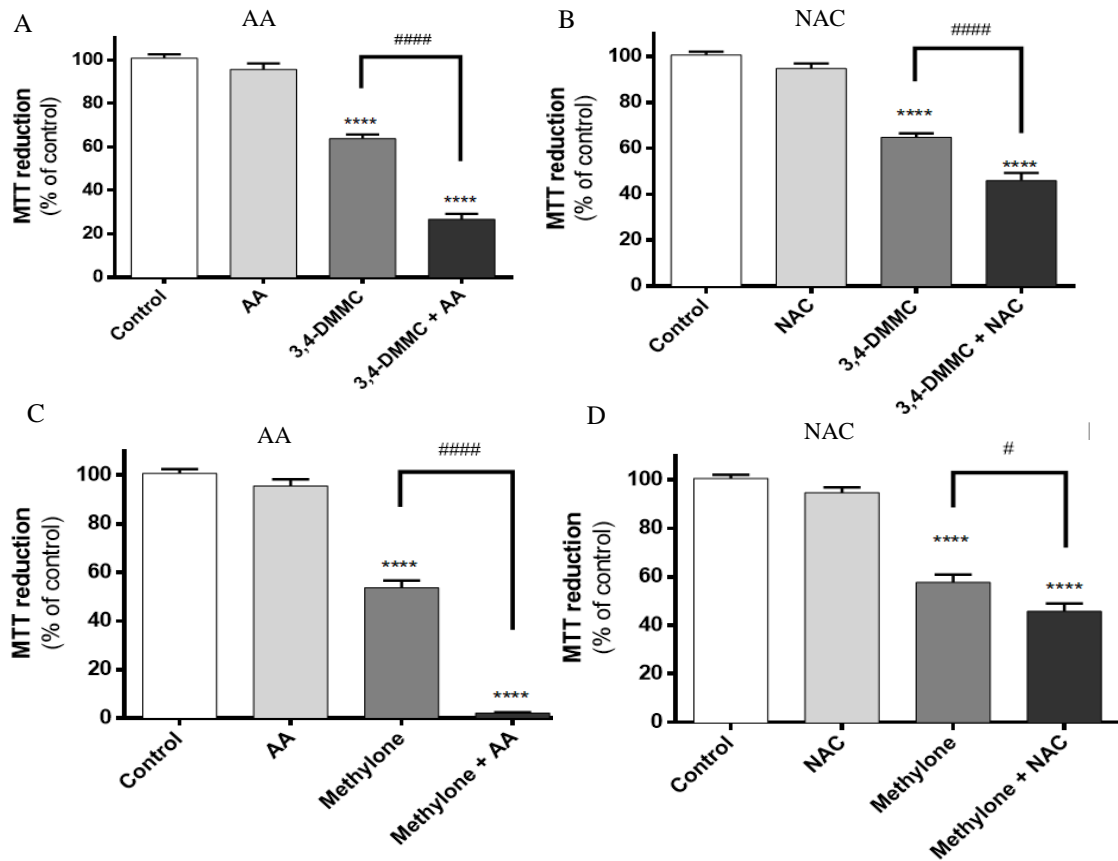


Figura 18. Efeito dos antioxidantes ácido ascórbico (AA; 0,5 mM) e N-acetilcisteína (NAC; 2 mM) na viabilidade das células HK-2 expostas à 3,4-DMMC (A e B, respetivamente) e metilona (C e D, respetivamente), após 24h de incubação. Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), de pelo menos quatro ensaios independentes, realizados em triplicado. ****p<0,0001 vs. controlo. #p<0,01, #####p<0,0001.

