



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

U. PORTO

Maria João Leal Ferreira da Silva

**Avaliação da influência do metabolismo na
interação toxicológica entre duas piperazinas
correntemente utilizadas como drogas de
abuso, a Benzilpiperazina (BZP) e a 1-(3-
trifluormetilfenil)piperazina(TFMPP)**

**Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia
Analítica Clínica e Forense apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade do Porto**

**Orientador: Professora Doutora Helena Carmo
Co-orientador: Doutora Diana Dias Silva**

Setembro de 2014

DECLARAÇÃO DE REPRODUÇÃO

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

AGRADECIMENTOS

A concretização desta dissertação não estaria completa sem expressar o meu profundo reconhecimento a várias pessoas com as quais contei com o importante contributo e sem as quais a sua realização teria sido impossível.

Agradeço à minha Orientadora Dr.^a Helena Carmo pela oportunidade de realizar este projeto, pela sua supervisão, sabedoria, rigor e paciência demonstradas e em especial à minha Co-orientadora Dr.^a Diana Dias Silva, exemplo de generosidade, pelo modo como me recebeu, me orientou e apoiou neste projeto, pela partilha dos seus vastos conhecimentos, paciência, compreensão, incentivo, confiança, empenhamento e disponibilidade que sempre evidenciou ao longo de todo o processo. Agradeço a ambas a revisão da dissertação.

À Dr.^a Maria de Lourdes Bastos, Coordenadora do Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense, agradeço pela criação e oportunidade de frequentar o curso que, já durante a primeira graduação, pretendia efectuar.

O meu muito obrigada à Dr.^a Maria João Valente pelos ensinamentos de culturas primárias, pela sua constante disponibilidade e ajuda; à Dr.^a Paula Guedes pela assistência no GC-MS, sua disponibilidade e paciência; à Ana Margarida Araújo e à Márcia Monteiro pelo incansável apoio no GC-MS, incentivo, coragem e partilha de conhecimentos e de material de apoio à presente dissertação e ao Dr. Marcelo Arbo pela ajuda na execução de trabalhos práticos e seus ensinamentos.

Ao Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço todos os equipamentos e materiais necessários à execução do trabalho experimental. Igualmente grata estou a todos os membros do Laboratório que sempre se mostraram disponíveis para ajudar, partilhar experiências e conhecimentos, esclarecer dúvidas, e tornaram a integração mais fácil.

A todos os meus colegas do Mestrado, em especial à Mariana Cruz, Ana Filipa Ferreira, Mariana Fernandes, Armanda Gomes, Ana Sofia Oliveira, Sofia Guedes e Anne Sophie Alves agradeço a amizade, os bons momentos, o incansável

apoio e incentivos que fizeram com que nunca desistisse, vencesse o cansaço e levasse esta etapa até ao fim.

Pela amizade incondicional, pelo apoio, carinho, paciência, compreensão, pelas minhas ausências e por comigo partilharem os momentos de ansiedade e alegria agradeço a todos os meus Amigos, não citando nomes porque são muitos, mas sabem quem são e são especiais.

À Farmácia Ferreira da Silva agradeço a oportunidade de me permitirem conciliar a realização do Mestrado com a prática de Farmacêutica Comunitária, bem como agradeço a todos os membros da sua equipa pela amizade, boa disposição, incentivo e reconhecimento.

Aos meus pais e irmão gostaria de agradecer o apoio incondicional que sempre tive, por acreditarem em mim, pela força que me transmitem, por me ajudarem a ultrapassar as dificuldades e angústias, por me acompanharem em todas as fases da minha vida e me incentivarem de ir sempre mais além.

O meu muito obrigada a todos que, de alguma forma, indireta ou indiretamente, me apoiaram ou prestaram colaboração nesta aventura científica.

ABSTRACT

In recent years has been an increase in production and consumption of new psychoactive substances, the so-called “legal highs”, which are often marketed as safe. Piperazines are part of this class of drugs, and the 1-benzylpiperazine (BZP) and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine hydrochloride (TFMPP) are the most consumed piperazines. Although they are prohibited in Portugal we can find them on illicit market and easily through Internet.

BZP and TFMPP are often taken in combination, deliberately to mimic the effects of MDMA or in order to increase the psychoactive effects or inadvertently inserted already in the mixture. However, the combination of these substances also has a negative potential toxicity with a damaging effect and difficult to predict. Thus, emerge the need to implement toxicity studies of mixtures, which are often neglected by the scientific community with most part of available investigations heavily relying on single-drug studies.

For this reason was proposed the theme for this Master Project based in following objectives: (i) check potential interactions between BZP and TFMPP, (ii) determine if these interactions can be estimated using two prediction models of mixtures [the *concentration addition* (CA) and *independent action* (IA)], (iii) study the mechanisms underlying their toxicity and (iv) study possible changes in metabolic profile of drugs resulting of their interactions.

To achieve these objectives, we initially evaluated the cytotoxicity profile of the individual substances using the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-dinephenyltetrazolium bromide (MTT) viability assay in primary rat hepatocytes and HepaRG cells. This allowed to design different combinations of the three mixtures (EC₅₀, EC₀₁ and EC_{2: 1}) applying the two mathematical concepts widely used in pharmacology: the CA and IA models.

Our experimental results was determined that CA model was the most appropriate model in predicting of BZP and TFMPP mixture effects in the majority of tested concentrations, in HepaRG cells. In primary hepatocytes was found a deviation to the right compared to predict models, which suggests the possibility of an antagonism between the two drugs. It was also found that TFMPP has higher toxicity when compared with BZP in both cells models and the combination of the two substances showed toxic effects too. These effects were evaluated in primary rat hepatocytes and HepaRG cells. The most significant effects were found on primary cultures.

This study also assessed some possible mechanisms of action responsible for cytotoxicity as the influence of oxidative stress and mitochondrial integrity. In these assays, it was observed an increased production of reactive oxygen and nitrogen species, a reduction of intracellular content in GSH and a compromising mitochondrial function and consequent disruption of energy state (decrease of ATP content). However the mechanisms underlying the toxicity requires further investigation.

The characterization of the metabolic profile was performed for the primary rat hepatocytes using GC-MS method for identification and quantification of compounds. The study was very preliminary and only allowed to identify and quantify BZP in the samples tested. In this assay it has been found higher concentrations of BZP in cells which was exposed to mixture in EC50 compared to cells exposed to BZP individually. It suggests the possibility of competition between common metabolic enzymes (CYP1A2, CYP450 and CYP2D6). Although preliminary, this assay showed promising results, but it is essential to continue improving in this area, including the improvement of the method.

In summary, TFMPP proved to be more toxic than BZP and both compounds act additively to produce toxic effects, even when present in quantities that individually proved to be innocuous. The primary culture was the best model to express toxicity of substances and CA model was the best model to predict the adverse effects of mixtures. In metabolic studies was observed a possible metabolic interaction that made the metabolic process slower and less extensive.

Key words: BZP, TFMPP, mixtures, cytotoxicity, metabolism

RESUMO

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento na produção e consumo de novas substâncias psicoativas, as denominadas “legal highs”, sendo estas comercializadas muitas vezes como seguras. As piperazinas inserem-se nesta classe de drogas, sendo a 1-benzilpiperazina (BZP) e a 1-(3-trifluormetilfenil)piperazina (TFMPP) as substâncias mais consumidas e que, apesar de atualmente proibidas em Portugal, encontram-se disponíveis no mercado ilícito e facilmente através da Internet.

A BZP e a TFMPP são muitas vezes consumidas em associação, deliberadamente para mimetizar os efeitos da 3,4-metildioximetanfetamina (MDMA) ou com o intuito de aumentar os efeitos psicoativos, ou inadvertidamente em pastilhas já com a mistura. No entanto, a associação destas substâncias também apresenta um potencial negativo na toxicidade, sendo muitas vezes o efeito pernicioso da administração de misturas desconhecido e difícil de prever. Assim, surge a necessidade de implementar estudos de toxicidade de misturas, sendo estes por vezes negligenciados pela comunidade científica, uma vez que a maioria dos estudos disponíveis está confinado à análise toxicológica das substâncias individualmente.

Por este motivo, foi proposto o presente tema para o projeto de Mestrado tendo como objetivos (i) verificar potenciais interações entre a BZP e a TFMPP, (ii) determinar se essas interações podem ser estimadas com recurso a dois modelos de previsão de misturas, modelo de *adição de concentrações* (AC) e modelo de *ação independente* (AI), (iii) estudar os mecanismos subjacentes à sua toxicidade e (iv) estudar eventuais alterações no perfil metabólico das drogas resultantes das suas interações.

Para o alcance destes objetivos, foi inicialmente traçado o perfil de citotoxicidade das substâncias individualmente em hepatócitos primários de rato e em células HepaRG através do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Isto permitiu efectuar o desenho das três combinações diferentes das misturas (EC50, EC01 e EC2:1), aplicando os dois conceitos matemáticos amplamente utilizados em farmacologia, o modelo AC e AI.

Dos resultados obtidos experimentalmente verificou-se que o modelo AC foi o que melhor previu a toxicidade das misturas, tendo revelado, nas células HepaRG, um efeito aditivo para a grande maioria das concentrações testadas. Nos hepatócitos primários de rato verificou-se um desvio à direita relativamente aos

modelos de previsão, o que indicia a possibilidade de um antagonismo entre as duas drogas. Verificou-se também que a TFMPP apresenta uma maior toxicidade comparativamente à BZP em ambos os modelos celulares e que a associação das duas substâncias, mesmo em concentrações que se revelaram inócuas para as células expostas aos compostos individualmente, demonstraram efeitos tóxicos. Os efeitos tóxicos da BZP, da TFMPP e das misturas foram avaliados em hepatócitos primários de rato e em células HepaRG, tendo-se verificado efeitos mais significativos nas culturas primárias, modelo este metabolicamente mais competente e mais representativo dos hepatócitos *in vivo*.

No presente estudo foram também avaliados alguns possíveis mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade, nomeadamente a influência do stress oxidativo e da integridade mitocondrial, tendo-se verificado um aumento na produção de espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e NOS, respetivamente), diminuição do conteúdo intracelular em glutatona reduzida (GSH) e comprometimento da função mitocondrial com consequente perturbação do estado energético [diminuição do conteúdo de adenosina 5'-trifosfato (ATP)]. Os mecanismos subjacentes à toxicidade exigem no entanto uma investigação mais aprofundada.

A caracterização do perfil metabólico foi efetuada para os hepatócitos primários de rato recorrendo ao método de cromatografia gasosa com detetor de massa (GC-MS) para identificação e quantificação dos compostos. O estudo efetuado foi bastante preliminar, tendo sido apenas identificada e quantificada a BZP nas amostras testadas. Aqui verificaram-se concentrações superiores de BZP nas células expostas à mistura EC50 comparativamente às células expostas à BZP individualmente, o que sugere a possibilidade de competição entre as enzimas metabólicas comuns a ambas as substâncias (CYP1A2, CYP3A4 e CYP2D6). Embora preliminar, este ensaio mostrou-se promissor, sendo necessário prosseguir o seu estudo, implementando também melhorias no método.

Em síntese, a TFMPP revelou-se mais tóxica que a BZP e ambas as substâncias atuaram aditivamente para produzir os efeitos tóxicos, mesmo quando presentes em quantidades que individualmente se revelaram inócuas. A cultura primária foi a que melhor exprimiu a toxicidade das substâncias e das misturas e o modelo AC foi o que melhor previu os efeitos nefastos das misturas, não os subestimando. No estudo metabólico, embora preliminar, verificou-se uma possível interação metabólica que tornou o processo metabólico mais moroso e, eventualmente menos extenso.

Palavras-chave: BZP, TFMPP, misturas, citotoxicidade, metabolismo

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	I
Abstract.....	III
Resumo.....	V
Índice Geral.....	VII
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XVI
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XVIII
1-Enquadramento e Estrutura da Dissertação.....	1
2-Introdução.....	5
2.1- Benzilpiperazina e 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina.....	8
2.1.1- Características físico-químicas.....	8
2.1.2- Perspetiva histórica.....	9
2.1.2.1- Piperazinas e a Indústria Farmacêutica.....	9
2.1.2.2- Piperazinas como droga de abuso.....	10
2.1.3- Formas de apresentação e composição, prevalência e padrão de consumo.....	12
2.1.4- Efeitos biológicos e toxicológicos.....	14
2.1.4.1- Hepatotoxicidade.....	17
2.1.5- Toxicodinâmica.....	18
2.1.6- Toxicocinética.....	22
2.1.6.1- Perfil farmacocinético da BZP.....	23
2.1.6.2- Perfil farmacocinético da TFMPP.....	28
2.2- Mistura de BZP e TFMPP.....	33
2.2.1- Efeitos biológicos e toxicológicos.....	34
2.2.2- Toxicodinâmica da mistura.....	36
2.2.3- Toxicocinética da mistura.....	38

2.3- Interação da BZP e TFMPP com outras substâncias.....	41
2.4-Tratamento da intoxicação.....	41
2.5- Avaliação dos efeitos de misturas em termos de aditividade, sinergismo ou antagonismo.....	42
3- Objetivos.....	45
4- Metodologias utilizadas nos trabalhos experimentais.....	47
4.1- Caracterização do perfil de citotoxicidade da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura.....	48
4.1.1- Reagentes.....	48
4.1.2- Linha celular HepaRG.....	49
4.1.2.1- Descongelação.....	50
4.1.2.2- Cultura da linha celular HepaRG.....	51
4.1.2.3-Sementeira da linha celular HepaRG.....	52
4.1.2.4- Congelação.....	52
4.1.3- Hepatócitos primários de rato.....	53
4.1.3.1- Animais.....	53
4.1.3.2- Isolamento de hepatócitos de rato.....	54
4.1.3.3- Determinação da viabilidade celular.....	55
4.1.3.4- Sementeira de hepatócitos isolados de rato.....	55
4.1.4- Exposição das células HepaRG e dos hepatócitos primários de rato à BZP, à TFMPP e às suas misturas.....	56
4.1.5-Ensaio de redução do MTT.....	57
4.1.6- Modelo de regressão não linear.....	58
4.1.7- Previsão do efeito aditivo de misturas.....	58
4.1.8- Espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e NOS).....	59
4.1.9- Determinação do conteúdo de ATP intracelular.....	61
4.1.10- Determinação proteica.....	63
4.1.11- Determinação da Glutathiona reduzida (GSH) e do dissulfito de Glutathiona (GSSG).....	63

4.1.11.1- Determinação da Glutathione total (GSH total).....	64
4.1.11.2- Determinação do dissulfeto de Glutathione (GSSG).....	64
4.1.12- Avaliação da integridade mitocondrial (ensaio de incorporação de TMRE).....	65
4.1.13- Análise estatística.....	66
4.2- Caracterização do perfil metabólico da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura, por Cromatografia Gasosa acoplada a detetor de Massa (GC-MS).....	66
4.2.1- Reagentes.....	67
4.2.2- Padrões e amostras.....	67
4.2.3- Hidrólise enzimática.....	68
4.2.4- Extração em fase sólida.....	68
4.2.5- Derivatização e injeção no GC-MS.....	69
4.2.6- Processo de identificação.....	70
5- Resultados.....	72
5.1- Estudos de citotoxicidade.....	73
5.1.1- Análise das curvas de concentração-resposta dos compostos individuais (BZP e TFMPP).....	73
5.1.2- Efeitos previstos e observados da mistura de BZP e TFMPP preparada na proporção relativa ao EC ₅₀ de cada composto (Mistura A).....	78
5.1.3- Efeitos previstos e observados da mistura de BZP e TFMPP preparada na proporção relativa ao EC ₀₁ de cada composto (Mistura B).....	79
5.1.4- Efeitos da mistura representativa de um cenário realista de exposição à BZP e à TFMPP (Mistura C).....	81
5.2- Avaliação da influência do stress oxidativo e integridade mitocondrial na citotoxicidade das piperazinas.....	82
5.2.1- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, na geração de ROS e NOS.....	83
5.2.2- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, nos níveis de GSH e GSSG.....	84
5.2.3- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, nos níveis de ATP intracelular.....	85

5.2.4- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, na integridade mitocondrial.....	86
5.3- Comparação entre o perfil metabólico da BZP e da TFMPP quando incubadas individualmente e em mistura com hepatócitos isolados de rato.....	89
5.3.1. - Identificação das substâncias.....	93
5.3. 2- Estudo do perfil metabólico da BZP e TFMPP, isoladamente e em mistura, após incubação com hepatócitos primários de rato.....	93
6- Discussão.....	96
6.1- Avaliação dos efeitos citotóxicos da BZP e da TFMPP individualmente e em mistura.....	98
6.1.1- Relação concentração-resposta dos compostos testados individualmente nos hepatócitos primários de rato e células HepaRG.....	98
6.1.2- Comparação das curvas concentração-resposta das misturas obtidas experimentalmente com os resultados das substâncias testadas individualmente e com os modelos de previsão.....	99
6.1.3- Comparação dos modelos celulares: hepatócitos primários de rato e células HepaRG.....	102
6.2- Estudo dos mecanismos celulares envolvidos na hepatotoxicidade da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura.....	106
6.3- Avaliação do impacto da mistura no perfil metabólico da BZP e da TFMPP.....	110
6.3.1- Escolha do método para avaliação metabólica da BZP, TFMPP e mistura.....	110
6.3.2- Avaliação das interações metabólicas entre a BZP e TFMPP.....	111
6.4- Estudos futuros.....	113
7- Conclusão.....	114
8- Bibliografia.....	117

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Curvas de concentração-resposta para a inibição da recaptação de [3H]NE, [3H]DA e [3H]5-HT em células KEH 293 transfetadas com NAT, DAT e SERT, induzida pela TFMPP (A) e pela BZP (B) (Simmler et al. 2014).....21
- Figura 2-** Gráfico de libertação de monoaminas em células HEK293 após incubação com 100µM de BZP e TFMPP. Foram usados como controlos a nisoxetina, o mazindol e o citalopram para a libertação de NA, DA e 5-HT respetivamente (Simmler et al. 2014).....21
- Figura 3-** Concentrações plasmáticas da BZP e dos seus metabolitos hidroxilados (3-OH-BZP e 4-OH-BZP) no período de 24 horas após a administração de uma dose oral de 200 mg de BZP (n=7 homens) (Antia et al. 2009a).....24
- Figura 4-** Representação esquemática das vias metabólicas da BZP. 1- Hidroxilação; 2- Metilação; 3- N-desalquilação; COMT- Catecol-O-metiltransferase. Adaptado de Arbo et al (2012).....26
- Figura 5-** Concentrações de BZP e seus metabolitos hidroxilados na urina pura (A) e na urina após hidrólise enzimática (B), após administração oral de 200 mg de BZP (n=7 homens saudáveis) (Antia et al. 2009a).....27
- Figura 6:** Representação esquemática dos metabolitos conjugados por sulfatação da BZP. Adapatado de Antia et al. (2009a).....28
- Figura 7:** Concentrações plasmáticas médias da TFMPP nas duas fases de distribuição, nas 24 horas após administração de uma dose oral de 60 mg de TFMPP (n=6) (Antia et al. 2010).....30
- Figura 8:** Concentrações plasmáticas médias do metabolito hidroxilado da TFMPP (4-OH-TFMPP) nas duas fases de distribuição, nas 24 horas após administração de uma dose oral de 60 mg de TFMPP (n=6) (Antia et al. 2010).....31
- Figura 9:** Representação esquemática dos metabolitos da TFMPP identificados na urina de rato e outros potenciais metabolitos conjugados. Adapatdo de Antia et al. (2010).....32

Figura 10: Representação esquemática das vias metabólicas da TFMPP. 1- Hidroxilação; 2- N-desalquilação; 3. N-acetilação. Adaptado de Antia et al. (2009)....33

Figura 11: Efeitos da MDMA, BZP, TFMPP e mistura BZP:TFMPP nos níveis extracelulares de DA e 5-HT no *nucleus accubens* de ratinhos Sprague-Dawly após uma injeção ao tempo zero de 1 mg/Kg (MDMA) e 3 mg/Kg (BZP, TFMPP e BZP:TFMPP) e aos 60 minutos de 3 mgKg (MDMA) e 10 mg/Kg (BZP, TFMPP e BZP:TFMPP). Os resultados apresentados resultam da medição feita 20 minutos após a administração das injeções (Baumann et al. 2004).....37

Figura 12: Perfil concentração-tempo da BZP (A) e TFMPP (B) após administração intraperitoneal, individualmente e em mistura, de uma dose de 2 mg/Kg em ratinhos Wistar (n=3) (Wada et al. 2012).....40

Figura 13- Redução do MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) pelas redutases mitocondriais a um derivado de formazano.....57

Figura 14- Reação de oxidação da luciferina catalisada pela luciferase na presença de ATP.....61

Figura 15- Mecanismo genérico de derivatização usando como reagente o anidrido trifluoroacético (TFAA), obtendo como derivados o O-TFA e N-TFA.....69

Figura 16- Curvas de concentração-resposta da BZP e da TFMPP em hepatócitos primários de rato. Os resultados experimentais encontram-se representados por círculos, correspondendo as diferentes cores a diferentes experiências independentes. Os dados foram obtidos com cinco experiências independentes (cada concentração foi testada em triplicado), através do ensaio de redução do MTT, após 24 horas de incubação.....76

Figura 17- Curvas de concentração-resposta da BZP e da TFMPP em células HepaRG diferenciadas. Os resultados experimentais encontram-se representados por círculos, correspondendo as diferentes cores a diferentes experiências independentes. Os dados foram obtidos com, pelo menos, cinco experiências independentes e as concentrações testadas em três replicados, através do ensaio de redução do MTT, após 24 horas de incubação.....76

Figura 18- Absorvâncias obtidas no ensaio de redução do MTT, após incubações de 24 horas, para os controlos negativos (sem DMSO e com 1% de DMSO). Os resultados são apresentados pela média $\pm$ SEM. Teste t Student desemparelhado ($p > 0,05$).....76

Figura 19- Curvas de concentração-resposta da BZP e da TFMPP em hepatócitos primários de rato (linha vermelha) e células HepaRG diferenciadas (linha cinzenta). As curvas foram traçadas pela função assimétrica logit (linhas contínuas) e as linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%.....77

Figura 20- Mortalidade provocada pela mistura de BZP e pela TFMPP em concentrações proporcionais aos respectivos valores de EC₅₀ em células HepaRG (A) e em hepatócitos primários de rato (B). Os dados foram obtidos em, pelo menos, três experiências independentes através do ensaio de redução do MTT após 24 horas de incubação. A função assimétrica logit, traçada a partir dos dados experimentais, é representada pela linha preta contínua. As linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%. As linhas contínuas vermelha (AC) e roxa (AI) representam a previsão para a mistura EC₅₀ obtida através dos modelos AC e AI, respetivamente.....79

Figura 21- Mortalidade provocada pela mistura de BZP e pela TFMPP em concentrações proporcionais aos respectivos valores de EC₀₁ em células HepaRG (A) e em hepatócitos primários de rato (B). Os dados foram obtidos em, pelo menos, três experiências independentes através do ensaio de redução do MTT após 24 horas de incubação. A função assimétrica logit, traçada a partir dos dados experimentais, é representada pela linha preta contínua. As linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%. As linhas contínuas vermelha (AC) e roxa (AI) representam a previsão para a mistura EC₀₁ obtida através dos modelos AC e AI, respetivamente.....80

Figura 22- Mortalidade na linha celular HepaRG provocada pela BZP e pela TFMPP, em concentrações correspondentes ao seu EC₀₁ (2,0371 mM e 0,1797 mM, respetivamente), quando presentes quer isoladamente, quer em mistura (Mistura B). A linha a tracejado representa o somatório dos efeitos individuais, obtido pelo cálculo da soma aritmética dos efeitos individuais da BZP e da TFMPP. Os resultados correspondem à média $\pm$ SEM. Teste *t* Student desemparelhado (***) $p < 0,001$)......81

Figura 23- Curvas de concentração-resposta da mistura C em células HepaRG (A) e em hepatócitos primários de rato (B) obtidas experimentalmente e previstas pelos modelos AC e AI. A função assimétrica logit, traçada a partir dos dados experimentais, é representada pela linha preta contínua. As linhas a tracejado representam o seu intervalo de confiança de 95%. As linhas contínuas vermelha (AC) e roxa (AI) representam a previsão para a mistura realista obtida através dos modelos de adição de concentração e de ação independente, respetivamente.....82

Figura 24- Efeitos da BZP, TFMPP e mistura C na produção de espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e NOS) nos hepatócitos primários de rato após 24 horas de incubação a 37°C. Os resultados são apresentados pela percentagem de produção de ROS e NOS relativamente ao controlo (média $\pm$ SEM) e foram obtidos através de quatro experiências independentes, realizadas em seis replicados. As comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Dunn's. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, relativamente ao valor do controlo).....84

Figura 25- Efeitos da BZP (A), TFMPP (B) e mistura (C) no nível total de glutathione (tGSH), glutathione reduzida (redGSH) e dissulfido de glutathione (GSSG) nos hepatócitos primários de rato após 24 horas de incubação a 37°C. Os resultados são apresentados pela média $\pm$ SEM de cinco ensaios independentes. As comparações estatísticas foram feitas pelo teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, quando comparado com o controlo de redGSH; (* $p < 0,05$, quando comparado com o controlo de GSSG).....85

Figura 26- Efeitos da BZP, TFMPP e mistura C no conteúdo intracelular de ATP nos hepatócitos primários de rato após 24 horas de incubação a 37°C. Os resultados são apresentados pela média $\pm$ SEM de cinco ensaios independentes. As comparações estatísticas foram feitas pelo teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$, relativamente ao valor do controlo)....86

Figura 27- Efeitos da BZP, TFMPP e mistura C na incorporação na mitocôndria do etil-éster de tetrametilrodamina (TMRE) como medida da integridade da membrana mitocondrial, após 24 horas de incubação, a 37°C, em hepatócitos primários de rato. Os resultados são apresentados em percentagem relativamente ao controlo (média $\pm$ SEM). Os resultados foram obtidos em quatro experiências independentes realizadas em seis replicados. As comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Dunn's.....88

Figura 29- (A) Cromatograma representativo de uma solução de calibração (vermelho) contendo padrão interno (verde), BZP (amarelo) e TFMPP (azul) injectada no GC-MS após extração e derivatização com o anidrido trifluoroacético (TFAA). **(B)-** Espectro de massa do padrão interno, da BZP e da TFMPP.....92

Figura 30- Aspecto característico de uma cultura de hepatócitos primários isolados de rato.....104

Figura 31- Aspecto característico de células HepaRG não diferenciadas (A) e após 15 dias de diferenciação com 2% de DMSO (B).....	105
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estruturas e fórmulas químicas da piperazina e dos seus principais derivados.....	7
Tabela 2: Propriedades físico-químicas da BZP e da TFMPP (Caccia S 1990).....	9
Tabela 3: Perfil toxicocinético da BZP e metabolitos hidroxilados em humanos. Adaptado de Antie et al. (2009a).....	23
Tabela 4: Perfil toxicocinético da TFMPP e 4-OH-TFMPP em humanos adultos, após administração de uma dose única de 60 mg (n=6) (Antia et al. 2010).....	29
Tabela 5- Efeitos subjetivos observados em humanos após uma administração de 200 mg de BZP, 60 mg de TFMPP e da mistura 100/30 mg de BZP:TFMPP. Adaptado de Lin et al. (2011).....	35
Tabela 6: Parâmetros farmacocinéticos da BZP e da TFMPP após administração de uma dose de 2 mg/Kg de BZP e TFMPP isoladamente e em mistura em ratinhos machos Wistar. Adaptado de Wada et al. (2012).....	40
Tabela 7- Lista de reagentes utilizados na realização dos procedimentos experimentais e respectivos locais de aquisição.....	48
Tabela 8- Lista de reagentes utilizados na realização dos procedimentos experimentais e respectivos locais de aquisição.....	67
Tabela 9- Concentrações (mM) selecionadas para os ensaios metabólicos.....	68
Tabela 10- Iões selecionados para identificação das substâncias em GC-MS e respectivos padrões de fragmentação.....	71
Tabela 11- Parâmetros obtidos para as curvas de concentração-resposta das substâncias individuais e das misturas em hepatócitos primários de rato e na linha celular HepaRG, desenhadas com recurso à função assimétrica logit.....	74
Tabela 12- Valores de EC ₅₀ previstos pelos modelos CA e IC para a Mistura A, B e C para os hepatócitos primários de rato e células HepaRG.....	75

Tabela 13- Concentrações da BZP, TFMPP e Mistura C e concentrações individuais de BZP e TFMPP na mistura C (mM), correspondentes aos três níveis de citotoxicidade utilizados para avaliação do stress oxidativo e integridade mitocondrial nos hepatócitos primários de rato (EC20, EC40 e EC60).....	83
Tabela 14- Substâncias identificadas com base nos respetivos iões selecionados com base no padrão de fragmentação, após derivatização com o anidrido trifluoroacético (TFAA).....	89
Tabela 15- Curvas de calibração para a BZP e TFMPP.....	94
Tabela 16- Concentração (mM) quantificada pelo método de GC-MS, nos sobrenadantes dos hepatócitos primários de rato expostos à BZP, à TFMPP e à mistura A em duas concentrações distintas (EC60 e EC10).....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-MTA- 4-metiltioanfetamina

5-HT- Serotonina

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AMP- Adenosina monofosfato

ANOVA- Análise da variância

ATP- Adenosina 5'-trifosfato

BHE- Barreira hemato-encefálica

BZP- Benzilpiperazina

CA- Modelo de adição de concentrações

CAR- *Constitutive androstane receptor*

Cl/F- Clearance/biodisponibilidade

C_{max}- Concentração máxima

COMT- Catecol-O-metil-transferase

CYP450- Citocromo P 450

d-AMP- d-anfetamina

DA- Dopamina

DAT- Transportador de dopamina

DCF-2',7'- diclorofluoresceína

DCFH- 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA - diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

DIV-145- Befuralina

DMSO- Dimetilsulfoxido

DTNB- 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico)

e.g.- "*exempli gratia*" - por exemplo

EDTA- Ácido etilenodiamina tetra-acético

EGTA- Ácido etilenoglicol-bis (beta-aminoetil)-N,N,N',N'-tetra-acético

EGYT-475- Trebilet

EUA- Estados Unidos da América

FBS- Soro fetal bovino

GABA- Ácido gama-aminobutírico

GC-MS- Cromatografia gasosa com detetor de massa

GPX- Glutathione peroxidase

GR- Glutathione reductase

GSH- Glutathione reduzida

GSSG- Dissulfido de Glutathione

HBSS- Solução- tampão salina de Hank (Hank's Balanced Sal Solution)

HEK 293- Células embrionárias renais 293

HEPES- Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico

i.v.- intra-venoso

IA- Modelo das acções independentes

IMC- Índice de massa corporal

LSD- Ácido lisérgico

mCPP- 1-(3-clorofenil)piperazina;

MDBP - 1-(3,4-metilenodioxil)benzilpiperazina

MDMA- 3,4-Metildioximetanfetamina

METH- Metanfetamina

MPTP- Poro de permeabilidade transitória mitocondrial

MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NA- Noradrenalina

n.d.- Não detetado

NADPH- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NAT- N-acetiltransferase

NOS- Espécies reativas de azoto

OEDT- Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência

OH-BZP- Hidroxi-benzilpiperazina

OH-TFMPP- Hidroxi-1-(3-trifluorometilfenil)piperazina

pFPP- 1-(4-fluorofenil)piperazina

pH- Potencial de hidrogénio

PI- Padrão Interno

pKa- Constante de acidez

pMeOPP - 1-(4-metoxifenil)-piperazina

PXR- *Pregnane X receptor*

QTc- Intervalo QT corrigido

R²- Coeficiente de determinação

ROS- Espécies reativas de oxigénio

rpm- Rotações por minuto

SERT-Transportador de serotonina

SH- Grupo sulfidrílo

SNC- Sistema Nervoso Central

SOD- Superóxido dismutase

SPE- Extração em fase sólida

SULT- Sulfotransferase

T ½ - Tempo de semi-vida

TFAA- Anidrido Trifluoroacético

TFMPP- 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina

TGI- Trato gastro-intestinal

tGSH-Glutationa total

TMRE- Etil-éster de tetrametilrodamina

TNB- Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

UGT- Uridina difosfato glucoroniltransferase

WADA- Agência Mundial Anti-Dopping

1- ENQUADRAMENTO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O consumo de drogas sempre existiu na história da humanidade, constituindo um flagelo mundial e um foco gerador de problemas sociais e económicos (WHO 2013). Ao longo do tempo apresentou inconstâncias quanto ao tipo e à forma de abuso e constituiu-se característica essencial de diferentes culturas, rituais religiosos, relações humanas e práticas medicinais. Contudo, foi no século XX que os consumos abusivos se generalizaram e intensificaram devido à confluência de fatores económicos, sociais, culturais e da evolução dos meios de comunicação (Maldonado AL 1998).

Paralelamente à massificação do consumo de substâncias psicoativas, o mercado das drogas também tem vindo a estar mais diversificado, tendo-se verificado que diariamente são sintetizadas novas moléculas, denominadas por “legal highs”, “smarts”, “boosters”, entre outras designações, que surgem da necessidade dos consumidores vivenciarem novas sensações e experiências diferentes, com menores riscos para a saúde. Por outro lado, os produtores/distribuidores procuram também introduzir novos produtos para satisfazerem as demandas do mercado, contornando a lei vigente e desafiando as autoridades mundiais do controlo de droga (Burillo-Putze et al. 2011; Crime 2012; McNabb et al. 2012; Zawilska 2011; Zukiewicz-Sobczak et al. 2012). Estas drogas são normalmente procuradas por consumidores jovens e em contextos de festas de dança “rave”, mas também se encontram muitas vezes associadas às drogas ilegais, sendo frequentemente consumidas como adulterantes. O abuso deste tipo de drogas também constitui uma “porta de entrada” para o consumo intencional de drogas ilícitas e mais perigosas (um em cada sete consumidores de drogas ilícitas afirmaram ter começado o consumo de drogas pelas drogas legais) (Cohen and Butler 2011; Wilkins et al. 2006). No entanto, estas drogas carecem de estudos de segurança, não estando disponível para o consumidor qualquer informação acerca das suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, contra-indicações, interações e advertências de consumo. Por este motivo, as consequências para a saúde das novas drogas que constantemente surgem no mercado são desconhecidas e difíceis de prever, o que despoleta a necessidade de empreender estudos toxicológicos urgentes que permitam esclarecer os seus malefícios para o organismo humano (Gee and Fountain 2007; Staack and Maurer 2005; Zawilska 2011).

Para além do desconhecimento da toxicidade de uma grande maioria destas drogas “boosters”, agora ilícitas, também estão pouco compreendidos os efeitos resultantes da associação de substâncias deste tipo. Assim, o estudo da toxicidade de misturas é sobejamente negligenciado, apesar da sua vital importância no contexto do abuso de drogas (dado o facto destas substâncias serem raramente administradas de forma isolada).

A benzilpiperazina (BZP) e a 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) constituem duas drogas de abuso que se inserem nesta classe de compostos e são frequentemente consumidas em associação. Os seus efeitos tóxicos não estão completamente clarificados e considera-se que constituem perigo para a saúde pública. Ademais, as incongruências encontradas entre as concentrações de BZP e TFMPP presentes no soro e/ou tecidos dos consumidores e os efeitos tóxicos revelados nessas mesmas pessoas têm apontado para a importância de se considerarem as possíveis interações devido ao consumo de múltiplas substâncias (por exemplo drogas de abuso, tabaco, álcool, cannabis, etc) na ocorrência de toxicidade, admitindo-se que, atuando em conjunto, estas drogas possam ver aumentada a magnitude dos seus efeitos, podendo mesmo estar na origem de intoxicações fatais (Cohen and Butler 2011; EMCDDA 2009).

Desta forma, e sendo frequente as práticas de policonsumo de drogas de abuso (Mohamed et al. 2011), o estudo da incidência, dos padrões de consumo e das interações entre as substâncias pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade dos compostos envolvidos, auxiliando no diagnóstico de intoxicações súbitas e letais e permitindo ainda implementar novos procedimentos para prevenir e/ou antagonizar os efeitos tóxicos agudos e/ou crónicos provocados (Dias da Silva et al. 2013a; Dias da Silva et al. 2013b; Lerie t al. 2003). A compreensão das interações entre drogas e das suas consequências nos seus efeitos biológicos pode também ter uma influência considerável na saúde pública ao elevar a consciência relativamente ao potencial de toxicidade das misturas e, consequentemente, levando a uma mudança nos comportamentos do consumidor (Dias da Silva et al. 2013b).

Com base no aumento exponencial do consumo das “legal highs”, na escassez de estudos sobre a toxicidade de misturas de piperazinas e na compreensão incompleta dos mecanismos subjacentes à toxicidade destas misturas, foi proposto o tema da presente dissertação de mestrado. Apesar de atualmente proibidas (sendo consideradas legais à data da proposta do tema), as piperazinas continuam disponíveis no mercado ilícito e são facilmente acessíveis através da Internet, mantendo-se, portanto, a preocupação e o interesse de investigação (Monteiro et al. 2013).

A presente dissertação encontra-se dividida em três partes. A primeira parte corresponde a uma introdução na qual é feita uma revisão da informação disponível na literatura científica. Esta secção foca essencialmente a toxicodinâmica e toxicocinética da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura. A segunda parte contém uma descrição dos trabalhos experimentais e das metodologias utilizadas na sua realização.

Por último, a terceira parte da dissertação consiste na apresentação dos resultados, na sua discussão no âmbito de cada trabalho experimental, e conclusões finais.

2- INTRODUÇÃO

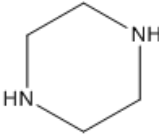
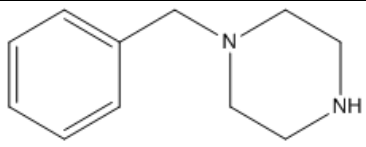
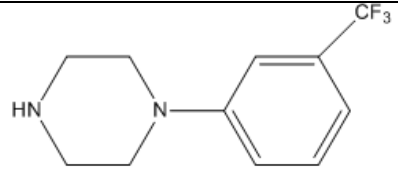
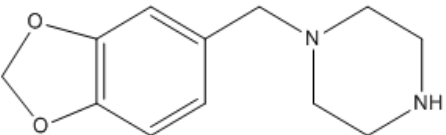
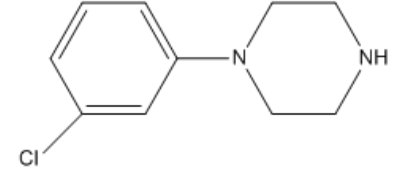
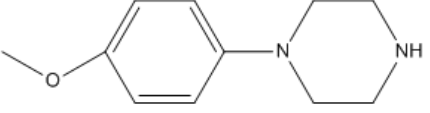
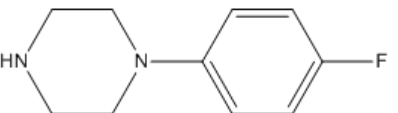
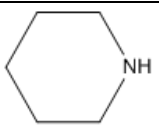
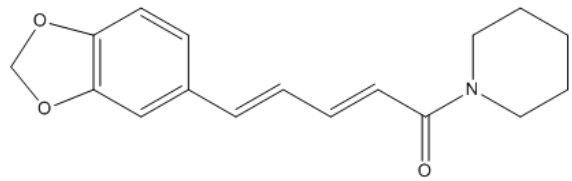
A família das piperazinas é constituída por várias substâncias com efeitos psicoativos e, apesar do seu estatuto ilegal em alguns países, estas drogas são das mais vendidas em todo o mundo (Barroso et al. 2010; Lee et al. 2011; Sheridan et al. 2007; Wood et al. 2008). Apesar de proibidos, os derivados piperazínicos podem ser adquiridos no “mercado negro” ou através da Internet e são muitas vezes comercializados como “Ecstasy” ou com nomes como “Rapture”, “Frenzy”, “Bliss”, “Charge”, “Herbal Ecstasy”, “A2”, “Legal X” ou “Legal E2” (Arbo et al. 2012; Davies et al. 2010).

Os derivados piperazínicos são totalmente sintéticos e são obtidos a partir de dois grupos estruturais importantes, a 1-benzilpiperazina e a 1-fenilpiperazina, formando assim duas classes: as benzilpiperazinas e as fenilpiperazinas, sendo a benzilpiperazina (BZP) e a 1-(3-trifluorometilfenil) piperazina (TFMPP), as substâncias mais consumidas destas classes, respetivamente (Lin et al. 2011; Wada et al. 2012). Outros exemplos de substâncias pertencentes ao grupo das piperazinas são a 1-(3,4-metilenodioxil)benzilpiperazina (MDBP), a 1-(3-clorofenil)piperazina (*m*CPP), a 1-(4-metoxifenil)-piperazina (*p*MeOPP) e a 1-(4-fluorofenil)piperazina (*p*FPP) (Antia et al. 2010; Cioli et al. 1984; de Boer et al. 2001; Staack et al. 2002) (tabela 1). Existe ainda um terceiro grupo de derivados piperazínicos que incluem as tienilmetilpiperazinas (Arbo et al. 2012).

A piperazina, designada também por 1,4-diazaciclo-hexano, piperazidina ou perhidro-1,4-diazina (O’Neil MJ 2006) é uma molécula básica que surgiu em 1954 como solvente do ácido úrico sendo, desta forma, usada no tratamento da gota e reumatismo (Davies et al. 1954). A piperazina é constituída quimicamente por um anel de 6 átomos contendo dois átomos de azoto em posições opostas ligados a quatro átomos de carbonos distribuídos entre os dois átomos de azoto (Vorce et al. 2008). Nas fenilpiperazinas o átomo de azoto está ligado a um grupo fenilo, enquanto nas benzilpiperazinas está ligado a um grupo benzilo (um grupo metilo separa o anel aromático do grupo heterocíclico).

A génese da designação piperazina está possivelmente relacionada com a similaridade estrutural com a piperidina, um constituinte do alcalóide piperina existente na pimenta preta (“*Piper nigrum*”). A piperina encontra-se nos frutos da pimenta preta e noutras plantas da família *Piperaceae* e, quando extraída a temperaturas elevadas, em condições alcalinas e meio alcoólico, origina a piperidina (tabela 1) (O’Neil MJ 2006).

Tabela 1- Estruturas e fórmulas químicas da piperazina e dos seus principais derivados.

Composto	Estrutura Química
Piperazina	
Benzilpiperazina (BZP)	
1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (mTFMPP)	
1-(3,4-metilenodioxi)benzilpiperazina (MDBP)	
1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP)	
1-(4-metoxifenil)-piperazina (pMeOPP)	
1-(4-fluorofenil)piperazina (pFPP)	
Piperidina	
Piperina	

2.1- Benzilpiperazina e 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina

2.1.1- Características físico-químicas

As piperazinas, tal como a BZP e a TFMPP, são bases orgânicas, apresentando um valor da constante de ionização (pKa) sempre superior a 8 (Bishop et al. 2005). As demais propriedades físico-químicas encontram-se descritas na tabela 2.

A BZP, também conhecida como 1-benzil-1,4-diazaciclohexano ou N-benzilpiperazina, é uma diamina sem estereoisómeros, com estrutura química similar à dopamina (DA) e às anfetaminas (Lin et al. 2011). Está disponível na forma de base livre ou cloridrato (BZP.2HCl) (EMCDDA 2007). A forma de base é corrosiva e apresenta-se como um líquido viscoso claro, ligeiramente verde-amarelado (Schep et al. 2011). O sal cloridrato é um sólido branco, altamente solúvel em água e irritante para os olhos, sistema respiratório e para a pele (EMCDDA 2007; Schep et al. 2011).

A BZP pode ser obtida através da reação do hidrocloreto de piperazina com o cloreto de benzilo. Outros métodos descritos incluem a reação entre o hexahidrato de piperazina, o monohidrato de dihidrocloreto de piperazina e o cloreto de benzilo, reação esta que origina como produto dominante o dihidrocloreto de BZP e uma mistura equimolar de BZP hexahidratada e cloreto de benzilo (Arbo et al. 2012; Yeap 2010).

O grau de impurezas da BZP obtido depende das quantidades e qualidade dos reagentes, das condições da reação e dos procedimentos usados para extrair a droga da mistura reacional (Antia et al. 2009d).