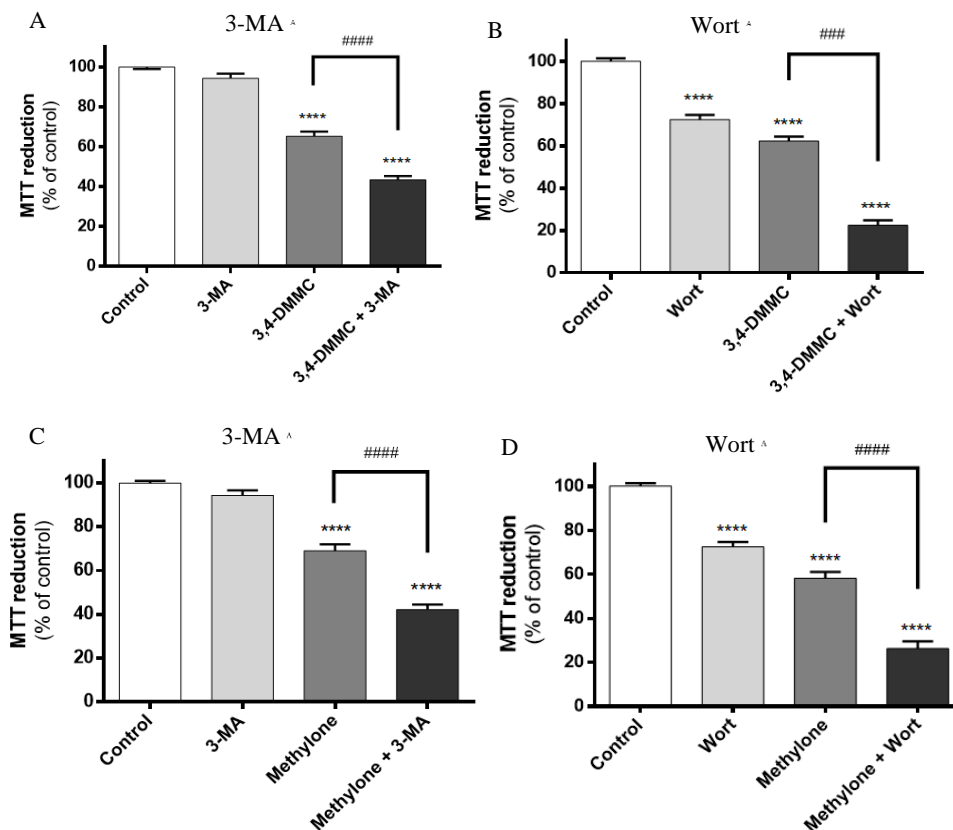


Figura 19. Efeito dos inibidores autofágicos 3-metiladenina (3-MA; 1 mM) e wortmanina (Wort; 5 μ M) na viabilidade das células HK-2 expostas à 3,4-DMMC (A e B, respetivamente) e metilona (C e D, respetivamente), após 24h de incubação. Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), de pelo menos quatro ensaios independentes, realizados em triplicado. **** p <0,0001 vs. controlo. #### p <0,001, ##### p <0,0001.

3.3.6. Efeito do pré-tratamento com inibidores da apoptose na nefrotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC

A morte celular apoptótica foi outro dos mecanismos avaliados no presente trabalho, tendo sido seleccionados para este estudo dois inibidores das caspases, o Z-VAD e o Ac-LETD-CHO.

Como se pode observar na Figura 20, quando do tratamento com qualquer um dos inibidores apoptóticos isoladamente não se observaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade das células em relação ao controlo, o que indica que os resultados obtidos na adição da droga com o Ac-LETD-CHO ou o Z-VAD não se devem a qualquer tipo de toxicidade provocada pelo inibidor seleccionado para o estudo. Além disso, verificou-se que a inibição do processo apoptótico não reverteu a morte celular

provocada pelas catinonas. A pré-incubação com Ac-LETD-CHO, com posterior exposição à 3,4-DMMC, diminuiu significativamente a viabilidade celular quando comparado com a incubação apenas com a droga. Apesar de também se verificar esse aumento de morte com o Z-VAD, este foi menos acentuado. O mesmo foi observado com a metilona em que a pré-incubação com os inibidores levou a uma diminuição da viabilidade celular, de forma semelhante para ambos.

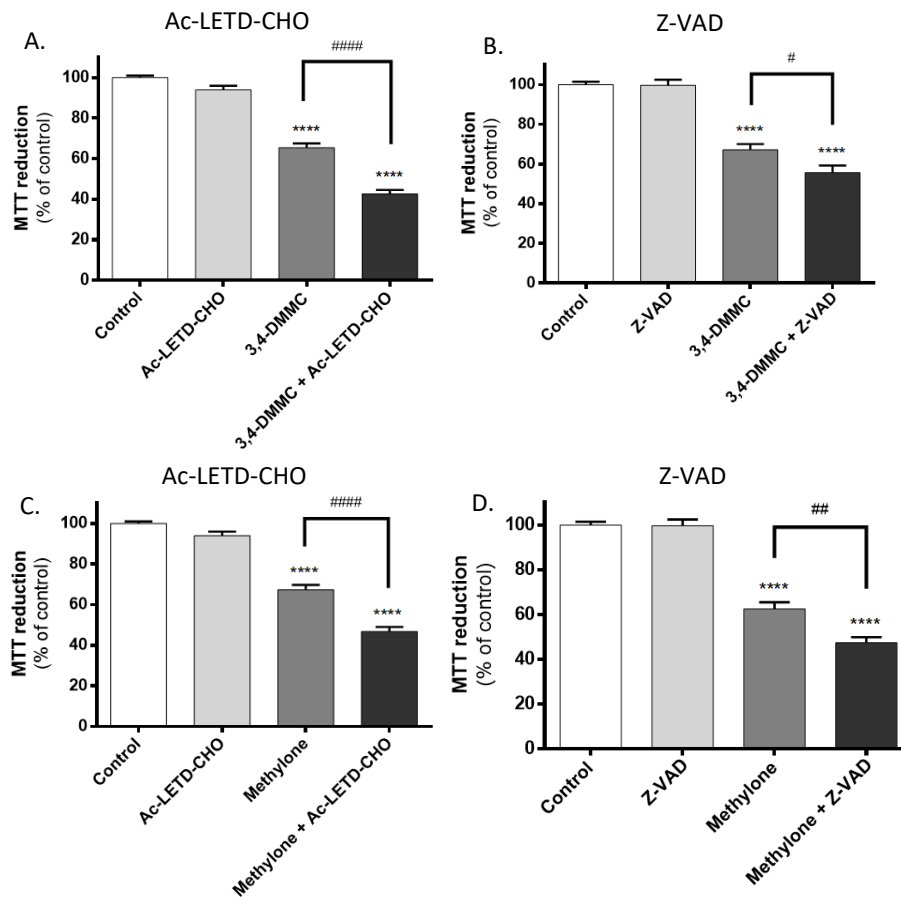


Figura 20. Efeito dos inibidores apoptóticos Ac-LETD-CHO (100 μ M) e Z-VAD (100 μ M) na viabilidade das células HK-2 expostas à 3,4-DMMC (A e B, respetivamente) e metilona (C e D, respetivamente), após 24h de incubação. Os resultados são apresentados pela média \pm erro padrão da média (SEM), de pelo menos quatro ensaios independentes, realizados em triplicado. **** $p < 0,0001$ vs. controlo. #### $p < 0,001$, ##### $p < 0,0001$.

3.4. Discussão

A via renal é a principal via de excreção dos xenobióticos (Hedaya, 2012), sendo, por isso, o rim um órgão alvo da toxicidade de vários xenobióticos, incluindo metais pesados e fármacos tais como o paracetamol, alguns antibióticos e agentes quimioterápicos como a doxorubicina e a cisplatina (Tarloff and Lash, 2005).