A TFMPP é uma 1-arilpiperazina (Staack et al. 2003) e apresenta três isómeros relacionados com a substituição do CF₃ nas posições 2-, 3- e 4- (orto-, meta- e para-, respetivamente) (figura 2). Na literatura a abreviatura TFMPP normalmente corresponde à 3-TFMPP (Elliot and Smith 2008).

Na tabela 2 estão enunciadas as propriedades físico-químicas das duas piperazinas em estudo.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas da BZP e da TFMPP (Caccia 1990).

Composto	BZP	TFMPP
Fórmula	C ₁₁ H ₁₆ N ₂	C ₁₁ H ₁₃ F ₃ N ₂
Massa Molecular (g/mol)	176,26	230,23
Ponto de ebulição (°C)	145	65-72
pKa (37°C)	9,59	8,66

2.1.2- Perspetiva histórica

2.1.2.1- Piperazinas e a Indústria Farmacêutica

A BZP foi sintetizada pela primeira vez em 1944, no Reino Unido, pelos Laboratórios “Welcome & Co”, como um potencial fármaco anti-helmíntico para o tratamento de infestações parasitárias (em veterinária). No entanto, a sua baixa eficácia e os efeitos indesejáveis, como as convulsões, levaram a que nunca tivesse lugar no mercado farmacêutico. Atualmente, apenas é utilizada como uma alternativa no tratamento da ascariose e enterobiose (Bye et al. 1973; Campbell et al. 1973; Katzung 2007; Tsutsumi et al. 2006).

Mais tarde, na década de 70, foi descoberto em experiências em ratos e ratinhos o seu potencial antidepressivo, uma vez que se observou que revertia os efeitos sedativos da tetrabenazina, um agente depletor da DA usado para o tratamento dos distúrbios hipercinéticos do movimento, como acontece na Doença de Huntington (Cohen and Butler 2011; Fantegrossi et al. 2005; Li et al. 2011). Verificou-se também que constituía um metabolito ativo dos antidepressivos piberalina, trebilet (EGYT-475 ou fumarato de N-benzil-piperazina-piconil) e befuralina [DIV-145 ou 1-benzofurano-2-il(4-benzilpiperazina-il)metanona] (Elliot and Smith 2008; Kerr 2011; Magyar 1987; Tekes et al. 1987; Tsutsumi et al. 2006). O pró-fármaco DIV-145 chegou a ensaio clínicos de fase II, tendo revelado efeitos antidepressivos tão eficazes como a imipramina e com efeitos secundários limitados (Gastpar et al. 1985). No entanto, a sua utilização como antidepressivo foi rejeitada uma vez que, em elevadas dosagens, se observou que produzia um efeito idêntico ao das anfetaminas em ratos (Elliot and

Smith 2008), inclusivamente, um elevado potencial de abuso (Bye et al. 1973; Campbell et al. 1973; Cohen and Butler 2011; Staack et al. 2002).

No que diz respeito à TFMPP, a informação científica é consideravelmente mais limitada. A TFMPP foi identificada nos anos 70, como sendo um metabolito da antrofenina, um fármaco utilizado como anti-inflamatório e analgésico, tendo este último sido descontinuado devido ao aparecimento de fármacos com melhor perfil terapêutico (Elliot and Caroline 2012); e metabolito da fluprazina, um protótipo das chamadas *serenics drugs*, que consistem em fármacos utilizados para a diminuição de comportamentos agressivos (Rodgers et al. 1992). A TFMPP constitui parte da estrutura química de outras moléculas com potencial farmacológico como a terciprazina, o frabuprofeno e o loripirazole (Staack et al. 2003).

Apesar das piperazinas estarem descritas como “medicamentos falhados”, encontram-se disponíveis no mercado farmacêutico alguns fármacos que contém a sua estrutura molecular, nomeadamente agentes antipsicóticos (olanzapina, clozapina), antidepressivos (trazodona, nefazodona), fármacos para o tratamento da disfunção erétil (sildenafil, verdenafil) e antibióticos (ciprofloxacina) (EMCDDA 2007; Vorce et al. 2008).

2.1.2.2- Piperazinas como droga de abuso

A BZP surgiu como droga recreativa na Nova Zelândia, no início da década de 90, embora o primeiro caso reportado de abuso tenha sido descrito na Califórnia (Estados Unidos da América), em 1996. A partir de Janeiro de 2000, encontrava-se comercializada na Internet, para todo o mundo, com a classificação de “herbal high”, dada a sua semelhança estrutural com a piperidina existente na pimenta preta (Cohen and Butler 2011; de Boer et al. 2011; Li et al. 2011; Wikstrom et al. 2004).

Na Nova Zelândia, maior país consumidor de “party-pills”, existem mais de 120 marcas de “BZP-party pills” (Gee et al. 2008) e, em 2005, estimou-se que foram vendidas 150.000 doses por cada mês (Antia et al. 2009d; Monteiro et al. 2013). Atualmente, estima-se que o negócio das “BZP-party pills” movimenta em todo o mundo aproximadamente 27 milhões de euros por ano (Cohen and Butler 2011; Monteiro et al. 2013). Para além do uso como droga recreativa, a BZP foi usada como agente dopante em cavalos de corrida (Kerr 2011) e em atletas, tendo sido proibido o seu consumo, em Janeiro de 2007, pela Agência Mundial Anti-dopping (WADA) (Gee and Richardson 2005; Kerr 2011; Monteiro et al. 2013; WADA 2006).

Na Nova Zelândia, dada a falta de evidência do potencial de abuso e de perigo para a saúde, até de Abril de 2008 as piperazinas estavam legalmente acessíveis a pessoas a partir dos 18 anos de idade (proibida apenas a venda, oferta de amostras e publicidade a menores de idade, desde 2005), o que permitiu criar um mercado único e extenso de “BZP-party pills”. A partir dessa data, após revisão farmacológica, toxicológica e epidemiológica da BZP, considerou-se que a substância apresentava um “risco moderado” para a saúde humana, tendo sido, tanto a BZP como os seus análogos, reclassificada pelo “Misuse of Drugs Act (1975)” e inserida na mesma classe da *cannabis* (Classe C1). Assim, ficou proibido o seu fabrico, importação, exportação, venda, oferta, consumo e publicidade (Cohen and Butler 2011; Kerr 2011).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o aumento do consumo da BZP e da TFMPP, o seu potencial de abuso, o perigo para a saúde do consumidor e a falta de evidência de benefício terapêutico, levou a que fossem, em 2002, temporariamente classificadas na escala 1 do “Controlled Substances Act”. Deste modo, conseguiu-se desde cedo limitar o desenvolvimento do seu consumo nos EUA. Em 2004, a BZP incluiu-se, permanentemente, na escala 1 do “Controlled Substances Act”, enquanto a TFMPP foi retirada dessa escala por falta de evidência científica e objectiva de perigo para a saúde, permanecendo dessa forma nos dias de hoje (FDA 2014; Lin et al. 2011; Staack et al. 2003; Vorce et al. 2008; Wilkins and Sweetsur 2010).

Medidas semelhantes foram, posteriormente, adoptadas no resto do mundo. No Japão e na Austrália, o consumo foi proibido em 2003 e 2006, respetivamente (Katagi et al. 2003; Tsutsumi et al. 2006). Em 2007, na Europa, após se ter verificado um aumento dos consumidores de BZP, o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) requereu uma avaliação formal dos riscos da BZP para a saúde, tendo resultado da emissão do relatório uma alteração do seu estatuto legal de consumo. No entanto, apesar de ter ficado esclarecido o perigo para a saúde, foi notória no relatório a falta de informação acerca dos efeitos farmacológicos e toxicológicos em humanos, a sua atividade a nível do Sistema Nervoso Central (SNC), a possível variabilidade interindividual na expressão da sua toxicidade devido a polimorfismos genéticos nas enzimas metabolizadoras e o potencial de interação com outras drogas (EMCDDA 2007; EMCDDA 2008; Monteiro et al. 2013; Wilkins and Sweetsur 2010).

Outro dos motivos que levou à reavaliação da legalidade das piperazinas foi o facto dos seus consumidores assumirem que um dos motivos, para além das propriedades estimulantes, sentimentos positivos, aumento do desempenho físico e mental, aumento da facilidade de socialização e supressão do apetite para controlo o peso, que os levava a consumirem estas drogas era o seu estatuto legal e, consequentemente, a crença errada que, por não serem proibidas eram seguras.

Adicionalmente, o seu baixo preço, a facilidade de acesso, por exemplo através da Internet (Cohen and Butler 2011; Sheridan and Butler 2010; Wilkins et al. 2006) e a forma fácil de administração através da ingestão de comprimidos coloridos com logotipos atrativos e aparentemente inofensivos, tornavam o consumo destes estupefacientes apelativo.

Embora já tenha sido um passo importante o Conselho Europeu ter decidido a necessidade de todos os Estados de Membros aplicarem medidas de controlo para a BZP, outras substâncias da mesma família, como a TFMPP, a mCPP e a MeOPP, comumente usadas em combinação com a BZP, não estão totalmente controladas (Staack 2007).

Em Portugal, a Lei n.º 18/2009, de 11 de Maio que veio proceder à décima sexta alteração ao Decreto-Lei nº15/93, de 22 de Janeiro, aprova o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, tendo acrescentando a BZP à tabela II-a, juntamente com a 3,4-metildioximetanfetamina (MDMA), 4-metiltioanfetamina (4-MTA) e a psilocina. Assim, a BZP passou a poder ser unicamente fornecida ao público para tratamento mediante apresentação de receita médica; pelo que, quem produzir, anunciar ou publicitar, vender ou ceder, importar ou exportar incorre na prática de uma contra-ordenação (GP 2009).

2.1.3- Formas de apresentação e composição, prevalência e padrão de consumo

A BZP é vulgarmente comercializada na forma de comprimido (com grande variedade de formas, cores, dimensões e símbolos impressos) ou cápsula, e ingerida em contexto de festas de dança “rave” (Sheridan and Butler 2010) sob a designação de “A2”, “XTX”, “Herbal Ecstasy”, ou outros (Cohen and Butler 2011; Staack et al. 2002; Tsutsumi et al. 2006). Embora menos comum, as piperazinas também podem ser encontradas sob a forma de líquido, havendo registo do seu uso intravenoso (i.v.) com o objetivo de obter um efeito mais rápido (Cohen and Butler 2011; Gee et al. 2008; Gee et al. 2005) ou ingeridas sob a designação de tónico social. A BZP também já foi apreendida na forma de pó, para uso por inalação, por ingestão em bebidas ou fumado enrolado com tabaco (“Hummer”) (Cohen and Butler 2011; Monteiro et al. 2013; Sheridan et al. 2007; Staack et al. 2003; Wilkins et al. 2006). No que diz respeito ao uso i.v. das piperazinas, foi relatado que é um método de consumo doloroso devido à alcalinidade da solução ($\text{pH} \geq 12$) (Gee and Richardson 2005).

As doses de BPZ por comprimido encontram-se normalmente entre 100 e 200 mg, no entanto, já foram analisados comprimidos contendo 1.000 mg de BZP (Cohen and Butler 2011; Gee et al. 2005).

A TFMPP é normalmente vendida em mistura e, mais raramente, sob a forma de base livre ou sal, em doses que variam entre 5 a 100 mg (Antia et al. 2010; Cohen and Butler 2011; de Boer et al. 2001; Vorce et al. 2008; Wilkins and Sweetser 2010). A dose pode variar consoante os efeitos pretendidos pelos consumidores, nomeadamente, doses menores são procuradas para obter efeitos empatogénicos (doses de aproximadamente 25 mg), enquanto doses entre os 75 e 105 mg promovem sensações entactogénicas (Berger 2003). Algumas das designações atribuídas à TFMPP são “Misty” ou “Molly”, devido à semelhança dos seus efeitos com a MDMA (DUSDE 2002).

As piperazinas são também, por vezes, encontradas em pastilhas de “ecstasy” como substituto da MDMA (Sheridan et al. 2007; Simmler et al. 2014; Wilkins et al. 2008; Wood et al. 2008). De forma a aumentarem a sua popularidade proporcionando efeitos diversificados, mais atrativos ou menos efeitos secundários, e para promoverem a imagem de que são naturais e, por isso, saudáveis e seguras, a BZP e a TFMPP são frequentemente misturadas ou adicionadas de outras substâncias, como por exemplo, cafeína, electrólitos, aminoácidos, extratos de plantas (e.g. pimenta preta e extrato de ginseng), entre outros (Butler and Sheridan 2007; Gee et al. 2008; Monteiro et al. 2013; Nicholson 2006; Sheridan and Butler 2010; Sheridan et al. 2007). As pastilhas com misturas de piperazinas contêm habitualmente maior quantidade em BZP e a mistura mais frequente é a de BZP:TFMPP em razões desde 2:1 até 10:1 (Cohen and Butler 2011; Thompson et al. 2006; Wilkins et al. 2006). As fórmulas contendo misturas de piperazinas mais comercializadas são a mistura de 100 mg de BZP e 50 mg de TFMPP conhecida por “Bliss” e a de 50 mg de BZP e 200 mg de TFMPP sob o nome de “Charge” (Arbo et al. 2012). Outros nomes atribuídos à mistura de BZP e TFMPP são o “Rapture” e “Exodus” (Austin and Monasterio 2004).

Paralelamente às misturas frequentemente encontradas nos comprimidos de piperazinas, muitos consumidores combinam ainda outras drogas como anfetaminas, ecstasy, cocaína, ketamina (Monteiro et al. 2013; Staack 2007), e principalmente álcool e tabaco (na Nova Zelândia, cerca de 89% dos consumidores de BZP revelaram ter consumido outras drogas simultaneamente) (Wilkins et al. 2008).

Em cada episódio de consumo é frequente a ingestão de duas a três pastilhas, apesar de já terem sido reportados casos de ingestão de oito ou mais pastilhas (Cohen and Butler 2011; Wilkins et al. 2006). Assim, a quantidade ingerida depende dos efeitos e rapidez desejados, do contexto e da experiência do consumidor, conhecedor da dose

necessária para atingir os efeitos pretendidos e evitar os efeitos agudos negativos (Butler and Sheridan 2007). Alguns consumidores (cerca de 30%) também revelaram tomar doses superiores à recomendada por acreditarem tratar-se de uma droga segura ou com um potencial de risco bastante inferior às drogas ilegais.

Uma vez que a Nova Zelândia é o maior país consumidor de “BZP-party pills”, a grande maioria dos conhecimentos acerca do seu uso advém de informações obtidas nesse país. Assim, estudos feitos na Nova Zelândia indicam que uma em cada cinco pessoas já consumiram piperazinas (aproximadamente 10 vezes num período de um ano), sendo a maioria dos consumidores do sexo masculino e estudantes entre os 18 e 24 anos (Cohen and Butler 2011; Gee et al. 2008; Wilkins and Sweetser 2010).

2.1.4- Efeitos biológicos e toxicológicos

Apesar da crença de que as “legal highs”, dado o seu estatuto de livre comercialização e consumo, são seguras, há diversos casos reportados e evidência clínica que apoiam a sua toxicidade e malefícios para a saúde física e comportamental do consumidor (Staack 2007).

A maioria dos estudos em humanos são estudos retrospectivos, baseados em relatos de consumidores de BZP e TFMPP e em admissões hospitalares com diagnóstico de intoxicação onde foram detetadas estas substâncias nos fluidos biológicos (Antia et al. 2010).

Como referido, a BZP e a TFMPP são bases orgânicas com propriedades irritantes pelo que, quando mastigadas, podem provocar lesões na boca e se forem inaladas, podem originar erosões da mucosa do septo nasal. Dadas as suas propriedades simpaticomiméticas, a inalação do pó com estas piperazinas, num mecanismo semelhante ao que acontece com os consumidores de cocaína (vasoconstrição continuada), pode causar perfuração do septo nasal, rinite atrófica e coriza intensa (DEA 2002; Smith et al. 2002).

Após ingestão da BZP são necessárias aproximadamente duas horas para se sentirem os efeitos (Bye et al. 1973; Cohen and Butler 2011; Gee and Richardson 2005) e a sua duração estimada é de quatro a oito horas, embora alguns efeitos possam perdurar até às 24 horas (Cohen and Butler 2011; Nikolova and Danchev 2008; Wikstrom et al. 2004).

Nos consumidores de BZP é comum verificar-se um aumento do seu estado de euforia e disforia, autoconfiança (Lin et al. 2009), atividade/vigor, perturbação do humor, desorientação e diminuição da tristeza e da fadiga (Grotewiel et al. 1994). Os

consumidores de TFMPP mostram-se normalmente mais ansiosos e confusos (Jan et al. 2010; Lin et al. 2011). Comparativamente à TFMPP, a BZP tem um efeito mais estimulante, no entanto, a primeira apresenta um maior efeito alucinogénio (Wood et al. 2008; Yarosh et al. 2007).

Em termos de efeitos sociais, os relatórios da EMCDDA reportam que não há evidência de violência e crimes associados ao consumo de piperazinas (EMCDDA 2009), e que o consumo não afeta negativamente as relações sociais, de trabalho ou escolares (Sheridan and Butler 2010).

A toxicidade mais significativa das piperazinas manifesta-se por sintomas como insónias (mais comum), dores de cabeça, náuseas, tremores, falta de concentração, perda de energia, tonturas, palpitações cardíacas, aumento da tensão arterial sistólica e diastólica, falta de ar, confusão, pensamentos estranhos, vômitos, perturbações de humor, ansiedade, alucinações visuais, depressão, retenção urinária, paranóia, alucinações auditivas, visão turva, dores no peito, xerostomia, sudorese, desidratação, bruxismo, trismo e midríase (Cohen and Butler 2011; Gee et al. 2005; Wilkins and Sweetser 2010).

O espectro de manifestações tóxicas leves é amplo, no entanto, outros efeitos mais graves mas com menor frequência, podem estar associados ao consumo de piperazinas. Estes efeitos compreendem a acidose metabólica e respiratória, convulsões tóxicas, hiponatremia (Gee and Richardson 2005; Wood et al. 2007), hipertermia (Gee et al. 2008), estados dissociativos (Wood et al. 2008), psicose paranóica aguda (Austin and Monasterio 2004), coagulação intravascular disseminada, rabdomiólise, doença renal aguda, falência multiorgânica (Berney-Meyer et al. 2012; Monteiro et al. 2013) e morte (Antia et al. 2009d).

Num estudo prospetivo realizado com o intuito de estudar os efeitos da BZP no sistema cardiovascular, verificou-se que 32% dos indivíduos apresentavam um prolongamento do intervalo QT corrigido (QTc), o que pode conduzir a arritmias ventriculares complexas e, consequentemente, à morte súbita (Gee et al. 2005). Por outro lado, verificou-se que a TFMPP não induz taquicardia, mas desenvolve bradicardia e hipotensão arterial em ratos (King and Holtman 1990).

No que diz respeito aos efeitos no comportamento motor, em estudos com voluntários humanos, a BZP demonstrou provocar hiperatividade, movimentos involuntários da cabeça, comportamentos estereotipados e tempo de reação diminuídos, associados à libertação da DA (Gee et al. 2005). Por outro lado, em ratos, a TFMPP não alterou a atividade psicomotora (Baumann et al. 2005).

Para além da toxicidade direta das piperazinas, podem-se verificar efeitos indiretos graves, uma vez que ao seu consumo podem estar associados

comportamentos de risco como, por exemplo, a condução perigosa até várias horas após administração (Cohen and Butler 2011; Thompson 2006).

Em todo o mundo foram relatados poucos casos fatais relacionados com o consumo de piperazinas (EMCDDA 2009). Na literatura estão registados, pelo menos, seis casos (Balmelli et al. 2001; Elliott and Smith 2008; Wikstrom et al. 2004), dois dos quais resultantes de um acidente rodoviário, um resultante de uma queda (Elliott and Smith 2008) e os três restantes resultantes de intoxicações nas quais foi determinada a presença de outras drogas, como MDMA e álcool (EMCDDA 2009). O facto de outras drogas ou acidentes estarem relacionadas com as mortes onde foram encontradas piperazinas nos fluído orgânicos, torna a relação consumo de piperazinas/morte de difícil esclarecimento (Cohen and Butler 2011).

Relativamente ao potencial das piperazinas para induzirem um consumo abusivo, estudos em animais mostraram que a BZP conduziu à auto-administração por macacos *rhesus* e ratos, fenómeno característicos de drogas com efeito de recompensa (Meririnne et al. 2006), no entanto, o mesmo não se verificou para a TFMPP, tendo-se mesmo observado efeitos aversivos (Fantegrossi et al. 2005; Lin et al. 2011). Este efeito pode explicar o facto da TFMPP dificilmente se encontrar disponível para consumo isoladamente (Wood et al. 2008). Assim, não é surpresa que a co-administração da BZP e da TFMPP constitui uma mistura com um potencial de reforço inferior à BZP quando administrada isoladamente (Fantegrossi et al. 2005). No que diz respeito à dependência física da BZP não existem evidências científicas que o comprovem. No entanto, pode-se verificar uma certa tolerância aos efeitos psicológicos e fisiológicos, sendo necessário o aumento das doses, em consumos crónicos, para obter os mesmos efeitos. Por outro lado, o facto de se aumentar a dose conduz a um aumento dos efeitos secundários, nomeadamente náuseas e dores de cabeça, o que, por si só, pode limitar o seu consumo em elevadas quantidades (Drugs 2004).

Os sintomas observados e relatados aquando do consumo de BZP e TFMPP são compatíveis com a síndrome simpaticomimética e com os efeitos alucinogénios observados para o consumo das anfetaminas e MDMA, respetivamente (Baumann et al. 2005; Bye et al. 1973; Campbell et al. 1973; Vorce et al. 2008; Yarosh et al. 2007). No entanto, para tal, são necessárias doses maiores, mais concretamente, a BZP apresenta cerca de 10% da potência da dexanfetamina, e a TFMPP menos de 30% da MDMA (Baumann et al. 2004; Baumann et al. 2005; Bye et al. 1973; Campbell et al. 1973; Cohen and Butler 2011; de Boer et al. 2001; Sheridan and Butler 2010; Wilkins and Sweetser 2010).

Estudos realizados em voluntários humanos mostraram que, após a administração de doses equipotentes de BZP e anfetaminas, os efeitos de ambas eram

indistinguíveis (Campbell et al. 1973). Por sua vez, a TFMPP proporciona efeitos levemente psicadélicos, semelhantes à dietilamina do ácido lisérgico (LSD) e à psilocibina (Lin et al. 2011).

O tipo e/ou a severidade dos efeitos estimulantes/tóxicos das drogas de abuso, e como tal, das piperazinas, não estão associados unicamente às características da droga e do seu modo de consumo (composto, dose, via de administração e frequência de consumo), mas também às características do consumidor (sexo, genética, fisiologia e patofisiologia – variabilidade interindividual), às condições de consumo (ambientes com elevadas temperaturas e stressantes, atividade física inerente à dança, falta de sono, desidratação) e ao co-consumo de outras substâncias (outras drogas de abuso, etanol, fármacos, alimentos, etc) (Berney-Meyer et al. 2012; Gee et al. 2008; Lee et al. 2011; Schep et al. 2011). A toxicidade aguda das piperazinas tem, portanto, uma origem multifatorial, sendo bastante difícil de prever. Relativamente ao sexo do consumidor, num estudo feito por Gee e Richardson (2005) verificou-se que as mulheres manifestam mais facilmente os efeitos secundários (1,3 vezes mais que os homens), o que pode encontrar justificação no facto dos indivíduos do sexo feminino apresentarem um menor peso corporal e, como tal, um menor volume de distribuição das drogas.

Os efeitos do consumo das piperazinas a longo prazo ainda não estão bem esclarecidos, no entanto, constam na literatura alguns estudos com o objetivo de os elucidar. Aitchison e Hughes (2006) avaliaram as consequências comportamentais em ratos após a administração intraperitoneal de 10 mg/Kg/dia de BZP, durante o equivalente ao intervalo da adolescência tardia à idade adulta precoce em humanos. Neste estudo verificou-se uma diminuição na interação social e da capacidade de resposta às alterações luminosas, o que pressupõe que a BZP interfere com mecanismos relacionados com a ansiedade sob ação da serotonina (5-HT), aumentando a probabilidade de desenvolvimento de estados ansiosos na idade adulta. Coerentemente com a informação científica de que a BZP apresenta efeitos mais pronunciados no sistema dopaminérgico, estes investigadores verificaram efeitos comportamentais relacionados com a diminuição de DA e, conseqüentemente, uma diminuição da atividade motora (Aitchison and Hughes 2006; Monteiro et al. 2013).

2.1.4.1- Hepatotoxicidade

O fígado é o principal órgão metabolizador das piperazinas estando, desta forma, exposto a uma concentração significativa destas drogas após a sua ingestão (Antia et al. 2009a; Lin et al. 2011). Como tal, constitui um dos principais alvos de

toxicidade, podendo resultar em disfunção hepática, lesão das células do fígado ou mesmo falência hepática. A resposta do fígado à exposição da droga depende da substância, da quantidade a que foi exposto, das células afetadas e da duração da exposição (aguda ou crónica) (Klaassen 2008).

Desde a utilização das piperazinas como anti-helmíntico que se conhece a sua toxicidade para o fígado. Um caso clínico de 1976 reporta a situação de uma mulher de 25 anos que se encontrava medicada para uma parasitose com fosfato de piperazina, durante 3 semanas. A utente desenvolveu uma hepatite, tendo a biópsia revelado, numa fase inicial, alterações nos hepatócitos, nomeadamente aumento do volume, vacuolização e necrose e, posteriormente, destruição da arquitectura das células hepáticas e aparecimento de neutrófilos e leucócitos nas proximidades dos ductos biliares (Hamlyn et al. 1976).

A lesão hepática induzida pelas piperazinas pode provocar uma hepatite reversível idêntica às virais (Navarro and Senior 2006) ou pode mesmo conduzir a formas mais graves provocando falência hepática aguda.

Os mecanismos de hepatotoxicidade subjacentes ao consumo de piperazinas ainda não estão estabelecidos, sendo poucos os estudos que auxiliam no seu esclarecimento. Entre a multiplicidade de mecanismos que podem estar na origem da hepatotoxicidade induzida por estas substâncias destacam-se, de uma forma geral, alterações na membrana celular e morte celular resultantes de ligações covalentes da droga às proteínas celulares, o que por sua vez, pode dar origem a aductos que funcionam como alvos imunológicos, despoletando uma reação imunológica (Beaune et al. 1987; Robin et al. 1997); fluxo anormal da biliar e alteração do fluxo sanguíneo hepático (Navarro and Senior 2006); indução de morte celular programada (apoptose) (Reed 2001); inibição da função mitocondrial levando à acumulação de espécies reativas que induzem stress oxidativo, com consequente peroxidação lipídica e morte celular (Pessayre et al. 2001).

2.1.5- Toxicodinâmica

Os mecanismos de ação exactos da BZP e da TFMPP ainda não estão completamente elucidados, no entanto, estudos têm vindo a demonstrar que ambas as drogas atuam a nível do SNC, num mecanismo que parece ser semelhante ao das anfetaminas, daí a coincidência de muitos dos efeitos biológicos e toxicológicos.

BZP

Ensaios feitos em roedores demonstraram que a BZP aumenta os níveis das monoaminas, principalmente DA e 5-HT, através do agonismo dos transportadores de DA (DAT), e, em menor extensão, dos transportadores de 5-HT (SERT), respetivamente. Assim, a BZP é transportada para o interior das células pelos transportadores de monoaminas onde interfere com as vesículas dos neurotransmissores levando, posteriormente, à sua libertação (Katzung 2007). A BZP inibe também a recaptação desses mesmos neurotransmissores, permitindo que aumentem a sua concentração na fenda sináptica (Baumann et al. 2005; Iversen et al. 2014; Lin et al. 2011; Lyon et al. 1986; Tekes et al. 1987; Vorce et al. 2008). No que diz respeito à DA, a BZP mostrou-se capaz de ativar os seus receptores pós-sinápticos (Schep et al. 2011).

A BZP revelou também aumentar a libertação de noradrenalina (NA) e impedir a sua recaptação neuronal em consequência da ativação dos receptores adrenérgicos α e β (Schep et al. 2011), mecanismo este que parece ser o responsável pelo aumento da pressão cardíaca, taquicardia e constrição de vasos sanguíneos verificados aquando do consumo de BZP (Baumann et al. 2004; Baumann et al. 2005; Elliott and Smith 2008; Gee et al. 2005; Lyon et al. 1986; Magyar 1987; Staack 2007; Staack et al. 2002; Tekes et al. 1987; Vorce et al. 2008).

TFMPP

Contrariamente à BZP, a TFMPP tem pouca semelhança com os estimulantes dopaminérgicos (Fantegrossi et al. 2005; Herndon et al. 1992) e não parece exercer nenhuma atividade adrenérgica (Herndon et al. 1992).

Estudos *in vivo* efetuados em ratos demonstram que um dos principais mecanismos de ação da TFMPP é a ativação indireta dos receptores pós-sinápticos serotoninérgicos (Auerbach et al. 1991). Quando administrada isoladamente, a TFMPP provoca um aumento seletivo de 5-HT, o que faz com que o seu mecanismo de ação seja quase exclusivamente serotoninérgico (Auerbach et al. 1990; Baumann et al. 2005; Herndon et al. 1992; Pettibone and Williams 1984), daí ser também utilizada como um marcador da atividade da 5-HT (agonista da 5-HT AB) em estudos, por exemplo, de respostas de animais a substâncias que estimulam diferentes populações de receptores 5-HT (Miranda et al. 2002).

A TFMPP é relativamente seletiva para os receptores 5-HT₁ e 5-HT₂, e pouco seletiva para os receptores 5-HT₃ (Robertson et al. 1992). É agonista do receptor 5-HT_{2C} (Conn and Sanders-Bush 1987) e agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A} (Schoeffter and Hoyer 1989), 5-HT_{1B} (Herndon et al. 1992) e 5-HT_{2A} (Grotewiel et al. 1994), o que justifica os seus efeitos alucinogénicos suaves e estimulantes (Glennon et al. 1988; Herndon et al. 1992; Schechter 1988; Vorce et al. 2008). Pensa-se que também pode inibir o ácido gama-aminobutírico (GABA) devido à sua atividade nos receptores 5-HT₃ (Cloezy-Tayarani et al. 1992; Lin et al. 2011).

Um estudo inovador realizado com voluntários humanos por Lee e colaboradores (2011) mostrou que, quando a 5-HT aumenta após a administração da TFMPP, ocorre uma resposta negativa onde os neurónios glutamatérgicos inibem as vias de libertação de 5-HT através do neurotransmissor inibitório GABA.

No que respeita à atividade da TFMPP nos receptores adrenérgicos, alguns autores demonstraram que esta substância apresenta uma afinidade muito fraca para os receptores α 2-adrenérgicos (Lucki and Frazer 1989). No entanto, esta atividade não é consensual entre os investigadores e necessita de estudos mais aprofundados.

Com o objetivo de determinar o perfil farmacológico de derivados piperazínicos, Simmler e colaboradores (2014) efectuaram um estudo *in vitro* comparativo da interação da BZP e da TFMPP com os transportadores da DA, 5-HT e NE. Foram feitos ensaios de inibição dos transportadores de recaptação das monoaminas e ensaios de libertação de monaminas mediada pelos transportadores submetendo células embrionárias renais 293 (HEK 293) a várias concentrações da BZP e da TFMPP durante 10 minutos. No ensaio de inibição dos transportadores de recaptação de monoaminas (DAT, SERT e transportador de noradrenalina - NAT) verificou-se que a BZP apresenta maior ação no NAT, enquanto a TFMPP inibe em maior percentagem o SERT e NET (figura 1).

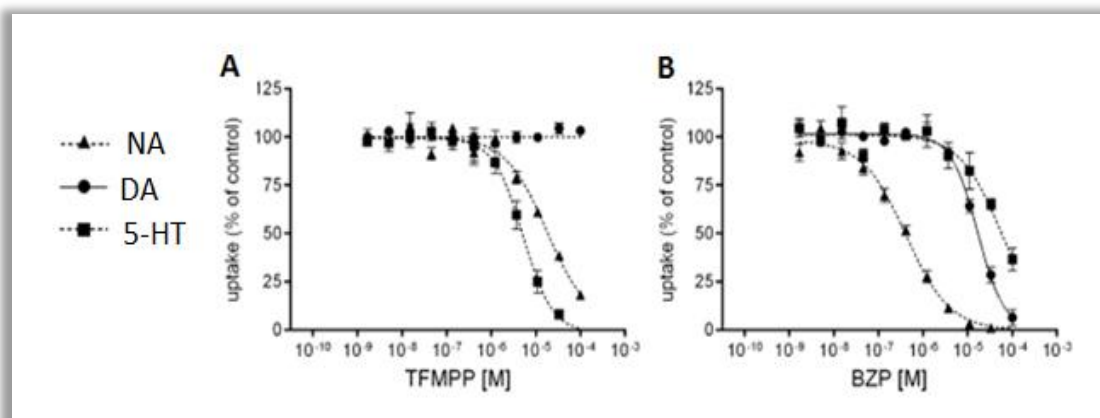


Figura 1- Curvas de concentração-resposta para a inibição da recaptação de [3H]NE, [3H]DA e [3H]5-HT em células KEH 293 transfectadas com NAT, DAT e SERT, induzida pela TFMPP (A) e pela BZP (B) (Simmler et al. 2014).

No ensaio de liberação de monoaminas mediada por transportadores, a BZP aumentou a liberação de DA e a TFMPP não aumentou o efluxo de nenhuma monoamina (NA, DA e 5-HT) (figura 2). No ensaio de afinidade de ligação aos receptores (NAT, DAT e SERT), a TFMPP mostrou ter ligação a vários receptores de monoaminas, nomeadamente 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, α_{2A} e D₁₋₃ (Simmler et al. 2014).

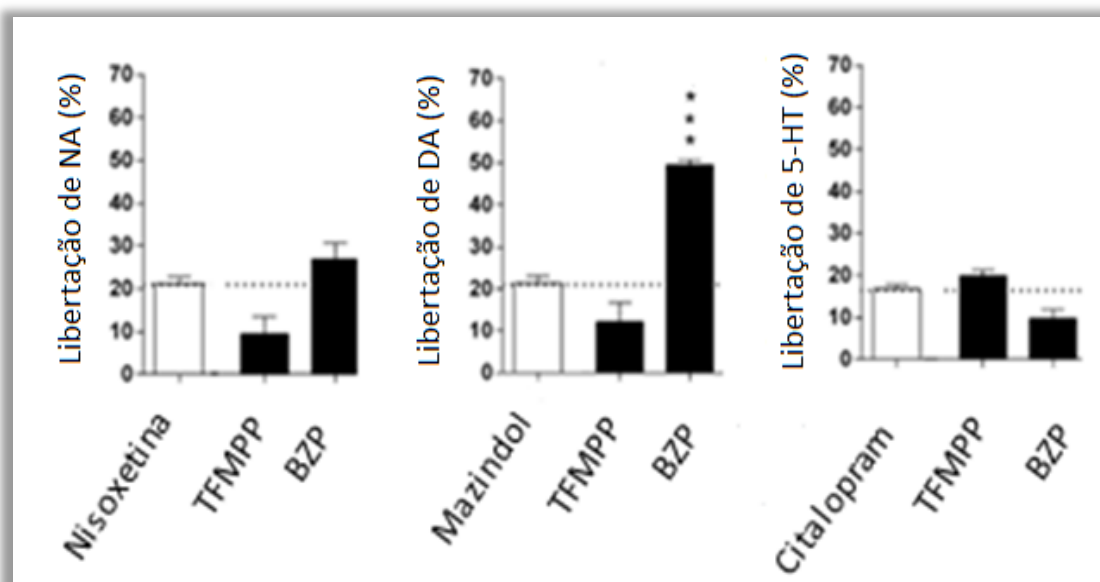


Figura 2- Gráfico de liberação de monoaminas em células HEK293 após incubação com 100μM de BZP e TFMPP. Foram usados como controles a nisoxetina, o mazindol e o citalopram para a liberação de NA, DA e 5-HT, respetivamente (Simmler et al. 2014).

Contrariamente a estudos iniciais feitos em ratos, que mostravam que a BZP inibia a recaptção de DA, NA e 5-HT (Tekes et al. 1987), neste estudo e em estudos mais recentes (utilizando sinaptossomas de rato), apenas se verificou a inibição do NAT e a libertação de DA (Baumann et al. 2005; Simmler et al. 2014). Uma vez que a inibição dos transportadores de NA e de DA está associada a efeitos psicoestimulantes nos humanos, estes resultados justificam alguns dos efeitos biológicos da BZP e da TFMPP (Simmler et al. 2013).

2.1.6- Toxicocinética

O conhecimento do metabolismo, a identificação de metabolitos e o estabelecimento de procedimentos para a sua determinação em amostras biológicas, como sangue e urina, são indispensáveis para a prova inequívoca do consumo de substâncias (Tsutsumi et al. 2006; Tsutsumi et al. 2005).

Até à data, a farmacocinética das piperazinas tem sido extensamente estudada, no entanto, ainda não está completamente clarificada (Antia et al. 2009a; Antia et al. 2009b; Wada et al. 2012).

Como já foi referido, as piperazinas são mais frequentemente consumidas por via oral na forma de comprimidos ou cápsulas. Dadas as suas propriedades lipofílicas, uma vez ingeridas, as piperazinas são rapidamente absorvidas no trato gastrointestinal (TGI) para a corrente sanguínea, distribuídas pelas células dos órgãos-alvo onde exercem a sua ação farmacológica, metabolizadas e eliminadas na urina (Antia et al. 2009d; Sheridan and Butler 2010).

O facto destas substâncias apresentarem uma ação no humor e no comportamento, sugere a sua passagem pela barreira hemato-encefálica (BHE) (Antia et al. 2009d). A sua ação depende da velocidade e extensão com que conseguem atingir o tecido nervoso, o que está indiretamente relacionado com a lipofilia da substância, ligação às proteínas plasmáticas e constante de ionização (Caccia S 1990).

Um estudo em ratinhos realizado por Chou (2008) (sobre a distribuição tecidular da BZP e da TFMPP) revelou que a TFMPP apresenta uma distribuição mais extensa que a da BZP [razão plasma: tecido (cérebro, fígado, rins, pulmões e coração) de 1:385 e 1:40, para a TFMPP e BZP, respetivamente, 30 minutos após a ingestão da mesma dose]. Revelou ainda que a BZP se distribui predominantemente nos rins, atingindo razões de concentração plasma: rim de aproximadamente 1:20, enquanto a TFMPP tem uma maior afinidade para o tecido pulmonar, alcançando uma razão de aproximadamente 1:200, 30 minutos após o consumo. Neste estudo também foi

apresentada a distribuição dos metabolitos hidroxilados da BZP (ver capítulo do ‘Perfil farmacocinético da BZP’), sendo o fígado o órgão que apresentou maior acumulação (Antia et al. 2009d). Um outro estudo em ratos demonstrou que o volume de distribuição da TFMPP (16,2 L/Kg) excedeu o volume de água corporal total, o que corrobora a extensa distribuição tecidual atrás referida (Caccia S 1990).

No que respeita ao metabolismo, as piperazinas são predominantemente metabolizadas no fígado, sendo as fenilpiperazinas mais extensamente metabolizadas do que as benzilpiperazinas e excretadas quase exclusivamente como metabolitos (Arbo et al. 2012; Maurer et al. 2004).

2.1.6.1- Perfil farmacocinético da BZP

A BZP é metabolizada no fígado pelo citocromo P450 (CYP450), nomeadamente pelas enzimas CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4, e predominantemente excretada pelos rins (Antia et al. 2009a; Lin et al. 2011; Staack et al. 2002). Estudos *in vitro* mostraram que a BZP interfere no metabolismo de outros substratos para as três isoformas metabólicas, o que sugere um elevado potencial de interações farmacológicas (Murphy et al. 2009).

Um estudo realizado com urina de 24 horas de 7 voluntários humanos (sexo masculino, 19-31 anos e IMC médio de 24,3) após administração de uma dose oral de 200 mg de BZP, permitiu traçar o perfil farmacocinético da BZP, bem como dos seus metabolitos hidroxilados (tabela 3) (Antia et al. 2009a; Lin et al. 2011).

Tabela 3: Perfil toxicocinético da BZP e metabolitos hidroxilados em humanos. Adaptada de Antia et al. (2009a).

Parâmetro	BZP	4-OH-BZP	3-OH-BZP
C_{max} (ng/mL)	262 (±19)	7 (±1)	13 (±1)
T_{max} (min)	75	60	75
T_{1/2} (h)	5.5 (±0,4)	-	-
Cl/F (L/h)	99 (±63)	-	-

C_{max} – Concentração máxima no plasma. T_{max} – Tempo após a toma da dose em que foi determinada a concentração máxima. T_{1/2} - Tempo necessário, após a toma da dose, para se atingir metade da concentração mais elevada. Cl/F- Clearance/biodisponibilidade, corresponde ao volume de sangue que é depurado da substância por hora.

Na molécula de BZP podem ser identificados três locais alvos para metabolização, nomeadamente o anel aromático, o carbono benzílico e o heterociclo piperazina (Arbo et al. 2012).

Um estudo preliminar do metabolismo da BZP feito por Staack e colaboradores (2002), no qual foi analisada urina de rato após administração por intubação gástrica de 50 mg/Kg e comparada com amostras de urina de consumidores humanos, mostrou que, para ambas as espécies, as principais vias metabólicas da BZP foram a hidroxilação do anel aromático originando a hidrox-BZP (OH-BZP) e a clivagem do anel piperazínico para produzir a N-benziletlenodiamina.

Estudos metabólicos posteriores em voluntários humanos e em animais permitiram identificar as transformações da BZP no organismo através da presença de vários metabolitos na urina, nomeadamente a 4-OH-BZP, 3-OH-BZP, 4-hidroxi-3-metoxi-BZP, piperazina, benzilamina e N-benziletienodiamina (Elliott 2011).

Os metabolitos 4-hidroxi-BZP e a 3-hidroxi-BZP são formados por hidroxilação simples do anel aromático da BZP, via CYP450, tendo uma experiência efetuada por Staack e colaboradores (2002) em ratos Wistar machos, após uma administração por intubação gástrica de 5 mg/Kg, verificado a preferência da hidroxilação em posição *para* e, como tal, o metabolito hidroxilado 4-OH-BZP foi o que se revelou predominante nesta espécie. A prevalência do metabolito 4-OH-BZP descrita em estudos animais foi contrariada por um estudo recente em voluntários humanos, no qual as concentrações do metabolito 3-OH-BZP foram sempre mais elevadas que as concentrações do metabolito *para* (figura 3) (Antia et al. 2009a).

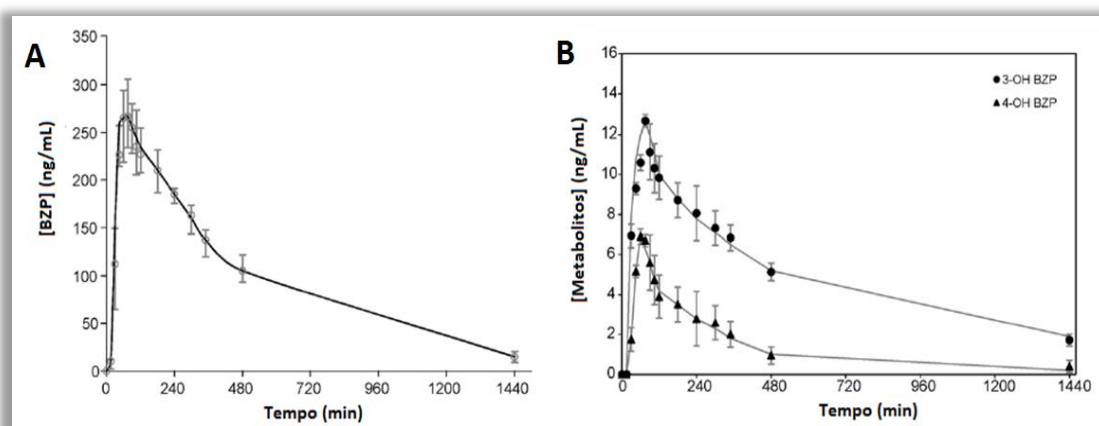


Figura 3- Concentrações plasmáticas da BZP e dos seus metabolitos hidroxilados (3-OH-BZP e 4-OH-BZP) no período de 24 horas após a administração de uma dose oral de 200 mg de BZP (n=7 homens) (Antia et al. 2009a).