A unidade funcional do rim é o nefrônio, contendo cada rim cerca de 1 milhão de nefrônios. Este é constituído pela cápsula de Bowman, o glomérulo, o túbulo contornado proximal e distal e a ansa de Henle (Lote, 2012). Os rins recebem cerca de 25% do sangue que é bombeado pelo coração, o que faz com que esteja naturalmente exposto aos compostos que circulam na corrente sanguínea. A reabsorção é uma etapa que ocorre nos túbulos proximais, resultando na concentração do filtrado glomerular, o que implica a exposição dessas células a concentrações superiores de xenobióticos que sejam normalmente excretados pelos rins. Há ainda a referir que muitos xenobióticos sofrem acumulação seletiva no túbulo renal devido à existência de transportadores específicos responsáveis pelo transporte ativo dessas substâncias para o lúmen do túbulo renal. Também é sabido que as enzimas metabólicas estão predominantemente localizadas neste segmento do nefrônio. Assim, o estudo da toxicidade exercida a nível dos túbulos contornados proximais é bastante importante uma vez que esta porção do nefrônio é a mais suscetível a lesões causadas por xenobióticos (Wu *et al.*, 2009).

Estudos anteriores demonstraram que também as drogas como as anfetaminas induzem nefrotoxicidade. Num estudo realizado em culturas primárias de células renais de rato e humanas foi demonstrado que apesar da MDMA e da metilenedioxianfetamina (MDA) não apresentarem toxicidade direta para as células renais, os seus metabolitos apresentam (Carvalho *et al.*, 2002). O processo de conjugação com a glutatona reduzida (GSH), que normalmente leva à destoxificação de xenobióticos, levou ao aumento da toxicidade dos metabolitos formados, nomeadamente a α -metildopamina (α -MeDA), *in vitro*. Dada a semelhança estrutural entre as anfetaminas e as catinonas sintéticas pode ser extrapolada a existência de toxicidade a nível renal para estas novas drogas.

Vários casos de toxicidade renal associados à utilização das catinonas sintéticas têm sido descritos nos últimos anos. Adebamiro and Perazella (2012) reportaram o caso de um indivíduo que deu entrada no hospital após o consumo de “sais de banho” apresentando

rabdomiólise leve, hiperuricemia e insuficiência renal aguda (IRA). Os exames revelaram que a IRA teve origem essencialmente na necrose tubular aguda, tendo a função renal do paciente melhorado após a aplicação de medidas de suporte. No entanto, após a alta, o paciente reutilizou “sais de banho” e foi novamente admitido com IRA (Adebamiro and Perazella, 2012). Outro paciente que desenvolveu IRA oligúrica e rabdomiólise leve associada ao uso de “sais de banho” necessitou de hemodiálise contínua por 48 horas para a recuperação da função renal (Regunath *et al.*, 2012). Um terceiro estudo de caso relata falência multiorgânica num paciente após a injeção de sais de banho. A IRA anúrica foi observada na apresentação e o paciente necessitou de hemodiálise contínua e depois intermitente durante um mês (Borek and Holstege, 2012). Não foi obtida uma amostra de biópsia renal, mas o envolvimento sistémico, incluindo insuficiência cardíaca, insuficiência respiratória, insuficiência hepática e coagulação intravascular disseminada, sugere que a IRA foi provavelmente devida a necrose tubular aguda. Mais recentemente, (Valsalan *et al.*, 2017) descreveram o caso de um indivíduo de 39 anos que após ter consumido MDPV apresentava taquicardia, hipertermia, acidose metabólica, hipercalemia, rabdomiólise e IRA (onde os exames mostravam necrose tubular e nefrite tubulointersticial). Os parâmetros metabólicos melhoraram após tratamento de suporte e necessitou de terapia de substituição renal que resultou na reversão da IRA ao fim de alguns dias (Valsalan *et al.*, 2017).

A nefrotoxicidade induzida por catinonas sintéticas é provavelmente multifatorial (Luciano and Perazella, 2014). Ao inibirem a recaptação de monoaminas, como a dopamina e noradrenalina, aumentam a atividade do sistema nervoso simpático, o que pode resultar em vasoconstrição e hipoperfusão de rins e músculos resultando em necrose tubular renal e rabdomiólise. No entanto, não existem, até à data, estudos na literatura científica que avaliem a toxicidade tubular direta das catinonas sintéticas ou dos seus metabolitos. Desta forma, o presente trabalho pretendeu avaliar o efeito de duas catinonas sintéticas comumente consumidas, nomeadamente a 3,4-DMMC e a metilona, usando como modelo *in vitro* células de rim humano HK-2.

Para o presente estudo foram primeiramente traçadas as curvas de toxicidade para duas catinonas sintéticas recorrendo a dois métodos de viabilidade celular, o MTT e o NR. Os resultados obtidos em ambos os testes mostraram que as catinonas testadas induziram morte celular no modelo *in vitro* de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição. A 3,4-DMMC (EC_{50} (24h) = 0,503 mM; EC_{50} (48h) = 0,338 mM) exibiu

maior toxicidade para as células HK-2 que a metilona (EC_{50} (24h) = 6,213 mM; EC_{50} (48h) = 4,154 mM), no ensaio do MTT. O mesmo foi verificado no ensaio do NR, obtendo-se os seguintes valores: para a 3,4-DMMC EC_{50} (24h) = 0,355 mM; EC_{50} (48h) = 0,343 mM e para a metilona EC_{50} (24h) = 5,941 mM; EC_{50} (48h) = 4,391 mM. Os métodos utilizados neste estudo dão-nos uma indicação da viabilidade celular através das avaliações de diferentes parâmetros. O ensaio do MTT baseia-se na redução do sal de tetrazólio por enzimas mitocondriais, nomeadamente as desidrogenases, e desta forma permite avaliar a atividade metabólica mitocondrial (Stockert *et al.*, 2012). Por outro lado, o ensaio do NR tem como base a incorporação de um corante nos lisossomas das células viáveis, refletindo a integridade lisossomal (Babich and Borenfreund, 1991). Contudo, os resultados obtidos nos dois testes foram muito semelhantes, não havendo diferenças significativas entre os valores de EC_{50} obtidos.