A dupla hidroxilação do anel aromático da BZP seguida de metilação leva, por sua vez, à formação da 4-hidroxi-3-metoxi-BZP, reação esta catalizada pela catecol-O-metil-transferase (COMT), pelo que se conclui que a 4-hidroxi-3-metoxi-BZP é predominantemente formada devido à seletividade da COMT para a metilação do grupo hidroxilo na posição 3 (Staack et al. 2002). O envolvimento da COMT foi confirmado por estudos *in vitro* feitos por Maurer e colaboradores (2000).

Os metabolitos da BZP podem ser ainda alvo de metabolismo de fase 2, dando origem aos respetivos conjugados glucoronídeos e/ ou sulfatos (O-sulfatos e N-sulfatos), sob catálise das enzimas uridina difosfato glucoroniltransferase (UGT) e sulfotransferase (SULT), respetivamente (Arbo et al. 2012; Jancova et al. 2010). Estudos em humanos demonstraram uma prevalência da via da sulfatação em detrimento da via de glucoronidação pelo que se pensava, então, que a sulfatação da *p*-OH-BZP era a principal via metabólica de fase 2, na nossa espécie (Elliott and Smith 2008; Gibson and Skett 2001; Tsutsumi et al. 2006). No entanto, este facto foi contrariado pelo estudo metabólico de Tsutsumi e colaboradores (2006), no qual se verificou que cerca de 50% dos metabolitos eram eliminados principalmente sob a forma de conjugados glucoronídeos, e em menor extensão de sulfatos.

A piperazina, a N-benzil-etilenodiamina e a benzilamina podem ser formadas pela dupla N-desalquilação do carbono benzílico da BZP. Por esta via metabólica pode ser também formado o benzaldeído, o qual pode ser oxidado a ácido benzóico (Staack et al. 2002).

As principais vias metabólicas da BZP estão representadas esquematicamente na figura 4.

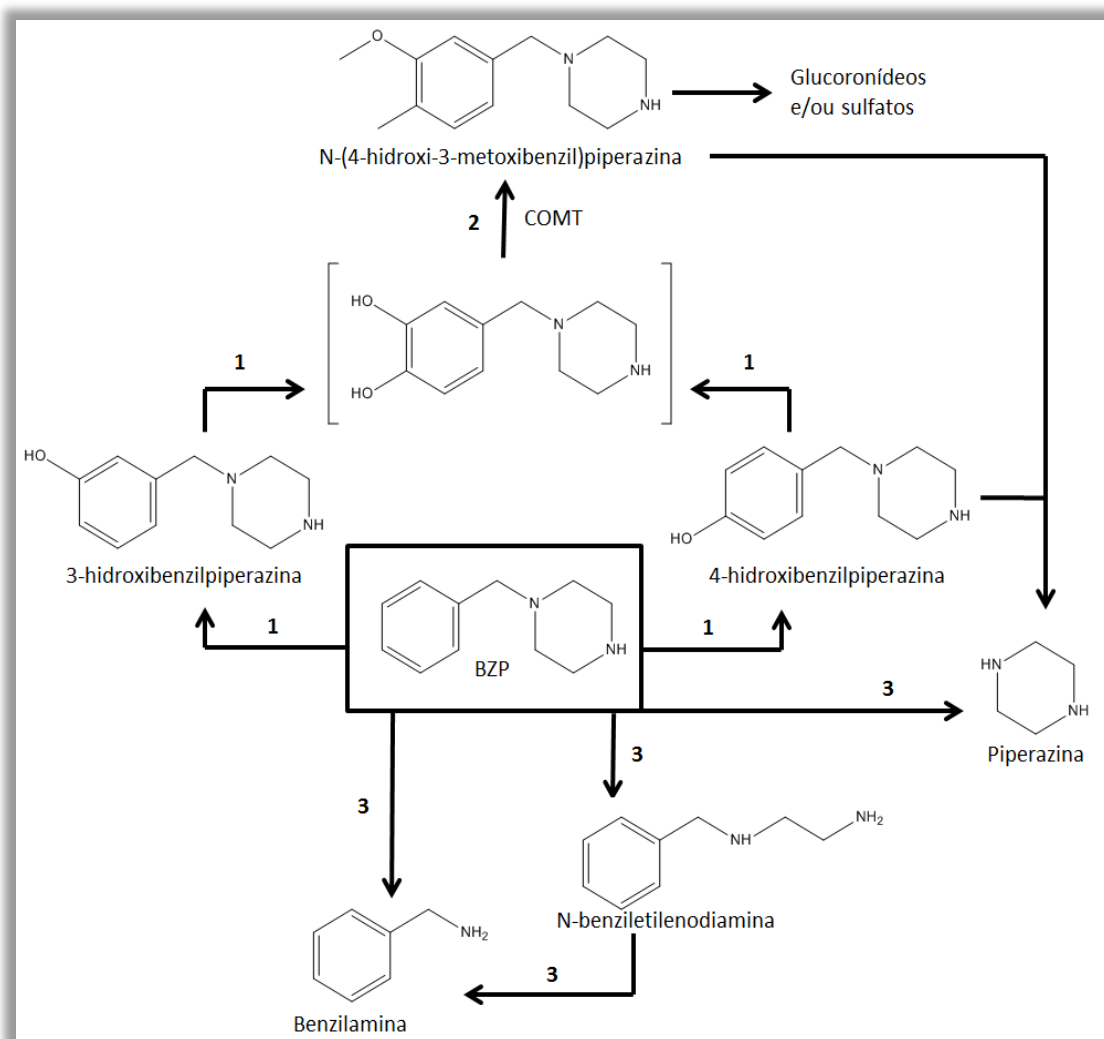


Figura 4- Representação esquemática das vias metabólicas da BZP. 1- Hidroxilação; 2- Metilação; 3- N-desalquilação; COMT- Catecol-O-metiltransferase. Adaptado de Arbo et al. (2012).

Como já foi referido, a principal via de excreção da BZP é através da urina e, como tal, vários estudos são efetuados usando a urina como matriz biológica. Assim, um estudo em ratos Wistar desenvolvido para estudar o metabolismo da BZP, onde se analisou urina de 48 horas após administração intraperitoneal de uma dose de 5 mg/Kg, verificou que cerca de 25% da dose consumida era excretada na forma de metabolito 4-OH-BZP, 2% na forma de metabolito 3-OH-BZP e que apenas 6,7% era excretada na forma de BZP inalterada. Após 48 horas, aproximadamente 33% da dose administrada foi eliminada, sendo 80% sob a forma de metabolito e 20% de composto-pai, ao contrário do estudo preliminar feito por Staack e colaboradores (2002), no qual a BZP foi maioritariamente eliminada na sua forma inalterada (Tsutsumi et al. 2006).

Um outro estudo feito com voluntários humanos por Antia e colaboradores (2009a), usando urina de 24 horas após uma dose oral de 200 mg de cloridrato de BZP (BZP.2HCl), identificou a presença de aproximadamente 6% da dose total de BZP

inalterada e apenas 0,11% de metabolitos hidroxilados (figura 5), o que sugere uma baixa biodisponibilidade, excepto se outras vias de excreção (como excreção biliar) ou a ligação a proteínas estiverem presentes.

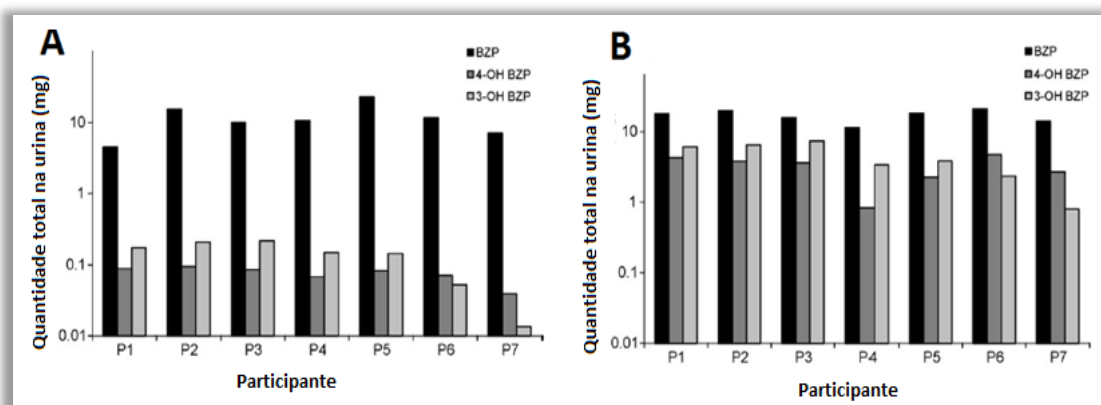


Figura 5- Concentrações de BZP e seus metabolitos hidroxilados na urina pura (A) e na urina após hidrólise enzimática (B), depois de ter sido administrada uma dose oral de 200 mg de BZP (n=7 homens saudáveis) (Antia et al. 2009a).

Neste último estudo foi identificada a presença de dois metabolitos sulfatados (o O-sulfato-BZP e N-sulfato-BZP) correspondendo, relativamente à quantidade total de BZP excretada, 51% ao O-sulfato e 30% ao N-sulfato (figura 6). Os mesmos autores fizeram uma extrapolação onde estimavam que, ao fim de 44 horas após o consumo, as concentrações eram indetetáveis (Antia et al. 2009a).

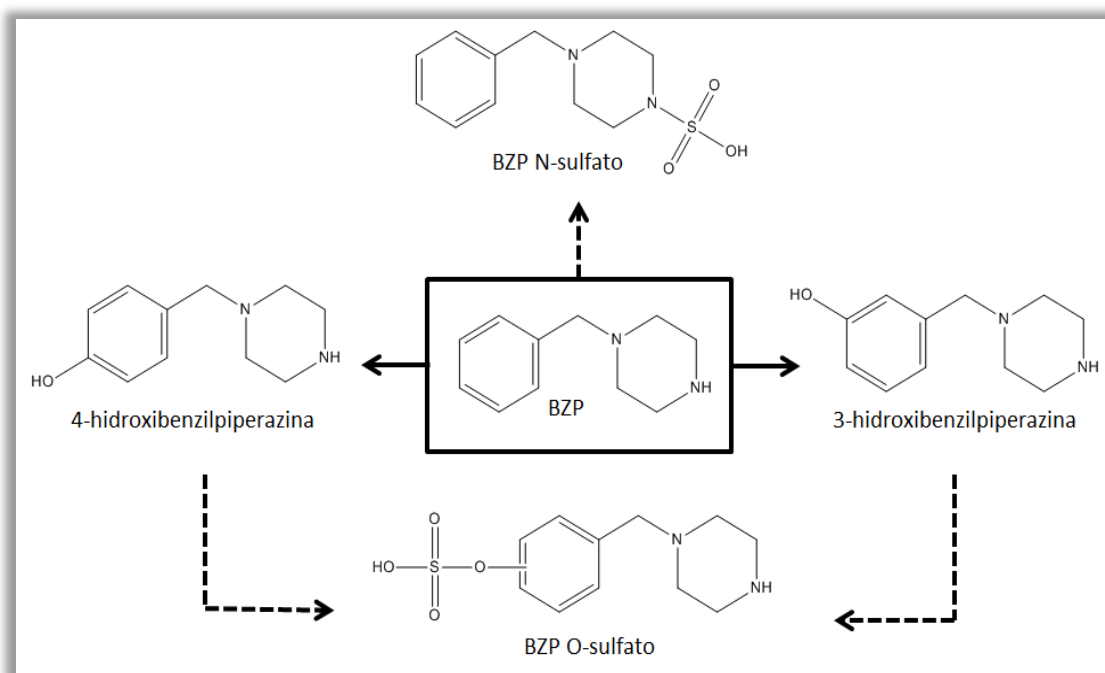


Figura 6: Representação esquemática dos metabólitos conjugados por sulfatação da BZP. Adaptado de Antia et al. (2009a).

Para a toxicologia clínica e forense, o metabólito com mais interesse é o 4-OH-BZP, uma vez que retém a identidade estrutural do composto pai e, como tal, constitui prova inequívoca da administração de BZP (Tsutsumi et al. 2006).

2.1.6.2- Perfil farmacocinético da TFMPP

A TFMPP é extensamente metabolizada e eliminada quase exclusivamente na forma de metabólitos (Arbo et al. 2012).

A TFMPP é metabolizada pelas enzimas hepáticas do CYP450, tendo estudos *in vivo*, usando ratinhos Wistar como metabolizadores extensivos e ratinhos fêmeas Dark-Agouti como metabolizadores pobres, identificado a CYP2D6 (80,9%) como principal enzima metabolizadora da TFMPP, seguida da CYP1A2 (11,5%) e da CYP3A4 (7,6%) (Antia et al. 2009d; Arbo et al. 2012; Lin et al. 2011; Maurer et al. 2004; Staack et al. 2004).

O metabolismo proposto para esta fenilpiperazina ocorre via hidroxilação aromática do grupo fenilo e desalquilação do anel piperazínico (Antia et al. 2009d). Mais concretamente, a principal reação metabólica da TFMPP é a hidroxilação aromática que resulta na formação de 4-hidroxi-TFMPP (4-OH-TFMPP) seguida de uma glucoronidação ou sulfonação. Este metabólito hidroxilado, por sua vez, pode

ainda levar à formação de N-(hidroxi-3-trifluorometilfenil)etilenodiamina ou de hidroxi-3-trifluorometilanilina. A degradação do heterociclo piperazínico da TFMPP que ocorre por dupla N-desalquilação, leva à formação de N-(3-trifluorometilfenil)etilenodiamina ou 3-trifluorometilanilina. Outros metabolitos identificados foram a N-acetil-3-trifluorometilanilina e N-acetilhidroxi-3-trifluorometilanilina por uma N-acetilação parcial das anilinas (Mayol et al. 1994; Staack et al. 2002; Staack et al. 2003; Staack and Maurer 2003).

O perfil farmacocinético da TFMPP foi estudado em 6 voluntários humanos, adultos e saudáveis, após uma dose oral única de 60 mg, encontrando-se os resultados deste estudo resumidos na tabela 4. A dose escolhida teve em consideração a quantidade de TFMPP normalmente consumida, os efeitos adversos e o limite de detecção do método (Antia et al. 2010).

Tabela 4: Perfil toxicocinético da TFMPP e 4-OH-TFMPP em humanos adultos, após administração de uma dose única de 60 mg (n=6) (Antia et al. 2010).

Parâmetros Farmacocinéticos	TFMPP	4-OH-TFMPP
C_{max} (ng/mL)	24,1	20,2
t_{max} (min)	90	90
Cl/F (L/h)	384,24	

C_{max} – Concentração máxima no plasma. **T_{max}** – tempo após a toma da dose em que foi determinada a concentração máxima. **Cl/F**- Clearance/biodisponibilidade, que corresponde ao volume de sangue que é depurado da substância por hora.

Neste estudo não foi detetada TFMPP nas amostras recolhidas ao fim de 0, 15 e 30 minutos, o que sugere que, após a administração oral, a absorção no sistema digestivo para a corrente sanguínea não é imediata, justificando a repetição da dose em consumos recreativos. Os autores verificaram também que, após atingir a concentração máxima, a TFMPP apresenta duas fases de distribuição (daí a elevada razão plasma: tecidos, supracitada). A primeira fase apresenta um $t_{1/2}$ de 2,04 horas ($\pm 0,19h$), que pode ser devido à redistribuição da droga em órgãos como o rim (responsável pela excreção da TFMPP), fígado (responsável pelo metabolismo da TFMPP) ou no cérebro (local de ação); e a segunda fase, de eliminação lenta, com um $t_{1/2}$ de 5,95 horas ($\pm 1,63h$) (Antia et al. 2010).

Ao fim de 24 horas, após a administração, quer a TFMPP, quer o seu principal metabolito 4-OH-TFMPP foram praticamente indetetáveis no plasma (figuras 7 e 8) (Antia et al. 2009a).

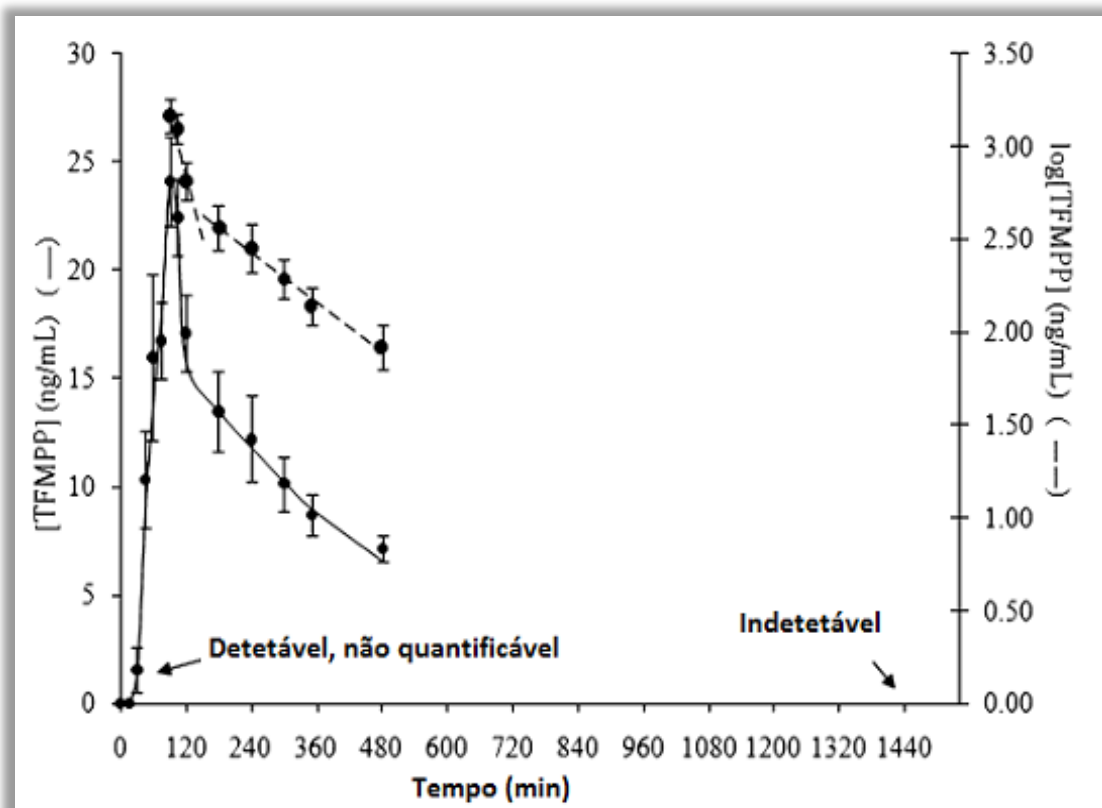


Figura 7: Concentrações plasmáticas médias da TFMPP nas duas fases de distribuição, nas 24 horas após administração de uma dose oral de 60 mg de TFMPP (n=6) (Antia et al. 2010).

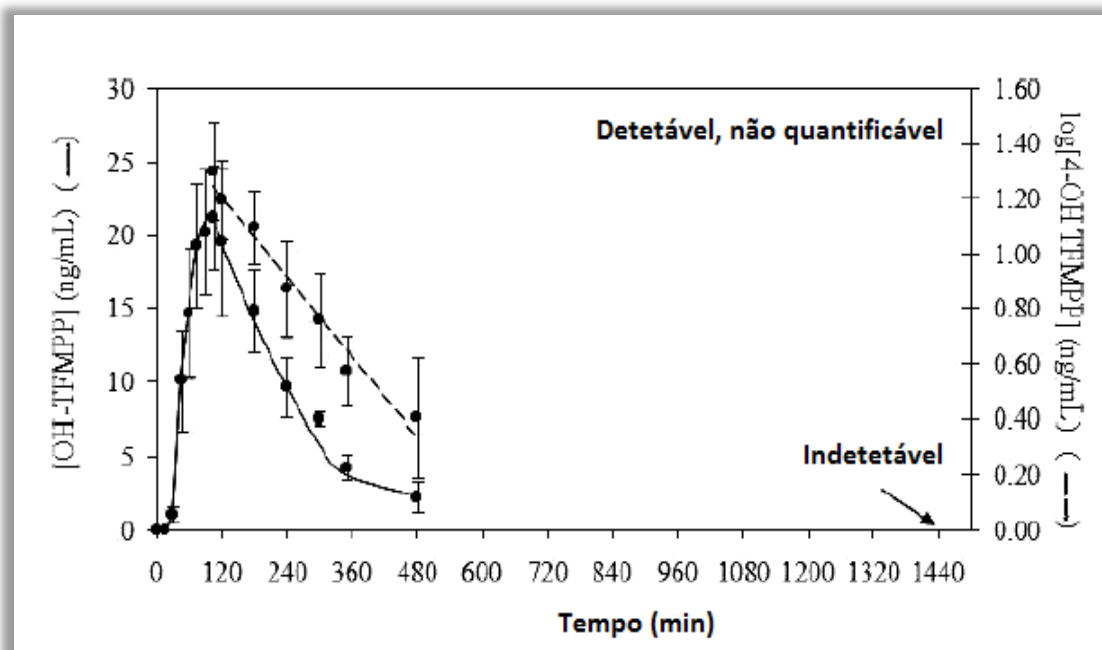


Figura 8: Concentrações plasmáticas médias do metabolito hidroxilado da TFMPP (4-OH-TFMPP) nas duas fases de distribuição, nas 24 horas após administração de uma dose oral de 60 mg de TFMPP (n=6) (Antia et al. 2010).

Este estudo demonstrou ainda que a TFMPP e o seu metabolito hidroxilado 4-OH-TMPP são excretados principalmente na sua forma conjugada, representando cerca de 70% e 90% da TFMPP eliminada, respetivamente, ambos provavelmente na forma de N-glucoronídeo (figura 9) (Antia et al. 2010). Um estudo realizado por Staack e colaboradores (2003), onde foi promovida a hidrólise dos metabolitos hidroxilados pela glucoronidase e pela sulfatase na urina de rato identificou a presença quer de metabolitos glucoronídeos, quer sulfatos.

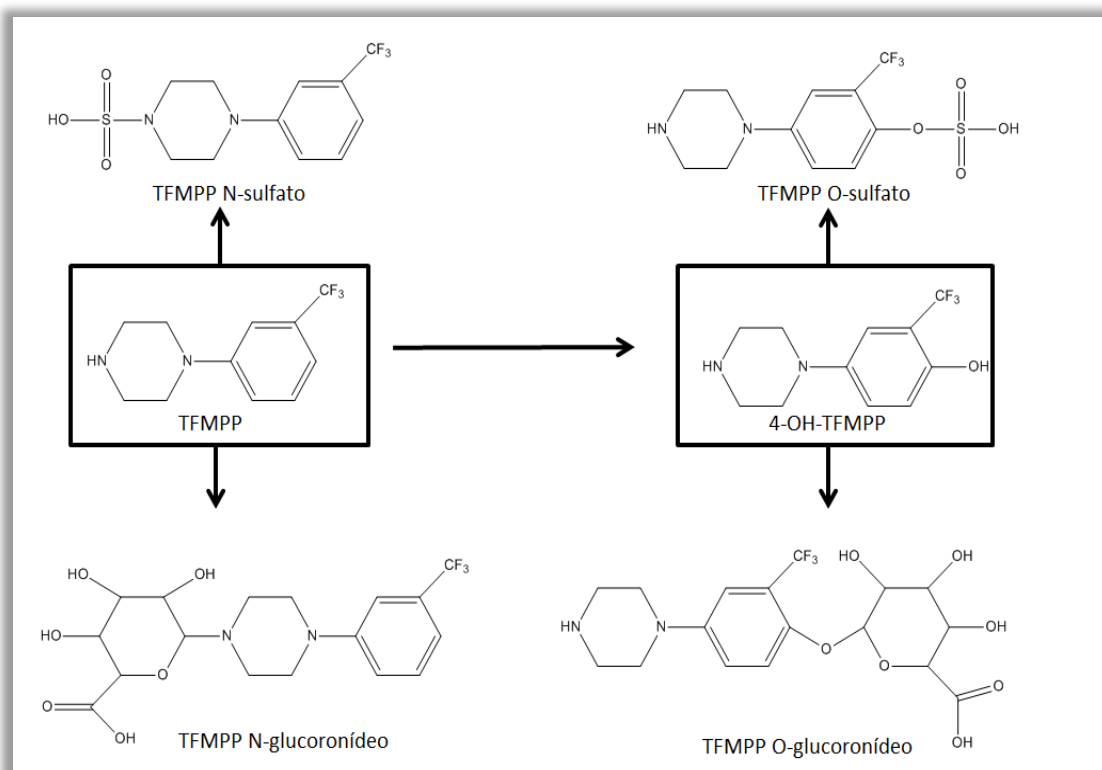


Figura 9: Representação esquemática dos metabolitos da TFMPP identificados na urina de rato e outros potenciais metabolitos conjugados. Adaptado de Antia e colaboradores (2010).

Com base nos metabolitos identificados foi proposto o esquema metabólico para a TFMPP representado na figura 10 (Antia et al. 2010).

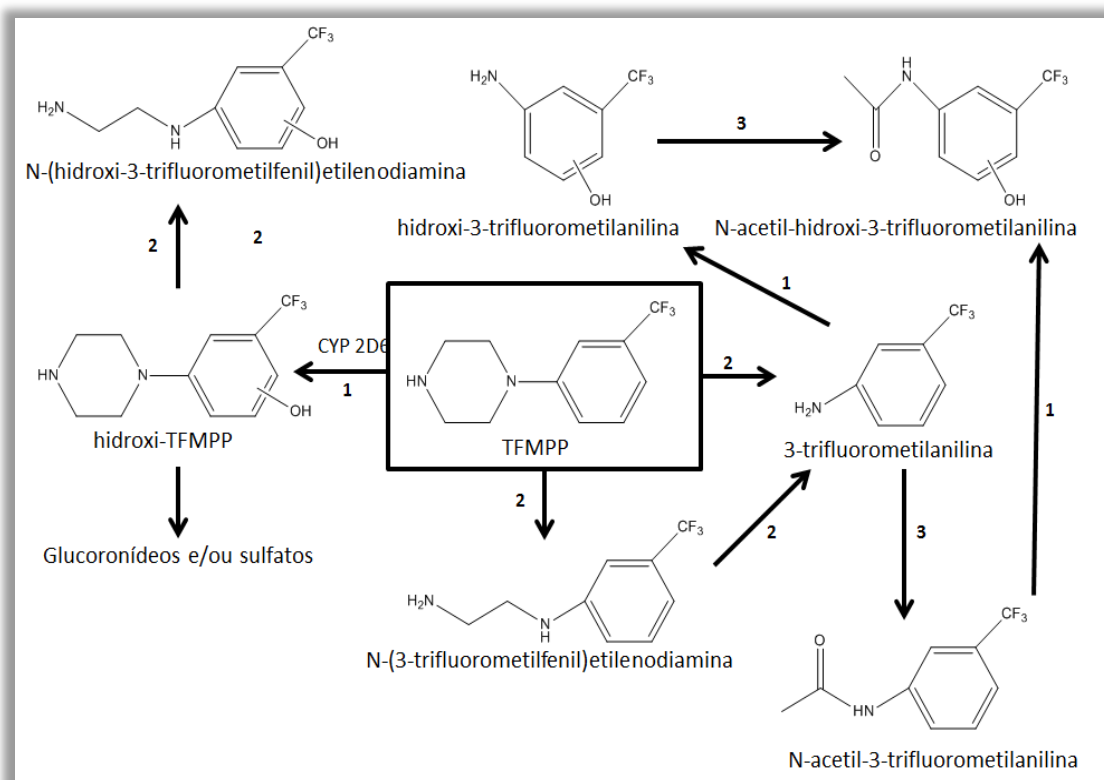


Figura 10: Representação esquemática das vias metabólicas da TFMPP. 1- Hidroxilação; 2- N-desalquilação; 3- N-acetilação. Adaptado de Antia e colaboradores (2009a).

Em análise forense, a interpretação dos resultados obtidos aquando da deteção de alguns metabolitos da TFMPP tem de ser criteriosa, uma vez que alguns destes podem ser comuns a outras substâncias, como acontece com a leflunomida (Arava®), um fármaco usado para o tratamento da artrite reumatóide (INFARMED 1999), o qual é metabolizado a 4-trifluorometilanilina e, após hidrólise ácida necessária à sua deteção, conduz à formação de 3- trifluorometilanilina (Staack et al. 2003).

2.2- Mistura de BZP e TFMPP

A administração conjunta de BZP e TFMPP é uma mistura frequentemente consumida e/ou comercializada com o objetivo de atingir os efeitos entactogénicos da MDMA, através do aumento dos efeitos subjetivos de cada uma das drogas (Elliott and Smith 2008).

Na Internet, os consumidores de piperazinas relatam experiências e opiniões onde consta que, aquando do consumo concomitante de BZP e TFMPP, é vivenciada uma sensação idêntica ao consumo de MDMA (Lin et al. 2011) sendo, inclusivamente, a

mistura de BZP e TFMPP comercializada, de forma enganosa, como “ecstasy” (Wood et al. 2008).

As interações entre as drogas são de extrema importância, uma vez que são de difícil previsão e podem ser responsáveis por uma série de efeitos adversos. Estas interações são de natureza variada e podem ocorrer por interferência na absorção, no metabolismo, na distribuição (ligações a proteínas), na eliminação ou na ligação ao receptor farmacológico (Klaassen 2008; Rang et al. 2008; Timbrell 2002). Assim, podem ser classificadas em:

- Interações farmacodinâmicas: interações que causam modificação do efeito bioquímico ou fisiológico dos xenobióticos. Geralmente, ocorre no local de ação (receptores farmacológicos) (Hansten and Horn 1996).
- Interações farmacocinéticas: interações que resultam da alteração da concentração dos xenobióticos nos seus locais de ação, decorrente de modificações nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e/ou excreção.

2.2.1- Efeitos biológicos e toxicológicos

Um estudo em voluntários humanos efetuado por Lin e colaboradores (2011) após a co-administração da BZP e da TFMPP revelou um aumento da pressão arterial sistólica e diastólica e cardiomegalia e, no que diz respeito a efeitos subjetivos, apenas se verificou que se encontrava aumentado o estado de vigor/atividade, bem-estar, disforia e efeitos semelhantes às anfetaminas.

Alguns casos de intoxicações que constam na literatura reportam sintomas do tipo dissociativo (descritos como uma sensação “de estar noutro mundo”), náuseas e vômitos, fraqueza, agitação, ansiedade, alucinações, bruxismo, características de toxicidade simpaticomimética (taquicardia, pupilas dilatadas) e convulsões (Baumann et al. 2005; Lin et al. 2011; Thompson et al. 2010; Wood et al. 2008).

Os efeitos subjetivos observados em voluntários humanos após o consumo oral de 200 mg de BZP, 60 mg de TFMPP e da mistura 100/30 mg de BZP:TFMPP estão descritos na tabela 5 (Lin et al. 2011).

Tabela 5- Efeitos subjetivos observados em humanos após uma administração de 200 mg de BZP, 60 mg de TFMPP e da mistura 100/30 mg de BZP:TFMPP. Adaptada de Lin et al. (2011).

Efeitos subjetivos	Piperazinas		
	BZP (200mg)	TFMPP (60 mg)	BZP/TFMPP P (100:30mg)
•Euforia	↑	-	-
•Disforia	↑	↑	↑
•Efeitos do tipo da dexanfetamina	↑	↑	↑
•Ansiedade	-	↑	-
•Depressão	↓	-	-
•Fadiga	↓	-	-
•Desorientação	↓	↑	-
•Vigor	↑	-	↑
•Distúrbios de humor	↑	-	-
• Autoconfiança	↑	-	↑
• Socialização	↑	-	-

Num estudo também realizado com voluntários humanos para avaliar a segurança das associações de BZP e TFMPP e da mistura com o álcool verificou-se que, quando comparados com um controlo de ingestão de 57,6g de álcool, quer a mistura BZP:TFMPP (300mg/74mg), quer a mistura com 57,6g de álcool mostraram, curiosamente, melhorias significativas no teste de performance de condução (Monteiro et al. 2013; Thompson et al. 2006).

Relativamente ao potencial da BZP e da TFMPP provocarem um efeito de recompensa, um estudo em macacos *rhesus* revelou que a combinação das duas drogas diminui as propriedades de reforço comparativamente ao consumo da BZP sozinha, diminuindo com o aumento da concentração de TFMPP (Fantegrossi et al. 2005). Este facto é consistente com a diminuição dos níveis de 5-HT causados pela mistura e com os resultados de outras drogas alucinogénias, agonistas do receptor 5-HT_{2C}, as quais suprimem a atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico (Fantegrossi et al. 2005; Simmler et al. 2014).

A avaliação dos efeitos subjetivos da BZP, TFMPP e mistura não têm em conta variáveis externas que deveriam ser consideradas, nomeadamente grau de dependência do consumidor, historial de consumo de drogas, personalidade do consumidor e ambiente de consumo (Lin et al. 2011).

2.2.2- Toxicodinâmica da mistura

Um estudo *in vivo* (ratinhos machos Sprague-Dawley) e *in vitro* (usando o cérebro dos mesmos ratos) efetuado por Baumann e colaboradores (2005) revelou que o consumo concomitante de BZP e TFMPP conduz a um aumento sinérgico substancial dos níveis de DA e 5-HT, mimetizando assim os efeitos neuroquímicos da MDMA. Um outro estudo dos mesmos investigadores, feito em ratos machos Sprague-Dawley, mostrou que a associação BZP:TFMPP na razão de 1:1 é três vezes menos potente que a MDMA no que diz respeito à estimulação da libertação das monoaminas, ou seja, os níveis de DA e 5-HT produzidos após administração de uma dose de 3mg/Kg de BZP/TFMPP são similares aos que são produzidos após a administração de uma dose de 1mg/Kg de MDMA. Quando administrada uma dose maior de 10 mg/kg de BZP/TFMPP, refletiu-se num aumento dos níveis de DA e 5-HT de 1280% e 870%, respetivamente, relativamente aos níveis basais (Baumann et al. 2004; Vorce et al. 2008). Neste estudo também se verificou que a quantidade de DA libertada aquando da co-administração das drogas é superior à soma dos efeitos de cada uma individualmente (376% BZP e 130% TFMPP), o que os autores consideraram, mas de forma errada no nosso entender, tratar-se de um efeito sinérgico (Baumann et al. 2005). Não obstante, o efeito observado pode refletir-se em sensações subjetivas mais agradáveis quando as substâncias são consumidas em simultâneo (Lin et al. 2011). O mesmo efeito não se verificou na quantidade de 5-HT, para a qual o aumento da concentração extracelular induzido pela co-administração foi similar à soma dos valores dos efeitos da BZP e da TFMPP quando administradas individualmente (figura 11) (Baumann et al. 2004; Baumann et al. 2005).

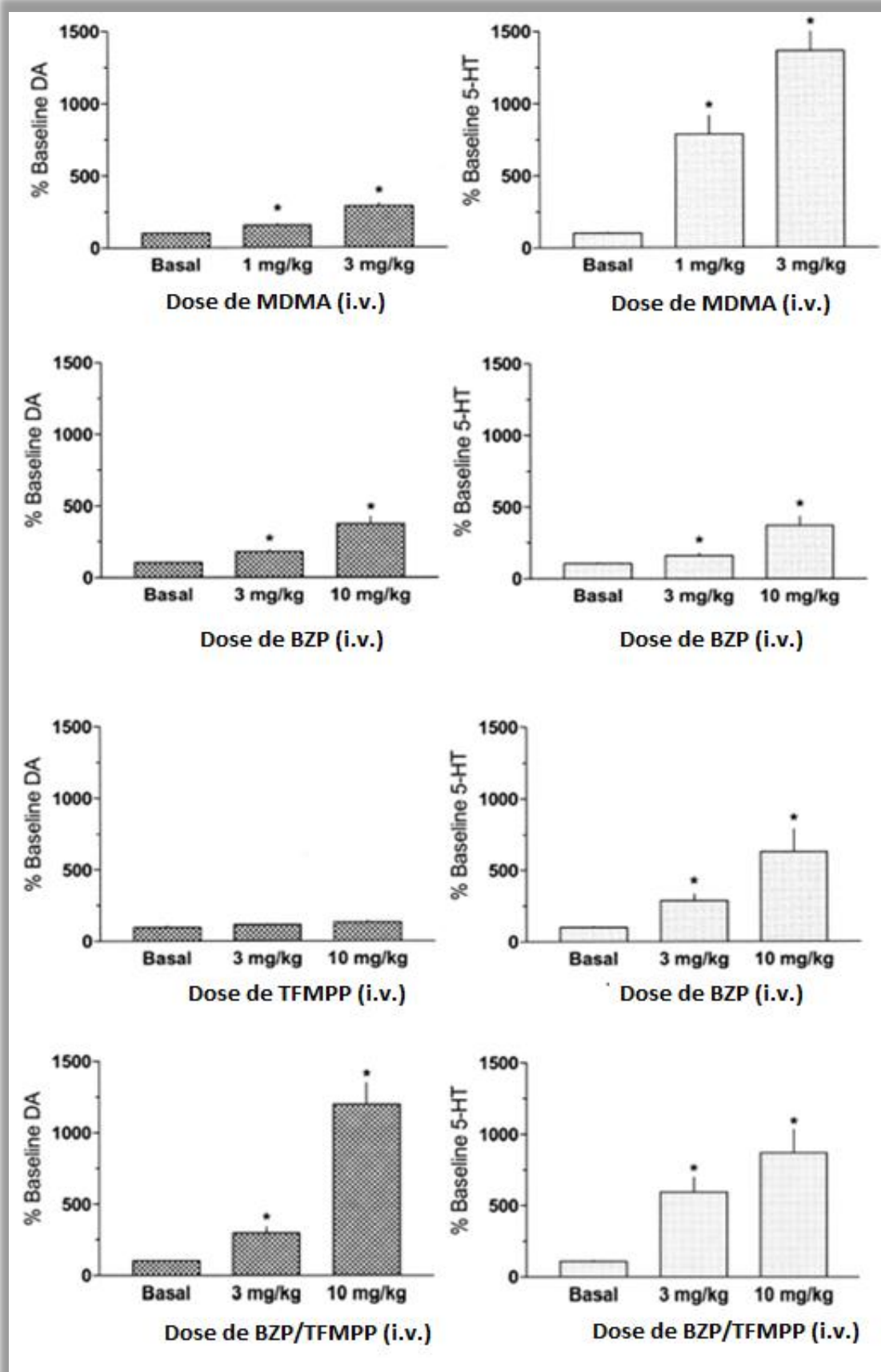


Figura 11: Efeitos da MDMA, BZP, TFMPP e mistura BZP:TFMPP (1:1) nos níveis extracelulares de DA e 5-HT no *nucleus accumbens* de ratinhos Sprague-Dawley após uma injeção ao tempo zero de 1 mg/Kg (MDMA) e 3 mg/Kg (BZP, TFMPP e BZP:TFMPP) e aos 60 minutos de 3 mg/Kg (MDMA) e 10 mg/Kg (BZP, TFMPP e BZP:TFMPP). Os resultados apresentados resultam da medição feita após 20 minutos das injeções (Baumann et al. 2004).

No mesmo estudo foram feitos ensaios *in vitro* usando o cérebro (excepto cerebelo e cauda) de ratos Sprague-Dawley, não tendo revelado interações entre a BZP e a TFMPP na libertação da DA e 5-HT, pelo que os autores sugeriram a possibilidade dos sinergismos verificados entre as duas substâncias *in vivo* decorrerem de fatores farmacocinéticos (Baumann et al. 2004).

Em ambos os estudos, os autores compararam a soma aritmética dos efeitos observados para a BZP e TFMPP isoladamente e em mistura. Tal, só pode ser efetuado no caso de substâncias que individualmente apresentem um perfil dose-resposta linear, situação esta que não se verifica na maioria das situações. A ausência de uma correta previsão dos efeitos de mistura não permite classificar categoricamente a mistura BZP:TFMPP como aditiva (toxicidade combinada dos compostos é igual à soma dos seus efeitos quando administrados isoladamente), sinérgica (o efeito combinado dos compostos é maior do que a soma de cada um administrado isoladamente) ou antagónica (as duas drogas associadas apresentam um efeito tóxico menor do que a soma dos efeitos tóxicos obtidos após a sua administração isolada). Por este motivo são necessários mais estudos que incluam modelos matemáticos adequados, como os aplicados na presente dissertação.

2.2.3- Toxicocinética da mistura

No que diz respeito à metabolização dos dois derivados piperazínicos abordados nesta dissertação, tem sido demonstrado que a BZP e a TFMPP são metabolizadas pelas mesmas enzimas a nível hepático, nomeadamente pelas isoformas CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4 do CYP450, e que o metabolismo é afetado pela presença de inibidores e outros substratos. Este facto poderia levar a especular que, quando co-administradas em doses elevadas, pudesse ocorrer saturação dos mecanismos de metabolização com consequente aumento do $T_{1/2}$ e exacerbação da toxicidade de um, ou dos dois compostos. No entanto, Antia e colaboradores (2009d) verificaram, num estudo efetuado em ratinhos onde se mantiveram as doses máximas de ambas as drogas (100 mg de BZP e 30 mg de TFMPP), que os $t_{1/2}$ também se mantinham, uma vez que mecanismos de metabolização compensadores eram ativados com o aumento consequente da formação de metabolitos de fase 2, nomeadamente o metabolito N-sulfato da BZP e N-glucoronídeo da TFMPP. Outra explicação para este resultado é o facto das enzimas metabolizadoras apresentarem diferentes afinidades para a TFMPP e para a BZP.

Num outro estudo feito pelos mesmos investigadores, quando foi co-administrada BZP (100mg) e TFMPP (30mg) a ratinhos saudáveis, verificou-se uma alteração dos parâmetros farmacocinéticos da TFMPP (Antia et al. 2009b) comparativamente ao estudo efetuado com plasma de voluntários humanos (n= 6, 18-31 anos, IMC médio de 27,4 Kg/m²), aos quais foi administrada uma dose de 60 mg de TFMPP (Antia et al. 2010). No primeiro estudo obteve-se uma C_{max} de 28 ng/mL aos 75 minutos após a administração da dose e o T_{1/2} de eliminação foi de 2,3 horas (Antia et al. 2009b); no segundo estudo a C_{max} obtida foi de 24,1 ng/ml aos 90 minutos após a administração da dose e o t_{1/2} foi de 2.04 horas (Antia et al. 2010). No primeiro estudo verificou-se uma inibição da formação dos metabolitos 3-OH-BZP e 4-OH-TFMPP, o que pôde resultar da inibição da CYP2D6 que catalisa a hidroxilação tanto da BZP como da TFMPP (Antia et al. 2009b). No estudo realizado com plasma humano, o metabolito 4-OH-TFMPP conseguiu ser identificado e quantificado, pelo que a ausência deste metabolito na urina de rato levantou a que se colocasse a possibilidade da existência de polimorfismos das enzimas da CYP450, nomeadamente os metabolizadores pobres da CYP2D6 (aproximadamente 14% dos caucasianos), bem como a variabilidade interespecie (Antia et al. 2009d). Estudos em voluntários humanos não verificaram diferenças significativas na farmacocinética da BZP quer em metabolizadores pobres, quer em metabolizadores extensivos, mas o mesmo não aconteceu com a TFMPP, a qual revelou um aumento significativo da C_{max} em metabolizadores pobres da CYP2D6 comparativamente aos metabolizadores extensivos. Uma limitação na interpretação dos resultados deste estudo reside na diferença de doses de TFMPP entre a dose individual (60 mg de TFMPP) e o tratamento combinado (30 mg de TFMPP) (Antia et al. 2009d).

Por este motivo, foi feito um estudo em ratinhos Wistar onde foi administrada a mesma dose de BZP e de TFMPP (2 mg/Kg), o qual revelou que as concentrações plasmáticas de BZP após a administração isolada foram estatisticamente comparáveis com a co-administração de BZP e TFMPP; enquanto as de TFMPP após a co-administração tenderam a ser maiores comparativamente com a administração da substância isolada (figura 12).