O diferente potencial tóxico pode estar relacionado com diferenças nas características estruturais das catinonas testadas que condicionam, por exemplo, a lipofilia e desta forma a capacidade da droga em atravessar as membranas e entrar nas células. No entanto, ainda não existe informação suficiente para a 3,4-DMMC que relacione as suas características estruturais e farmacocinéticas com a elevada toxicidade exibida por este derivado da catinona.

Embora não existam estudos publicados na literatura sobre a nefrotoxicidade dos derivados sintéticos da catinona, o seu potencial hepatotóxico e neurotóxico foi já demonstrado em alguns estudos (Hill and Thomas, 2011; Luethi *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2017a; Valente *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2017b). Os estudos mecanísticos realizados nesses estudos suportam a capacidade dos derivados sintéticos da catinona para induzirem hepato e neurotoxicidade *in vitro* através do aumento do stress oxidativo, da perturbação das funções mitocondriais, redução do ATP intracelular e da indução de morte celular por apoptose (observado no modelo hepático e neuronal) e autofagia (observado no modelo neuronal).

Neste estudo, foi possível verificar que as catinonas testadas causaram alteração morfológica nas células HK-2, caracterizada por uma marcada vacuolização citoplasmática. A posterior marcação das células com a sonda laranja de acridina permitiu confirmar que se tratam de vacúolos ácidos, que são indicativos do processo de autofagia (com formação de autofagossomas e fagolisossomas).

A autofagia consiste numa degradação fisiológica das estruturas intracelulares de forma a fornecer nutrientes às células quando estas se encontram privadas dos mesmos. Ocorre então uma “reciclagem” de moléculas intracelulares de forma a manter a homeostasia celular. Este mecanismo assume, assim, um papel muito importante em vários processos celulares como o metabolismo, diferenciação, envelhecimento, morte celular e imunidade, o que significa que, quando existem anomalias neste mecanismo, podem desenvolver-se condições para o cancro e doenças degenerativas. Tem ainda um papel bastante importante na remoção de proteínas agregadas, organelos danificados e patogénicos intracelulares. São quatro os passos principais da autofagia: i) a nucleação; ii) alongação da membrana; iii) fusão com o lisossoma, e por fim iv) a degradação. O autofagossoma (vesículas citoplasmáticas de membrana dupla) forma-se quando o fagóforo incorpora no seu interior material intracelular incluindo proteínas, lípidos, bem como organelos, como mitocôndrias e retículo endoplasmático (Portt *et al.*, 2011; Sever, 2017). Seguidamente, este sofre maturação fundindo com o lisossoma e promovendo a degradação do seu conteúdo pelas enzimas lisossomais, de natureza acídica. A autofagia é um processo ativo a níveis basais na maioria das células. A TOR cinase é uma cinase alvo da rapamicina e que apresenta um papel bastante importante na deteção de nutrientes e regulação do crescimento celular. Esta sinaliza quando os nutrientes estão disponíveis e promove o crescimento celular através da indução da expressão das proteínas ribossomais e aumento da translação proteica. Quando ocorre privação de nutrientes e hipoxia, a TOR cinase é inibida. Desta forma, uma redução da atividade da TOR induz a autofagia, de forma a que a célula se adapte às condições envolventes de falta de nutrientes e/ou oxigénio, diminuindo o crescimento e aumentando o catabolismo (Glick *et al.*, 2010).

Curiosamente, a função de remoção da autofagia parece ser uma faca de dois gumes, porque pode levar à sobrevivência ou morte celular. A autofagia é controlada por várias vias, sendo a mais extensivamente estudada a que envolve a proteína cinase mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos). Várias vias de sinalização modulam a atividade da mTOR, entre as quais destacam-se a PI3k/Akt e MAPK (que regulam positivamente a mTOR e consequentemente inibidores da autofagia), AMPK (que regulam negativamente a mTOR e consequentemente ativadores da autofagia) e, ainda, a p53 que pode regular positiva ou negativamente a atividade da mTOR (Ravikumar *et al.*, 2009; He and Klionsky, 2009). No entanto, existem também mecanismos de indução de autofagia independentes de

mTOR. Um outro mecanismo pelo qual a autofagia é regulada pela presença de ROS é através da regulação redox da proteína Atg4. Esta aumenta a lipidação da Atg8 (essencial para a indução da autofagia) em condições oxidantes (Underwood *et al.*, 2010).

Com vista à elucidação de possíveis mecanismos subjacentes à citotoxicidade observada nas células HK-2, avaliou-se ainda neste estudo o efeito de dois inibidores da autofagia bem conhecidos, a 3-metiladenina e a Wortmanina, na morte celular induzida pela 3,4-DMMC (na concentração de 0,5 mM) e pela metilona (na concentração de 4 mM) após 24 horas.

Apesar da indução de apoptose ter sido o principal foco de pesquisa em estudos de toxicidade de drogas, estudos recentes demonstraram um papel crucial para a autofagia como um mecanismo de morte/sobrevivência em células expostas a cocaína (Guha *et al.*, 2016), anfetaminas (Li *et al.*, 2014), canabinóides (Koay *et al.*, 2014) e etanol (Luo, 2014).

Estudos anteriores demonstraram que a indução de autofagia está igualmente envolvida na neurotoxicidade causada pelas catinonas sintéticas, nomeadamente a metilona e a MDPV, e que este mecanismo precede a ativação apoptótica (Valente *et al.*, 2017a). Nesse estudo, os autores verificaram que ambas as catinonas induziram alterações morfológicas concordantes com ativação autofágica em neurónios dopaminérgicos, com formação de autofagossomas, e ativação de marcadores de autofagia, tais como a formação de organelos vesiculares acídicos e aumento da expressão da proteína LC3-II (localizada na membrana do autofagossoma), de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição. Constatou-se ainda que a ativação dos marcadores autofágicos ocorreu antes da indução de morte celular ou da ativação da caspase-3. Mais recentemente, Siedlecka-Kroplewska *et al.* (2018) demonstrou que outra catinona sintética, a 3-fluorometcatinona, induz stress oxidativo, apoptose e autofagia em células neuronais de ratinho HT-22 (Siedlecka-Kroplewska *et al.*, 2018). No entanto, o papel da autofagia na nefrotoxicidade induzida por estas drogas não tinha sido ainda estudado.

Como referido anteriormente, a autofagia pode constituir não só um mecanismo de morte celular, quando ocorre uma degradação excessiva dos constituintes celulares, mas também um mecanismo de sobrevivência, fazendo com que a célula entre em modo de contenção de energia face a condições adversas, impedindo desta forma que esta entre em

morte celular (Sever, 2017). Isto pode explicar os resultados obtidos neste estudo uma vez que a inibição da autofagia com a 3-metiladenina e wortmanina resultou num agravamento da morte celular induzida pela 3,4-DMMC e pela metilona. Estes inibidores atuam inibindo a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), o que previne a autofagia na fase inicial da formação de autofagossomos (Chude and Amaravadi, 2017). Assim, os resultados obtidos sugerem que a inibição do mecanismo de autofagia pela 3-MA e Wort impede que a célula recorra a um dos seus mecanismos de sobrevivência, o que se traduz numa maior percentagem de morte. Podemos concluir que, pelo menos *in vitro*, a autofagia assume um papel protetor na nefrotoxicidade induzida por catinonas sintéticas.

A indução de morte celular por apoptose é outro mecanismo envolvido na toxicidade das catinonas, nomeadamente na linha neuronal humana SH-SY5Y, observando-se a ativação de mecanismos intrínsecos (ativação das caspases 9 e 3) e extrínsecos (ativação da caspase 8), formação de núcleos picnóticos e condensação de cromatina (Valente et al., 2017b).

Este mecanismo é considerado um componente vital de vários processos celulares, nomeadamente o desenvolvimento normal das células, *turnover* celular, funcionamento do sistema imune, desenvolvimento embrionário e morte celular. Em doses baixas, vários estímulos como o calor, radiação, hipoxia e fármacos citotóxicos podem induzir a apoptose. Este é um mecanismo que depende de energia e envolve a ativação de um grupo de proteases, as caspases.

As caspases são expressas numa forma inativa de proenzimas na maioria das células e, uma vez ativas, podem ativar outras pró-caspases, permitindo a iniciação da cascata de proteases. Foram identificadas 10 caspases até hoje: caspases 1, 4 e 5 (caspases inflamatórias); caspases 2, 8, 9 e 10 (caspases iniciadoras); e a caspases 3, 6 e 7 (caspases executoras) (Elmore, 2007). Morfologicamente, ocorre a diminuição do tamanho da célula e o citoplasma torna-se mais denso, havendo aproximação dos organelos. A picnose é um fenómeno característico da apoptose e caracteriza-se pela condensação da cromatina. Adicionalmente ocorre a fragmentação nuclear e *blebbing* da membrana plasmática, culminando todos estes acontecimentos na formação de pequenas vesículas, designadas de corpos apoptóticos. Estes consistem em citoplasma e organelos condensados que podem ou não conter fragmentos celulares, e são capturados e degradados pelos lisossomas de células fagocíticas.

Neste trabalho, procurou-se avaliar se a apoptose estava envolvida na morte celular induzida pela 3,4-DMMC e metilona. Para isso, usaram-se dois inibidores da apoptose, o Ac-LETD-CHO, um inibidor das caspases 8 e 9, e o Z-VAD-fmk, um inibidor não-seletivo de caspases. Sendo a autofagia um processo de grande importância relativamente à proteção da célula, impedindo que estas sofram apoptose, seria de esperar que, ao inibirmos a apoptose, houvesse uma diminuição da morte celular causada pelas cationas sintéticas. Contudo, os resultados obtidos mostram que ambos os inibidores não só não reverteram a morte como ainda causaram um ligeiro decréscimo na viabilidade celular induzida pelas cationas em estudo.

Estudos recentes mostraram que, apesar das diferenças marcantes entre a apoptose e a autofagia, a sua regulação está intimamente interligada e os mesmos reguladores podem por vezes controlar esses dois processos (Thorburn, 2008).

Yu et al (2006) demonstraram que o tratamento com o inibidor da apoptose zVAD causa degradação autofágica seletiva de um dos principais antioxidantes celulares, a catalase. A depleção de catalase causa um desequilíbrio severo do metabolismo de ROS, levando a uma acumulação drástica dos mesmos, peroxidação lipídica e, finalmente, morte não apoptótica (Yu et al., 2006). No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais os inibidores da apoptose usados no presente trabalho exacerbam a morte celular induzida por estas drogas permanecem desconhecidos e deverão ser investigados futuramente.