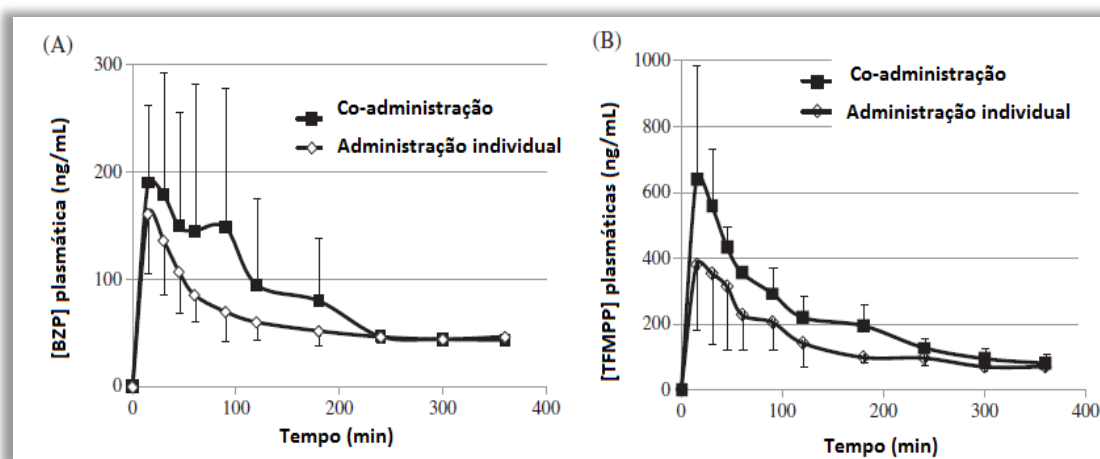


Figura 12: Perfil concentração-tempo da BZP (A) e TFMPP (B) após administração intraperitoneal, individualmente e em mistura, de uma dose de 2 mg/Kg em ratinhos Wistar (n=3) (Wada et al. 2012).

Alterações nos parâmetros farmacocinéticos da BZP, da TFMPP e da mistura também foram verificadas por outros investigadores e estão descritas na tabela 6 (Wada et al. 2012).

Tabela 6: Parâmetros farmacocinéticos da BZP e da TFMPP após administração de uma dose de 2 mg/Kg de BZP e TFMPP isoladamente e em mistura em ratinhos machos Wistar. Adaptada de Wada et al. (2012).

Parâmetros Farmacocinéticos		Administração isolada, média±SD (n=3)	Co-administração, média±SD
BZP	T $\frac{1}{2}$ (min)	219 ±08	222±82
	Cl (L/min)	0,017±0,0038	0,014±0,0059
TFMPP	T $\frac{1}{2}$ (min)	147±78	237±216
	Cl (L/min)	0,009±0,001	0,005±0,002

T $\frac{1}{2}$ - Tempo necessário, após a toma da dose, para se atingir metade da concentração mais elevada
 Cl/F- Clearance/biodisponibilidade, que corresponde ao volume de sangue que é depurado da substância por hora.

Os resultados enunciados sugerem, então, interações metabólicas entre a BZP e a TFMPP (Antia et al. 2009d), tendo estudos em microsomas hepáticos humanos demonstrado que a TFMPP inibiu o metabolismo da BZP em aproximadamente 60% e a BZP inibiu o metabolismo da TFMPP em 91% (Antia et al. 2009c).

2.3- Interação da BZP e TFMPP com outras substâncias

As piperazinas são também muitas vezes consumidas concomitantemente com outras drogas ou fármacos e, dada a sua capacidade para inibir o metabolismo de diferentes substratos para algumas enzimas do CYP450, podem desenvolver interações com graves efeitos para os consumidores. Estudos feitos em microsomas hepáticos humanos mostraram que a capacidade de inibição varia consoante a enzima do CYP450, na seguinte ordem: CYP1A2 > CYP2C9 > CYP2D6 > CYP3A4 (Antia et al. 2009c; Murphy et al. 2009).

Uma interação comum relaciona-se com a co-administração com a cafeína, o álcool e o tabaco (indutor da CYP1A2) que, em doses elevadas, podem afetar a absorção, o metabolismo e a eliminação das piperazinas (Antia et al. 2009d). Relativamente à associação com o álcool, as interações refletem-se a nível sintomático como demonstrou Gee e colaboradores (2008) num estudo em que a concentração de BZP foi proporcional à frequência de convulsões, enquanto a co-ingestão com o álcool reduziu essa frequência, embora tenha aumentado o estado de confusão e agitação.

Num contexto clínico, a interação entre a BZP e/ou a TFMPP e outros fármacos é uma preocupação constante que pode levar a um aumento dos efeitos tóxicos (Antia et al. 2009d). Estando o metabolismo da BZP e da TFMPP relacionado com várias enzimas do CYP450, é passível a ocorrência de interações destas drogas com várias substâncias tais como o dextrometorfano (antitússico) e a paroxetina (inibidor da recaptação da serotonina), a cafeína e a olanzapina (antipsicótico), o etinilestradiol e a carbamazepina (anticonvulsivante) e a tolbutamida (tratamento da diabetes tipo 2), substratos da CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4 e CYP2C9, respetivamente (Antia et al. 2009d).

2.4-Tratamento da intoxicação

Quando um doente dá entrada nos cuidados de saúde, e após validação do diagnóstico de intoxicação por piperazinas, deve ser feito um electrocardiograma e uma determinação dos níveis plasmáticos de sódio. No entanto, não existe protocolado nenhum tratamento específico em caso de intoxicação por piperazinas, sendo apenas efetuado um tratamento de suporte e de estabilização dos sinais e sintomas,

normalmente para a correção de hiponatremia, hipertermia, taquicardia, desidratação, hipertensão, distúrbios ácido-base, insuficiência renal, lesões musculares, cardiovasculares e hepáticas (Monteiro et al. 2013). O tratamento passa, normalmente, pela administração de fármacos com ação simpaticomimética ou anticolinérgicos (convulsões, distúrbios psiquiátricos e cardíacos), benzodiazepinas (convulsões), antieméticos (náuseas e vômitos), barbitúricos (episódios de epilepsia) e fluidos intravenosos (NaCl 0,9%, dinitrato de isosorbida, nitroprussiato de sódio, nitroglicerina ou bloqueadores α 2-adrenérgicos) (Gee et al. 2005; Schep et al. 2011; Wood et al. 2008). A eficácia da lavagem gástrica não está provada e é irrelevante se a ingestão das piperazinas tiver ultrapassado a uma hora (Schep et al. 2011).

A monitorização do intoxicado deve ser feita até 6-8 horas após a ingestão das drogas, dada a possibilidade de desenvolvimento de convulsões tardias (Arbo et al. 2012).

2.5- Avaliação dos efeitos de misturas em termos de aditividade, sinergismo ou antagonismo

Um dos maiores desafios da toxicologia consiste no desenvolvimento de modelos que permitam estudar os efeitos da associação de substâncias, nomeadamente observar se a sua combinação aumenta a toxicidade ou diminui a eficácia.

Os efeitos possíveis após a exposição do organismo a, pelo menos, dois compostos em simultâneo podem ser:

- Aditivos: se a toxicidade combinada dos compostos é igual à soma dos seus efeitos quando administrados isoladamente;
- Sinérgicos: se o efeito combinado dos compostos é maior do que a soma de cada um administrado isoladamente;
- Potenciados: se um composto que não apresenta toxicidade em determinado órgão ou sistema se torna tóxico quando em associação com outro. Alguns autores defendem que este conceito pode ser englobado no conceito de aditividade (Dias da Silva et al. 2013b; Silva et al. 2002);
- Antagónicos: se dois compostos associados apresentam um efeito tóxico menor do que a soma dos efeitos tóxicos obtidos após a sua administração isolada (Klaassen, 2001; Timbrell, 2009).

De uma forma realista, realizar ensaios de toxicidade em todas as hipotéticas combinações de drogas é de impossível execução, pelo que todas as aproximações que

possam ser realizadas, previsões de aditividade, sinergismos ou antagonismos são de extrema importância para a toxicologia.

Ao longo das últimas décadas, vários estudos de toxicidade de mistura têm comparado dois modelos de cálculo que prevêem os seus efeitos aditivos (Dias da Silva et al. 2013b; Drescher 1995; Payne et al. 2000): modelo de *adição de concentrações* (AC), proposto por Loewe e Muchnik (1926) e o modelo de *ações independentes* (AI), descrito por Bliss (1939).

O conceito de AC ou “*adição de doses*”, é baseado no pressuposto de que os componentes da mistura provocam o mesmo efeito por mecanismos de ação semelhantes, isto é, produzem o mesmo efeito tóxico no órgão alvo atuando de forma similar, o que significa que qualquer componente da mistura pode ser substituído, parcial ou totalmente, por outro dos componentes sem alterar o efeito final (Backhaus et al. 2000; Dias da Silva et al. 2013b). Ou seja, cada componente individual contribui para o efeito conjunto agindo proporcionalmente à sua concentração, mesmo em concentrações que não produzam efeito.

Este modelo é representado pela equação 1, sendo n o número de compostos na mistura; p_i a fração do composto i na concentração total da mistura; EC_{mix} a concentração da mistura que produz o efeito E , e EC_i a concentração do composto i que isoladamente provoca o efeito E .

$$\sum_{i=1}^n \frac{(p_i \times EC_{mix})}{EC_i} = 1 \quad (\text{Equação 1})$$

O modelo de previsão alternativo, o modelo AI, também designado por “Bliss Independence” (Bliss 1939) ou “joint independent action” (Plackett and Hewlett 1948), assume que os componentes da mistura provocam os mesmos efeitos mas por mecanismos de ação distintos, atuando cada substância em locais de ação específicos e, como tal, um componente da mistura não interfere com a ação dos outros (Backhaus and Boedeker 2000). Neste caso, a resposta de cada composto é independente das respostas induzidas pelos outros componentes da mistura, assumindo-se que quando um componente está presente em concentração que não apresenta qualquer efeito não vai contribuir para o efeito da mistura.

Este modelo é representado pela equação 2, sendo EC_{mix} o efeito E da mistura; E_{max} o efeito máximo da mistura ou dos seus componentes isoladamente, neste caso 100% de morte; n o número de compostos na mistura; e $M_i(C_i)$ o efeito do composto i na concentração C_i (Dias da Silva et al. 2013b).

$$EC_{mix} = E_{max} \left[1 - \prod_{i=1}^n \left[1 - \frac{Mi(Ci)}{E_{max}} \right] \right] \quad (\text{Equação 2})$$

As derivações matemáticas destes modelos de previsão (AC e AI) foram descritas por Payne e colaboradores (2000).

Regra geral, o modelo AC prevê efeitos de maior toxicidade que o modelo AI (Backhaus 2000a; Faust et al. 2003). Por este motivo, uma vez que não subestima a toxicidade das misturas de substâncias e dado que em estudos mais recentes demonstrou ser adequado também na previsão da toxicidade de misturas compostas por substâncias com diferentes mecanismos de ação ou mecanismos desconhecidos (Evans et al. 2012; Zhang et al. 2010), em caso de dúvida relativamente à aplicabilidade destes modelos, recomenda-se a aplicação do modelo AC na avaliação dos efeitos tóxicos de todas as misturas, independentemente do modo de ação de cada um dos seus componentes individuais.

Vários estudos demonstram que a previsão da toxicidade de uma mistura de substâncias num organismo tão complexo como o do ser humano não é corretamente realizada usando como única base o conhecimento da toxicidade individual de cada componente e o seu respetivo mecanismo de ação, uma vez que outros fatores tal como mecanismos de ação secundários, transporte, distribuição, metabolismo e excreção estão presentes, podendo contribuir de forma considerável para os efeitos tóxicos (Cedergreen et al. 2008; McCarty and Borgert 2006). Por este motivo, outros modelos de previsão de efeitos tóxicos mais completos têm sido estudados, nomeadamente modelos que têm em consideração a toxicocinética e a toxicodinâmica das substâncias. No entanto, até à data não foi validado e implementado nenhum modelo que constitua melhor opção que os modelos AC e AI, apesar das suas limitações.

3- OBJETIVOS

A presente dissertação pretende contribuir para a caracterização *in vitro* da citotoxicidade da BZP e da TFMPP quando incubadas isoladamente e em simultâneo, utilizando as condições experimentais mais adequadas para representar o que se verifica a nível hepático nos indivíduos humanos que consomem as substâncias isoladamente ou em associação. Adicionalmente, pretende-se verificar a aplicabilidade de dois modelos para a previsão de toxicidade de misturas, o modelo de adição de concentrações (AC) e o modelo das acções independentes (AI), bem como conhecer os mecanismos que conduzem à toxicidade e aferir a influência da metabolização destas drogas de abuso na sua ação toxicológica, e em particular nas interações observadas.

Assim, os estudos realizados no âmbito da presente dissertação tiveram como principais objetivos:

- A caracterização do perfil de citotoxicidade da BZP e da TFMPP quando incubadas isoladamente e em associação, utilizando modelos *in vitro* de células metabolicamente competentes, nomeadamente a linha celular humana HepaRG e hepatócitos primários de rato;
- Avaliar a capacidade de previsão da citotoxicidade da mistura das duas substâncias de dois modelos farmacológicos (modelo AC e AI);
- Estudar os mecanismos subjacentes à toxicidade da BZP, da TFMPP e da mistura das substâncias na razão de 2:1, em hepatócitos primários de rato;
- A caracterização do perfil metabólico das duas drogas isoladamente e em associação em hepatócitos primários de rato;
- Correlacionar eventuais alterações verificadas no perfil de metabolização das drogas com eventuais alterações no respetivo perfil de citotoxicidade.

4- METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS TRABALHOS EXPERIMENTAIS

De forma a tornar possível a concretização dos objetivos propostos para a presente dissertação foram selecionadas as metodologias mais adequadas à obtenção de resultados, tendo em consideração a disponibilidade dos equipamentos, recursos e condições do laboratório. A sua descrição encontra-se pormenorizada nas secções seguintes, de forma a permitir uma eventual reprodução do trabalho experimental desenvolvido.

4.1- Caracterização do perfil de citotoxicidade da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura

4.1.1- Reagentes

Todos os reagentes utilizados cumpriam os requisitos analíticos de qualidade.

Na tabela 7 estão descritos os reagentes e respetivos fornecedores.

Tabela 7- Lista de reagentes utilizados na realização dos procedimentos experimentais e respetivos locais de aquisição.

Fornecedor	Reagente
Gibco by Life Technologies – Invitrogen (Barcelona, Espanha)	• Solução- tampão salina de Hank (Hank's Balanced Sal Solution, HBSS); • Soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor • Tripsina/EDTA 0,25%
Biochrom AG (Berlim, Alemanha)	• Mistura de antibióticos: penicilina (10000 U/mL)/estreptomicina (10000 µg/mL)
Merck (Darmstadt, Alemanha)	• Ácido clorídrico (HCl) (37%) • Ácido perclórico (HClO₄) (70-72%) • Cloreto de cálcio (CaCl₂) (99,5%) • cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O) (99,5%) • Cloreto de potássio (KCl) (≥99,5%) • Dimetilsulfóxido (DMSO) (99%) • Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃) • Hidrogenofosfato di-potássico (KH₂PO₄) (≥99%) • Hidróxido de sódio (NaOH) (99%) • Isoflurano (C₃H₂ClF₅O) (100%) • Isopropanol (C₃H₈O) • Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O) (>98%)

Tabela 7 (cont.)- Lista de reagentes utilizados na realização dos procedimentos experimentais e respectivos locais de aquisição.

Sigma-aldrich (St. Louis, EUA)	• 2-vinilpiridina • Ácido 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (98%) • Ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA) (99%) • Ácido etilenoglicol-bis (beta-aminoetil)-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA) (97%) • Albumina de soro bovino (fração V) • Bicarbonato de potássio (KHCO₃) (≥99%) • Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (98%) • Colagenase de <i>Clostridium histolyticum</i> tipo IA (≥600CDU¹/mg de sódio) • Dexametasona • diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) • Éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE) • Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) • Fosfato dissódico (Na₂HPO₄) • Gentamicina • Glutathione redutase obtida a partir da <i>S. cerevisiae</i> • Hemissuccinato de hidrocortisona; • Insulina bovina [10 mg/ml de insulina bovina em 25 mM de Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES)] • Meio Williams' com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio • Solução de azul de tripano • Triton® X-100
Chemos (Regenstauf, Alemanha)	Benzilpiperazina (BZP)
Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemanha)	1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) (98%)

4.1.2- Linha celular HepaRG

A linha celular HepaRG constitui um modelo recente para o estudo *in vitro* do metabolismo de substâncias e da sua toxicidade em humanos (Andersson et al. 2012).

As células HepaRG são obtidas a partir de hepatocarcinomas e apresentam uma excelente plasticidade, tendo a capacidade de se diferenciarem a partir de um fenótipo epitelial em células semelhantes a hepatócitos e a células biliares quando expostas durante duas semanas, a 2% de DMSO (Andersson et al. 2012; Kanebratt and Andersson 2008a).

As células HepaRG expressam uma numerosa quantidade de genes específicos do fígado, incluindo enzimas do CYP450, tal como a CYP2D6 e a CYP3A4 (Andersson et al. 2012), enzimas estas que estão implicadas no metabolismo da BZP e da TFMPP. Por este motivo, e uma vez que este modelo *in vitro* se tem revelado valioso na avaliação da toxicidade de substâncias, bem como na investigação da indução de enzimas do

CYP450, foi um dos modelos selecionados para o presente estudo (Kanebratt and Andersson 2008b).

4.1.2.1- Descongelação

Para descongelar as células HepaRG retirou-se um criotubo com 1 mL de uma suspensão contendo 1×10^6 células/mL de meio de congelção (FBS com 10% de DMSO) da arca a -80°C e adicionou-se o seu conteúdo a um tubo de centrífuga contendo aproximadamente 5 mL de meio de cultura. O meio de cultura deve fornecer às células os nutrientes essenciais e permitir manter o pH e a pressão osmótica ideais à sua manutenção e crescimento. O meio de cultura mais adequado à linha celular HepaRG denomina-se por meio Williams' com L-glutamina, ao qual é adicionado NaHCO_3 (2,2g/L) e ajustado o pH a 7,3 com HCl ou NaOH. Após filtração esterilizante, o meio preparado foi suplementado com FBS inativado pelo calor (10%?), 1% de mistura de antibióticos penicilina (10000U/mL)/estreptomicina (10000µg/mL), 50µM de hemissuccinato de hidrocortisona e 5 µg/mL de insulina bovina.

Transferiu-se esta suspensão celular para um frasco de cultura de 25 cm² (frasco T25, Corning, NY, USA) e após 24 horas renovou-se o meio de cultura com o intuito de eliminar o DMSO remanescente e as células mortas que não aderiram e que, não sendo eliminadas, libertariam o conteúdo intracelular tóxico no meio de cultura. O meio de cultura foi mudado a cada 2-3 dias até as células atingirem confluência (cobrirem cerca de 70-80% da superfície total dos frascos).

O meio de congelção contém DMSO, um agente criopreservante penetrante (baixo peso molecular e permeável), que atravessa a membrana removendo a água do interior da célula e evita, desta forma, a formação de cristais de gelo intercelulares, os quais podem danificar permanentemente a membrana. Como o DMSO é muito tóxico à temperatura ambiente, o processo de descongelção deve ser feito com cuidado e rapidamente de forma a minimizar o contacto das células com o solvente criopreservante. Assim, o meio de cultura para o qual as células são transferidas, para além de fornecer nutrientes e condições adequadas de pH e isotonia, permite também diluir o DMSO, evitando a sua toxicidade.

4.1.2.2- Cultura da linha celular HepaRG

Uma vez que a utilização das células tem de ser contínua, existe uma rotina de cultura com necessidade de efectuar várias subculturas (passagens celulares). A passagem celular deve ser feita quando as células se encontram na fase de divisão exponencial (fase *log*), permitindo desta forma uma fase de crescimento rápida nos novos frascos, e garantindo que as células ainda não entraram em morte celular (fase de declínio).

A cultura foi mantida em frascos de cultura de tecidos com bucal inclinado com uma dimensão de 75 cm² (frascos T75, Corning, NY, USA), em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂. O meio foi renovado (13 mL) a cada 2-3 dias até as células apresentarem aproximadamente 80% de confluência, quando visualizadas ao microscópio óptico. Nesta fase, procede-se a uma tripsinização, isto é, um fenómeno enzimático que permite a quebra das ligações entre as células adjacentes e aderidas, de forma a obter uma suspensão que é facilmente dividida por novos frascos. A tripsinização deve ser realizada antes das células atingirem 100% de confluência, pois ainda se encontram na fase *log* de crescimento, permitindo que, quando transferidas para novo frasco, a adaptação e o início da nova fase de crescimento (fase *lag*) sejam rápidos.

Na tripsinização removeu-se o meio de cultura, lavou-se com 10 mL de HBSS (Ca-/Mg-) (elimina células mortas e excesso de FBS que contém enzimas e sais de magnésio e cálcio que comprometem a atividade da tripsina), adicionaram-se 2mL de tripsina-EDTA 0,25% e colocou-se 3-5 minutos na estufa, a 37°C, até a monocamada celular destacar. De seguida, inativou-se a tripsina através da adição do meio de cultura (por ação do FBS). A suspensão celular obtida foi dividida por novos frascos T75 (adicionou-se 2 mL de suspensão celular a 13 mL de meio de cultura pré-colocado nos frascos vazios) ou foi utilizada para fazer sementeira dessa mesma passagem (ver secção 4.1.2.3) para posterior incubação com as substâncias em estudo.

Note-se as células podem ser utilizadas para um determinado estudo num máximo de 10 passagens, uma vez que, com a eventual acumulação de mutações associadas à mitose, há possibilidade de ocorrerem variações genotípicas e, consequentemente, fenotípicas. Desta forma, fica assegurada uma baixa heterogeneidade genética das células utilizadas. Em caso de necessidade de perpetuar a cultura para o mesmo estudo devem ser descongeladas novas células de uma subcultura que se encontre dentro do mesmo intervalo de passagens aceitável para o estudo.

Todos os reagentes adicionados à cultura celular foram inicialmente aquecidos a 37°C em banho de água de forma a evitar variações de temperatura.

4.1.2.3-Sementeira da linha celular HepaRG

A sementeira tem como objetivo transferir um número adequado de células para as placas onde posteriormente são diferenciadas em células do tipo hepatócito e células do tipo biliar. Para o ensaio de redução do MTT foram usadas placas de 96 poços (com 200 µL de suspensão celular em cada poço).