Outra vertente abordada neste estudo foi o papel do stresse oxidativo na toxicidade destas cationas. O stresse oxidativo caracteriza-se por um desequilíbrio entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes, a favor das primeiras, levando a uma interrupção da função fisiológica, podendo também levar a modificações químicas irreversíveis (Frijhoff *et al.*, 2015). As espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) são geradas como subprodutos do metabolismo normal das células, mas também sob condições patológicas ou quando expostas a xenobióticos. Várias organelas celulares como os peroxissomas, retículo endoplasmático, lisossomas e núcleo são capazes de produzir ROS, sendo a mitocôndria uma das principais fontes desses compostos. Níveis basais de ROS e RNS desempenham um papel muito importante na homeostasia e na regulação da proliferação e sobrevivência celular. Contudo, quando a formação destas espécies reativas está desregulada e os mecanismos de defesa celular antioxidante não são suficientes para

neutralizá-las, surge o stresse oxidativo. Como resultado, ocorrem danos oxidativos ao nível dos ácidos nucleicos, proteínas e lípidos.

O stress oxidativo e a formação de ROS/RNS têm sido largamente associados à regulação da sinalização celular envolvida na morte celular por apoptose e/ou necrose (REF). Foi ainda demonstrado que o stresse oxidativo leva à acumulação de autofagossomos em diferentes tipos de células somáticas (Navarro-Yepes *et al.*, 2014). No entanto, os eventos redox envolvidos no nível molecular permanecem largamente desconhecidos. Mais importante, a inter-relação entre as alterações no equilíbrio redox, stresse oxidativo e autofagia não está bem definida.

Foi demonstrado recentemente por Valente *et al* (2017) que a N-acetilcisteína detém efeitos neuroprotetores, levando a uma reversão total da formação de ROS/RNS e a uma diminuição parcial das atividades autofágica e apoptótica induzidas pela metilona e por outra catinona, a MDPV. Este resultado evidencia a importância do stress oxidativo na regulação dos mecanismos de morte celular programada incitados pelas catinonas sintéticas (Valente *et al.*, 2017a). No entanto, os resultados desse estudo são contraditórios aos obtidos no presente trabalho, uma vez que a utilização dos antioxidantes NAC e AA não reverteu a morte induzida por ambas as catinonas estudadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho parecem estar de acordo com o estudo prévio de Underwood *et al* (2010) que demonstrou que vários antioxidantes, como a NAC, cistamina e glutathione, inibem tanto a autofagia basal como a induzida. Nesse estudo foi demonstrado que a NAC era capaz de diminuir a autofagia induzida pela rapamicina (composto capaz de induzir a autofagia por inibição da proteína cinase mTOR, que, por sua vez, regula negativamente a autofagia) e diminuiu igualmente a autofagia quando comparada ao estado basal em células neuronais (Underwood *et al.*, 2010). Desta forma, uma possível explicação poderá ser a diminuição da autofagia basal pela diminuição na produção de ROS/RNS na presença destes antioxidantes, o que, tendo a autofagia um efeito protetor, poderá justificar o aumento da morte celular por apoptose. Contudo, e como já foi referido, a inter-relação entre as alterações no equilíbrio redox, stress oxidativo e autofagia, não está ainda bem definida.

IV. CONCLUSÕES

As catinonas sintéticas são um grupo importante de novas substâncias psicoativas que surgiram originalmente como alternativas legais às anfetaminas. Os resultados deste estudo permitiram gerar novo conhecimento sobre a toxicidade destas novas drogas recreativas, evidenciando o rim como um órgão alvo. A compreensão dos mecanismos de toxicidade subjacentes poderá ajudar a entender o dano renal reportado em humanos.

O trabalho experimental realizado para elaborar a presente dissertação permitiu concluir que:

- As catinonas sintéticas 3,4-DMMC e metilona induziram citotoxicidade em células HK-2 de rim humano de modo dependente da concentração e do tempo de exposição, tendo o derivado 3,4-DMMC exibido um maior potencial nefrotóxico.
- A metilona e a 3,4-DMMC promoveram a formação de vacúolos intracelulares de natureza acídica, fornecendo a primeira evidência de que as catinonas sintéticas ativam a autofagia em células renais humanas.
- A exposição das células HK-2 às catinonas na presença dos inibidores autofágicos 3-MA e wortmanina aumentou significativamente a morte celular, evidenciando o papel protetor da autofagia na nefrotoxicidade das catinonas sintéticas.
- Também o pré-tratamento com os inibidores apoptóticos aumentou a toxicidade dos compostos estudados nas células HK-2, sendo necessários estudos adicionais para elucidar as vias envolvidas.
- A nefrotoxicidade da metilona e da 3,4-DMMC não é anulada ou diminuída na presença de antioxidantes (NAC e AA), o que poderá estar relacionado com a inibição da autofagia mediada por ROS e consequente potenciação da morte apoptótica.

V. Bibliografia

- Adebamiro, A. and Perazella, M. A. (2012). Recurrent acute kidney injury following bath salts intoxication. *Am J Kidney Dis*, 59, pp. 273-275.
- Amaral, C.; Borges, M.; Melo, S., *et al.* (2012). Apoptosis and autophagy in breast cancer cells following exemestane treatment. *PLoS One*, 7, pp. e42398.
- Arunotayanun, W. and Gibbons, S. (2012). Natural product 'legal highs'. *Nat Prod Rep*, 29, pp. 1304-1316.
- Babich, H. and Borenfreund, E. (1991). Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay. pp.
- Balint, E. E.; Falkay, G. and Balint, G. A. (2009). Khat - a controversial plant. *Wien Klin Wochenschr*, 121, pp. 604-614.
- Banks, M. L.; Worst, T. J.; Rusyniak, D. E., *et al.* (2014). Synthetic cathinones ("bath salts"). *J Emerg Med*, 46, pp. 632-642.
- Borek, H. A. and Holstege, C. P. (2012). Hyperthermia and multiorgan failure after abuse of "bath salts" containing 3,4-methylenedioxypropylone. *Ann Emerg Med*, 60, pp. 103-105.
- Chavant, F.; Boucher, A.; Le Boisselier, R., *et al.* (2015). New synthetic drugs in addictovigilance. *Therapie*, 70, pp. 167-189.
- Chiba, K.; Kawakami, K. and Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol In Vitro*, 12, pp. 251-258.
- Chude, C. I. and Amaravadi, R. K. (2017). Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int J Mol Sci*, 18, pp.
- Coppola, M. and Mondola, R. (2012). Synthetic cathinones: chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as "bath salts" or "plant food". *Toxicol Lett*, 211, pp. 144-149.

- Debruyne, D.; Courne, M. A.; Le Boisselier, R., *et al.* (2010). [Mephedrone: a designer drug of recent use in France]. *Therapie*, 65, pp. 519-524.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, pp. 495-516.
- EMCDDA (2015a). New psychoactive substances in Europe. An update from the EU Early Warning System. Luxembourg.
- EMCDDA. 2015b. Perspective on drugs - Injection of synthetic cathinones.
- EMCDDA (2018). European Drug Report 2018: Trends and Developments. Luxemburgo. Serviço das Publicações da União Europeia.
- Fass, J. A.; Fass, A. D. and Garcia, A. S. (2012). Synthetic cathinones (bath salts): legal status and patterns of abuse. *Ann Pharmacother*, 46, pp. 436-441.
- Feyissa, A. M. and Kelly, J. P. (2008). A review of the neuropharmacological properties of khat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, pp. 1147-1166.
- Frijhoff, J.; Winyard, P. G.; Zarkovic, N., *et al.* (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 23, pp. 1144-1170.
- German, C. L.; Fleckenstein, A. E. and Hanson, G. R. (2014). Bath salts and synthetic cathinones: an emerging designer drug phenomenon. *Life Sci*, 97, pp. 2-8.
- Glick, D.; Barth, S. and Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, pp. 3-12.
- Griffiths, P.; Lopez, D.; Sedefov, R., *et al.* (2010). Khat use and monitoring drug use in Europe: the current situation and issues for the future. *J Ethnopharmacol*, 132, pp. 578-583.
- Guha, P.; Harraz, M. M. and Snyder, S. H. (2016). Cocaine elicits autophagic cytotoxicity via a nitric oxide-GAPDH signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, pp. 1417-1422.
- He, C. and Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, pp. 67-93.

- Hedaya, M. A. (2012). Basic pharmacokinetics. 2^a edition ed., pp. 233.
- Hill, S. L. and Thomas, S. H. (2011). Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clin Toxicol (Phila)*, 49, pp. 705-719.
- Kanzawa, T.; Germano, I. M.; Komata, T., *et al.* (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*, 11, pp. 448-457.
- Karila, L.; Megarbane, B.; Cottencin, O., *et al.* (2015). Synthetic cathinones: a new public health problem. *Curr Neuropharmacol*, 13, pp. 12-20.
- Karila, L. and Reynaud, M. (2011). GHB and synthetic cathinones: clinical effects and potential consequences. *Drug Test Anal*, 3, pp. 552-559.
- Katz, D. P.; Bhattacharya, D.; Bhattacharya, S., *et al.* (2014). Synthetic cathinones: "a khat and mouse game". *Toxicol Lett*, 229, pp. 349-356.
- Kelly, J. P. (2011). Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test Anal*, 3, pp. 439-453.
- Koay, L. C.; Rigby, R. J. and Wright, K. L. (2014). Cannabinoid-induced autophagy regulates suppressor of cytokine signaling-3 in intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307, pp. G140-148.
- Li, I. H.; Ma, K. H.; Weng, S. J., *et al.* (2014). Autophagy activation is involved in 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')--induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *PLoS One*, 9, pp. e116565.
- Lote, C. J. (2012). *Principles of renal physiology*.
- Luciano, R. L. and Perazella, M. A. (2014). Nephrotoxic effects of designer drugs: synthetic is not better! *Nat Rev Nephrol*, 10, pp. 314-324.
- Luethi, D.; Liechti, M. E. and Krahenbuhl, S. (2017). Mechanisms of hepatocellular toxicity associated with new psychoactive synthetic cathinones. *Toxicology*, 387, pp. 57-66.
- Luo, J. (2014). Autophagy and ethanol neurotoxicity. *Autophagy*, 10, pp. 2099-2108.

- Markantonis, S. L.; Kyroudis, A. and Beckett, A. H. (1986). The stereoselective metabolism of dimethylpropion and monomethylpropion. *Biochem Pharmacol*, 35, pp. 529-532.
- Mas-Morey, P.; Visser, M. H.; Winkelmolten, L., *et al.* (2013). Clinical toxicology and management of intoxications with synthetic cathinones ("bath salts"). *J Pharm Pract*, 26, pp. 353-357.
- McGraw, M. and McGraw, L. (2012). Bath salts: not as harmless as they sound. *J Emerg Nurs*, 38, pp. 582-588.
- Meyer, M. R.; Du, P.; Schuster, F., *et al.* (2010). Studies on the metabolism of the alpha-pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS. *J Mass Spectrom*, 45, pp. 1426-1442.
- Meyer, M. R.; Vollmar, C.; Schwaninger, A. E., *et al.* (2012). New cathinone-derived designer drugs 3-bromomethcathinone and 3-fluoromethcathinone: studies on their metabolism in rat urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and their detectability in urine. *J Mass Spectrom*, 47, pp. 253-262.
- Navarro-Yepes, J.; Burns, M.; Anandhan, A., *et al.* (2014). Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal*, 21, pp. 66-85.
- Paglin, S.; Hollister, T.; Delohery, T., *et al.* (2001). A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 61, pp. 439-444.
- Paillet-Loilier, M.; Cesbron, A.; Le Boisselier, R., *et al.* (2014). Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones. *Subst Abuse Rehabil*, 5, pp. 37-52.
- Pedersen, A. J.; Reitzel, L. A.; Johansen, S. S., *et al.* (2013). In vitro metabolism studies on mephedrone and analysis of forensic cases. *Drug Test Anal*, 5, pp. 430-438.

- Portt, L.; Norman, G.; Clapp, C., *et al.* (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*, 1813, pp. 238-259.
- Prosser, J. M. and Nelson, L. S. (2012). The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones. *J Med Toxicol*, 8, pp. 33-42.
- Psychonaut Web Mapping, G. (2009). MDPV Report. London UK. Institute of Psychiatry.
- Ravikumar, B.; Futter, M.; Jahreiss, L., *et al.* (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci*, 122, pp. 1707-1711.
- Regunath, H.; Ariyamuthu, V. K.; Dalal, P., *et al.* (2012). Bath salt intoxication causing acute kidney injury requiring hemodialysis. *Hemodial Int*, 16 Suppl 1, pp. S47-49.
- Repetto, G.; del Peso, A. and Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, 3, pp. 1125-1131.
- Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L., *et al.* (2004). Cell Viability Assays. In: Sittampalam, G. S.; Coussens, N. P.; Brimacombe, K., *et al.* (eds.). *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD), pp.
- Rosas-Hernandez, H.; Cuevas, E.; Lantz, S. M., *et al.* (2016). Methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) induce differential cytotoxic effects in bovine brain microvessel endothelial cells. *Neurosci Lett*, 629, pp. 125-130.
- Ryan, M. J.; Johnson, G.; Kirk, J., *et al.* (1994). HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*, 45, pp. 48-57.
- Sever, O. S. D., O. G. (2017). Autophagy: Cell death or survive mechanism. *Journal of Oncological Sciences*, pp.
- Siedlecka-Kroplewska, K.; Wronska, A.; Stasiłojc, G., *et al.* (2018). The Designer Drug 3-Fluoromethcathinone Induces Oxidative Stress and Activates Autophagy in HT22 Neuronal Cells. *Neurotox Res*, pp.

- Simmler, L. D.; Buser, T. A.; Donzelli, M., *et al.* (2013). Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol*, 168, pp. 458-470.
- Sogawa, C.; Sogawa, N.; Ohyama, K., *et al.* (2011). Methylone and monoamine transporters: correlation with toxicity. *Curr Neuropharmacol*, 9, pp. 58-62.
- Spiller, H. A.; Ryan, M. L.; Weston, R. G., *et al.* (2011). Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States. *Clin Toxicol (Phila)*, 49, pp. 499-505.
- Springer, D.; Staack, R. F.; Paul, L. D., *et al.* (2005). Identification of cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 3',4'-methylenedioxy-alpha-pyrrolidinopropiophenone (MDPPP), a designer drug, in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 35, pp. 227-237.
- Stockert, J. C.; Blazquez-Castro, A.; Canete, M., *et al.* (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*, 114, pp. 785-796.
- Tarloff, J. and Lash, L. (2005). *Toxicology of the kidney*. Boca Raton, Fla. CRC Press.
- Thorburn, A. (2008). Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*, 13, pp. 1-9.
- Toennes, S. W.; Harder, S.; Schramm, M., *et al.* (2003). Pharmacokinetics of cathinone, cathine and norephedrine after the chewing of khat leaves. *Br J Clin Pharmacol*, 56, pp. 125-130.
- Toennes, S. W. and Kauert, G. F. (2002). Excretion and detection of cathinone, cathine, and phenylpropanolamine in urine after khat chewing. *Clin Chem*, 48, pp. 1715-1719.
- Underwood, B. R.; Imarisio, S.; Fleming, A., *et al.* (2010). Antioxidants can inhibit basal autophagy and enhance neurodegeneration in models of polyglutamine disease. *Hum Mol Genet*, 19, pp. 3413-3429.

- Valente, M. J.; Amaral, C.; Correia-da-Silva, G., *et al.* (2017a). Methylone and MDPV activate autophagy in human dopaminergic SH-SY5Y cells: a new insight into the context of beta-keto amphetamines-related neurotoxicity. *Arch Toxicol*, 91, pp. 3663-3676.
- Valente, M. J.; Araujo, A. M.; Bastos Mde, L., *et al.* (2016). Editor's Highlight: Characterization of Hepatotoxicity Mechanisms Triggered by Designer Cathinone Drugs (beta-Keto Amphetamines). *Toxicol Sci*, 153, pp. 89-102.
- Valente, M. J.; Bastos, M. L.; Fernandes, E., *et al.* (2017b). Neurotoxicity of beta-Keto Amphetamines: Deathly Mechanisms Elicited by Methylone and MDPV in Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells. *ACS Chem Neurosci*, 8, pp. 850-859.
- Valente, M. J.; Guedes de Pinho, P.; de Lourdes Bastos, M., *et al.* (2014). Khat and synthetic cathinones: a review. *Arch Toxicol*, 88, pp. 15-45.
- Valsalan, R.; Varghese, B.; Soman, D., *et al.* (2017). Multi-organ dysfunction due to bath salts: are we aware of this entity? *Intern Med J*, 47, pp. 109-111.
- Wu, Y.; Connors, D.; Barber, L., *et al.* (2009). Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol In Vitro*, 23, pp. 1170-1178.
- Yu, L.; Wan, F.; Dutta, S., *et al.* (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, pp. 4952-4957.
- Zaitsu, K.; Katagi, M.; Kamata, H. T., *et al.* (2009). Determination of the metabolites of the new designer drugs bk-MBDB and bk-MDEA in human urine. *Forensic Sci Int*, 188, pp. 131-139.