Assim, após tripsinização, as células foram contadas em câmara de Neubauer. Idealmente a sementeira deve ser feita com uma densidade de cerca de 450.000 células/cm², ou seja, em placas de 96 poços, sendo 0,32 cm² a dimensão de cada poço (BD Bioscience, Oxford, UK), deverá ser efetuada uma sementeira numa densidade de 1,44x10⁵ células/poço (em 200 µL de meio de cultura). Vinte e quatro horas após a sementeira, foi realizada a diferenciação celular.

Nas placas de 96 poços apenas se semearam os 60 poços centrais, tendo sido colocada água esterilizada nos poços periféricos da placa. Os poços periféricos são muito propensos a evaporação, aumentando consequentemente as concentrações das soluções a testar devendo, por este motivo, ser evitado o seu uso.

Quando a densidade celular enunciada não foi atingida, a densidade obtida foi registada e, após a sementeira, deixaram-se crescer as células até atingir confluência (número variável de dias, dependente da densidade inicial) e só depois se procedeu à diferenciação. A diferenciação celular consistiu na remoção do meio de cultura das células e substituição por meio de cultura suplementado com 2% de DMSO. O processo de diferenciação decorreu durante 2 semanas e o meio de diferenciação foi mudado a cada 2-3 dias.

4.1.2.4- Congelação

De forma a permitir a manutenção da linha celular no laboratório, deve ser efetuada periodicamente a congelação de células. Para tal, em primeira instância deve-se assegurar que a morfologia e funcionalidade celulares são as adequadas, assim como se deve despistar as eventuais contaminações por microrganismos.

Antes de se iniciar a congelação, verifica-se o nível de isopropanol na caixa de criopreservação ("Mr. Frosty"). De seguida, após tripsinização, centrifuga-se a

suspensão celular obtida a 360 g durante 2 minutos e rejeita-se o sobrenadante. Ressuspende-se o *pellet* celular em meio de congelação (10% de DMSO e 90% de FBS) de forma a obter uma suspensão de 1×10^6 células/mL (após contagem em câmara de Neubauer) e coloca-se 1 mL num criotubo devidamente identificado com a linha celular, passagem, operador e data. Os criotubos são transferidos para o “Mr. Frosty” (onde são mantidos durante 24 horas) e colocados posteriormente na arca a -80°C . O isopropanol garante uma velocidade de congelação constante a cerca de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.1.3- Hepatócitos primários de rato

Os hepatócitos representam cerca de 70-80% dos constituintes celulares hepáticos e comportam uma importante e heterogénea porção de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, contemplando enzimas de fase 1 e 2. Como tal, têm-se mostrado um sistema *in vitro* fundamental em estudos farmacológicos e toxicológicos, nomeadamente na investigação do metabolismo, interações metabólicas e citotoxicidade de compostos (Andersson 2010; Guguen-Guillouzo and Guillouzo 2010; Guillouzo and Guguen-Guillouzo 2008; Hengstler et al. 2000; Steinber et al. 1999). Vários estudos têm demonstrado também uma boa correlação entre os resultados *in vitro* obtidos com os hepatócitos e resultados de estudos *in vivo* (Asha and Vidyavathi 2010; de Sousa et al. 1995; Gomez-Lechon et al. 2007; Li et al. 1997).

Os hepatócitos primários de rato constituem um dos mais valiosos sistemas de estudo *in vitro* uma vez que estas células intactas preservam a expressão de genes, das vias metabólicas, das enzimas e co-fatores enzimáticos, traduzindo uma proximidade com o ambiente a que os xenobióticos estão expostos no fígado (Gomez-Lechon et al. 2004).

4.1.3.1- Animais

O trabalho laboratorial realizado com animais foi desenvolvido em conformidade com o “Guia para o Cuidado e Uso de animais” do “Institute for Laboratory Animal Research” (IFLA 1996).

Como fonte de hepatócitos foram utilizados ratos macho *Wistar* adultos com peso entre 280-320 g (Charles-River Laboratories, Barcelona, Spain). Os animais foram aclimatizados em gaiolas de polietileno com rede de arame na parte superior, forrada com aparas de madeiras, a uma temperatura ambiente de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidade entre 40-60% e ciclos de luz de 12 horas. Os animais foram mantidos nas gaiolas em

condições que mimetizam o seu habitat natural, nomeadamente no que concerne a água e comida.

Os procedimentos cirúrgicos para o isolamento de hepatócitos foram realizados entre as 10.00 e as 12.00 horas com anestesia induzida por inalação de isoflurano.

4.1.3.2- Isolamento de hepatócitos de rato

A técnica usada para o isolamento de hepatócitos de rato foi baseada no método de perfusão com collagenase descrito por Moldéus (1978), também denominado por método de "perfusão em duas fases". Neste método, após indução da anestesia com isoflurano, é realizada uma incisão abdominal e introduzida uma cânula na veia porta do rato, iniciando-se a perfusão *in situ* do fígado com uma solução de Hank modificada (NaCl 2,7 M, KCl 0,1 M, MgSO₄·7H₂O 16 mM, Na₂HPO₄ 8,4 mM, KH₂PO₄ 8,8 mM, NaHCO₃ 25 mM, HEPES 12,5 mM, EGTA 0,6 mM e albumina 0,67%, pH 7,4), durante 10 minutos a 37 ° C. Este passo do procedimento tem como finalidade remover o sangue dos sinusóides e diminuir a concentração de cálcio extracelular (elimina assim os desmossomas hepáticos que são dependentes de cálcio). Seguidamente, faz-se uma perfusão *ex situ* com uma solução de Hank suplementada com collagenase e o seu co-fator cálcio (NaCl 2,7 M, KCl 0,1 M, MgSO₄·7H₂O 16mM, Na₂HPO₄ 8,4 mM, KH₂PO₄ 8,8 mM, NaHCO₃ 25 mM, HEPES 12,5 mM, collagenase 0,5 mg/mL e CaCl₂ 5,88%, pH 7,4), com o objetivo de hidrolisar as moléculas de colagénio hepáticas, as quais garantem a estabilidade mecânica do fígado. Dependendo da atividade da enzima, o tempo de perfusão pode ser variável, normalmente entre os 8 a 10 minutos, a 37 ° C, sendo este tempo determinado desde o início da perfusão até ao momento em que o fígado perde a sua plasticidade quando pressionado levemente com uma pinça metálica. Durante ambas as perfusões, as soluções são constantemente arejadas por uma corrente de carbogéneo (95% O₂ e 5% CO₂) e o fluxo da solução mantido a 10 mL/min.

Terminada a perfusão *ex situ* (dissociação enzimática) é efetuada a dissociação mecânica do fígado, de forma suave, em tampão de Krebs-Henseleit (NaCl 0,42 M, KCl 16,9 mM, MgSO₄·7H₂O 4,2 mM, KH₂PO₄ 4,2 mM, NaHCO₃ 25,5 mM e CaCl₂·2H₂O 9,1 mM) suplementado com HEPES 12,5 mM e albumina (1%) (pH 7,4).

Terminados os processos dissociativos, a suspensão obtida é centrifugada a 300 rpm durante 2 minutos e lavada (3 vezes) com tampão de Krebs-Henseleit suplementado com HEPES 12,5 mM (pH 7,4). Esta etapa é de extrema importância para purificar a suspensão uma vez que esta contém, para além de hepatócitos, muitas

células não-parenquimatosos do fígado (como células de Kupfer, células endoteliais e adipócitos) e células do parênquima não viáveis. Sendo os hepatócitos mais densos que as células não parenquimatosas e mortas, estes constituem o *pellet*.

4.1.3.3- Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi feita usando a técnica de exclusão do corante azul de tripano, uma vez que se trata de um método de determinação de viabilidade celular rápido e eficaz.

O azul tripano é um corante orgânico carregado negativamente que não se liga aos hepatócitos com a membrana citoplasmática íntegra uma vez que estes mantêm intacto o potencial de membrana dependente de energia. A perda deste potencial originado pelo dano celular pode causar destruição da membrana o que leva à inclusão do azul de tripano pelas células. Assim, as células mortas ou com dano são identificadas pela presença de uma coloração azul mais evidente no núcleo. Em contrapartida as células viáveis exibem um contorno esférico bem definido não sendo coradas (Louis and Siegel 2011).

Apesar de ser o método escolhido, este também apresenta algumas limitações nomeadamente, a subjetividade associada à cor azul, as diferentes técnicas de contagem praticadas pelos diferentes operadores e a distribuição aleatória devido à densidade das células (aglomeração e deposição). Para garantir uma boa qualidade experimental, considera-se que a viabilidade celular dos hepatócitos isolados de rato na suspensão obtida após o isolamento deve ser sempre superior a 80%.

4.1.3.4- Sementeira de hepatócitos isolados de rato

Após determinação da viabilidade celular (>80%), uma suspensão de 5×10^5 células viáveis/mL em meio de cultura (meio Williams' suplementado com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 10 µg/mL de gentamicina, 2ng/mL de insulina e 5 nM de dexametasona) foi semeada em placas de 96 e 6 poços com uma densidade de 156.250 de células viáveis/cm². As células foram incubadas a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂. Para o ensaio de redução do MTT, quantificação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (NOS) e integridade mitocondrial foram usadas placas de 96 poços (com 200µL de suspensão celular em

cada poço) e para os ensaios de determinação de GSH, dissulfido de glutathione (GSSG) e ATP usaram-se placas de 6 poços (com 2mL de suspensão celular em cada poço).

No dia seguinte à realização da sementeira, o meio de cultura foi removido e os hepatócitos incubados com as diluições dos compostos a testar, preparadas em meio de cultura sem FBS.

4.1.4- Exposição das células HepaRG e dos hepatócitos primários de rato à BZP, à TFMPP e às suas misturas

A citotoxicidade das duas piperazinas, BZP e TFMPP, e de três misturas diferentes destas substâncias foi avaliada quer nas células HepaRG, quer nos hepatócitos primários de rato, pelo ensaio do MTT (ver secção 4.1.5). Com base na informação obtida (curvas de concentração-resposta), foram selecionadas três concentrações (EC₂₅, EC₄₀ e EC₆₀) para cada substância e para cada uma das misturas testadas. Estas concentrações foram utilizadas nos ensaios de avaliação de stress oxidativo (quantificação de ROS e NOS, determinação da integridade mitocondrial, e dos conteúdos intracelulares de GSH, GSSG e ATP). Estes ensaios foram apenas realizados em hepatócitos primários de rato, uma vez que este modelo celular foi o que revelou ser mais sensível ao efeito pernicioso destas substâncias.

As soluções-mãe de BZP (1000 mM) e de TFMPP (2000 mM) foram preparadas em HBSS e DMSO, respetivamente, e armazenadas a -20°C. As diluições a testar nos ensaios foram preparadas extemporaneamente a partir destas soluções-mãe em meio de cultura sem soro. As misturas foram preparadas de acordo com o descrito na secção 4.1.7.

Vinte e quatro horas após a sementeira celular, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado, as células foram expostas às várias concentrações dos compostos a testar, preparadas em meio de cultura sem soro (100 µL de solução nas placas de 96 poços e 2 mL nas placas de 6 poços) e incubadas por um período de 24 horas, a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂/ 95% de O₂.

Em todas as placas foram incluídos um controlo negativo (apenas meio de cultura sem soro), um controlo positivo (1% de Triton x-100 em meio de cultura; um surfactante não iónico que leva à lise da membrana celular por destruição da integridade da bicamada lipídica (Koley and Bard 2010), e um controlo de solvente. O controlo de solvente utilizado foi DMSO 1%, que corresponde à concentração máxima

de DMSO na solução mais concentrada de TFMPP que foi testada. Ou seja, apesar da solução-mãe de TFMPP se encontrar dissolvida em DMSO, as células nunca foram expostas a uma percentagem deste reagente superior a 1%. No caso da BZP, preparada em HBSS, nunca foi utilizado um volume de solução-mãe que resultasse numa diluição do meio de cultura igual ou superior a 10%.

4.1.5-Ensaio de redução do MTT

O ensaio de redução do MTT consiste num ensaio colorimétrico que se destina à determinação da atividade das enzimas que reduzem o MTT. Estas reduções ocorrem na presença de redutases mitocondriais ativas, sendo, por isso, o ensaio de MTT usado como medida de células vivas viáveis e, conseqüentemente como medida da viabilidade celular (Mosmann 1983). Os resultados são representados por uma curva de concentração-resposta. É importante referir que, mesmo que o número de células viáveis seja constante, algumas mudanças na atividade metabólica podem produzir grandes alterações nos resultados do MTT.

Nas células vivas, o MTT (composto solúvel de cor amarela) é reduzido pelas redutases mitocondriais a um composto de formazano roxo, insolúvel, que se acumula no interior da célula (figura 13). Após adição de um solubilizante (DMSO), a absorvância é quantificada a 570 nm, que corresponde ao comprimento de onda em que a absorção desta solução é máxima.

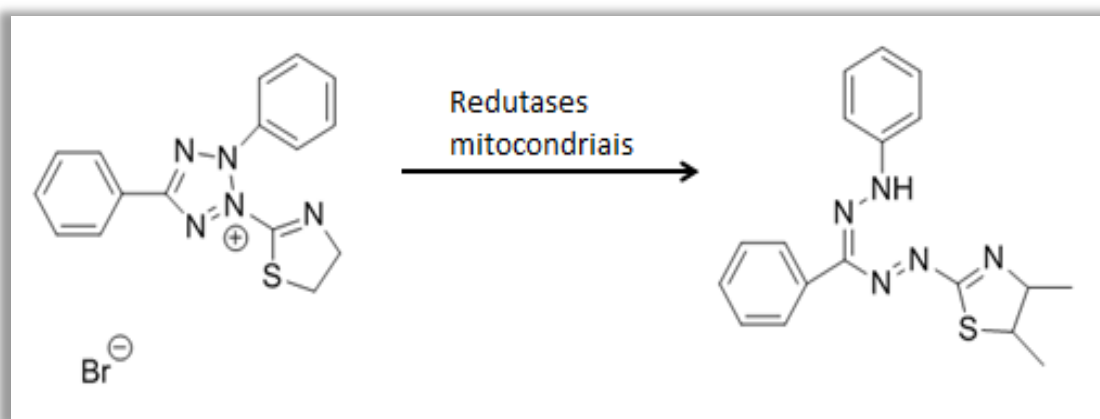


Figura 13- Redução do MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) pelas redutases mitocondriais a um derivado de formazano.

Assim, com base no fundamento do método, após 24 horas de incubação das células com os compostos a testar, o meio foi recolhido para tubos eppendorf devidamente identificados (para posterior análise do perfil metabólico) e foi adicionada às células 100 µL/poço de uma solução de MTT 500 µg/mL em meio de cultura, preparada extemporaneamente e protegida da luz com papel de alumínio. As placas foram incubadas a 37°C, durante 3 horas para as células HepaRG e 1h20m para os hepatócitos primários. De seguida, aspirou-se o meio de cultura e dissolveram-se os cristais de formazano intracelulares em 100 µL/poço de DMSO.

A análise espectrofotométrica foi feita a 550nm num leitor de placas de 96 poços (PowerWaveX; Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Os resultados foram obtidos a partir de, pelo menos, 4 experiências independentes. Em cada placa cada uma das 16 concentrações de cada composto foi testada em triplicado. Os resultados são apresentados em relação com o controlo negativo por uma curva de concentração-resposta.

4.1.6- Modelo de regressão não linear

As curvas de concentração-resposta obtidas a partir do ensaio de redução do MTT foram selecionadas utilizando a *best-fit approach*, como descrito por Scholze e colaboradores (2001), isto é, para cada conjunto de resultados foi selecionado o modelo dosimétrico mais adequado. A função *logit* foi a que melhor descreveu a resposta dos compostos testados (isoladamente e em mistura):

$$f(x) = \theta_{\min} + (\theta_{\max} - \theta_{\min}) / (1 + \exp(-\theta_1 - \theta_2 * \log(x)))$$

,onde $\theta_{\min}$ e $\theta_{\max}$ correspondem aos efeitos mínimos e máximos observados, respetivamente, x é a concentração do composto testado, θ_1 é o parâmetro para a localização e θ_2 é o parâmetro para o declive.

4.1.7- Previsão do efeito aditivo de misturas

O cálculo da previsão da citotoxicidade das misturas foi realizado após caracterização do perfil de citotoxicidade dos compostos isoladamente. Assim, com base nos resultados da toxicidade individual da BZP e da TFMPP foram preparadas e

testadas três misturas combinando as duas drogas, BZP e TFMPP, em razões diferentes.

A primeira mistura (Mistura A ou Mix EC50) foi desenhada de tal forma que ambas as substâncias estavam presentes na proporção das concentrações que provocam 50% do seu efeito máximo, ou seja, com base nos seus valores de EC50 determinados no ensaio de redução do MTT. Isso garantiu que os componentes da mistura estavam presentes em concentrações equipotentes evitando assim contribuições desproporcionais de uma única droga. A segunda mistura (Mistura B ou Mix EC01), foi preparada com o intuito de averiguar potenciais interações entre os compostos quando estão presentes em concentrações que individualmente não produzem toxicidade significativa. Assim, os compostos foram combinados de forma a que a razão das suas concentrações fosse igual à razão das concentrações que isoladamente provocam 1% de morte celular (EC01). Por último, a terceira mistura (Mistura C ou Mix 2:1) foi baseada na razão com que a BZP e a TFMPP são comumente consumidas e surgem no mercado ilícito, razão esta de 2:1, respetivamente. Esta última é também chamada de mistura realista.

Foram preparadas três soluções-mãe com base nas razões pretendidas para cada mistura e, posteriormente, foram feitas diluições seriadas de forma a abranger uma vasta gama de concentrações que permitisse a obtenção de curvas de concentração-resposta completas para cada uma das misturas.

Com base nas curvas de concentração–resposta obtidas para cada uma das substâncias, e usando os conceitos de “adição de concentrações” (AC) e de “ação independente” (AI), descritos pela primeira vez por Loewe e Muchnik (1926) e Bliss (1939), respetivamente, foi calculada a previsão do efeito aditivo global das misturas.

4.1.8- Espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e NOS)

O stress oxidativo é imposto sobre as células como resultado de pelo menos um dos seguintes três fatores: 1) aumento na geração de agentes oxidantes, 2) diminuição na proteção antioxidante, ou 3) falha na reparação do dano oxidativo, sendo o fator 1) o que mais contribui para o dano oxidativo uma vez que as células estão constantemente a gerar espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e NOS, respetivamente).

As espécies reativas incluem radicais livres, aniões reativos contendo átomos de oxigénio, moléculas que contêm átomos de oxigénio que podem produzir radicais livres ou que são quimicamente ativadas por eles, como é o caso do radical hidroxilo (HO •),

óxido nítrico (NO), radical peróxido ($\text{ROO} \cdot$), anião peroxinitrito (ONOO^-), anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2). *In vivo*, a principal fonte de espécies reativas é a respiração aeróbia, embora também possam ser produzidas pela β -oxidação peroxissomal dos ácidos gordos, pelo metabolismo microssomal, pela estimulação da fagocitose por patógenos ou lipopolissacáridos, pelo metabolismo da arginina e por enzimas específicas dos tecidos. Embora só pareça prejudicial, a geração de espécies reativas também desempenha um papel protetor e funcional importante no sistema imune (Klassen 2008).

Apesar de estarem constantemente a ser produzidas espécies reativas, as células estão armadas com um poderoso sistema de defesa antioxidante para combater esta produção excessiva. Em condições normais, as espécies reativas são eliminadas da célula através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD), catalase ou glutathione peroxidase (GPX). No entanto, quando o balanço de defesas antioxidantes naturais de células e o stress oxidativo gerado pela produção excessiva de espécies reativas fica desequilibrado podem ocorrer vários danos celulares como, por exemplo, a alteração de macromoléculas, tais como ácidos gordos poli-insaturados nas membranas lípidicas, proteínas essenciais e ADN (Klassen 2008).

A determinação da produção de ROS e NOS intracelular constitui, então, um ensaio bioquímico importante para determinação dos mecanismos de citotoxicidade das drogas. Consiste na monitorização do corante lipofílico diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), que prontamente penetra nas células e, sob ação das esterases que removem os grupos acetato (hidrólise), origina o 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), substância esta que dada a sua polaridade fica aprisionada no interior celular. O DCFH intracelular, por sua vez, é oxidado pela reação com as ROS e NOS aí presentes, gerando um componente verde fluorescente, a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Rao et al. 1992; Smith and Weidemann 1993).

O DCFH-DA é um pó insolúvel em água e, como tal, foi inicialmente preparada uma solução-mãe de concentração 4 mM em DMSO e diluída na concentração final no meio de cultura, imediatamente antes da experiência (assegurando que a concentração final de DMSO não ultrapassa os 0,05%). A solução-mãe de DCFH-DA é guardada a 20°C num frasco hermeticamente fechado e opaco.

Para esta determinação foram semeados hepatócitos primários de rato com uma densidade de 50.000 células/poço em placas de 96 poços. No dia de experiência, as células foram lavadas duas vezes com HBSS sem cálcio e magnésio e pré-incubadas com 10 μM de DCFH-DA (em meio de cultura) durante 30 minutos, a 37°C, envolvidas em papel de alumínio (para ausência de luz).

Seguidamente, as células foram lavadas duas vezes com HBSS e incubadas com 100µL por poço de cada composto a testar (BZP, TFMPP e mistura C), em três replicados, a 37°C. Cada placa incluía um controlo negativo e um controlo de solvente (seis replicados cada). Após um período de tratamento de 24 horas a fluorescência foi registada num leitor de fluorescência de microplacas (Biotek Instruments, Vermont, EUA), ajustado para 485 nm de excitação e 530 nm de emissão.

Os dados obtidos foram normalizados para os controlos negativos em cada placa e apresentados como número de vezes em que a fluorescência foi superior ao valor do controlo. Esta normalização foi requerida para diminuir a variabilidade entre as placas e entre experiências independentes.

4.1.9- Determinação do conteúdo de ATP intracelular

O ATP desempenha um papel fundamental no sistema energético das células, na regulação metabólica e na sinalização celular. Uma vez que os seus níveis se encontram rigorosamente controlados, a determinação do ATP constitui um bom indicador de citotoxicidade.

O conteúdo de ATP intracelular pode ser rapidamente determinado através de um ensaio sensível que quantifica a luminiscência emitida (máximo de aproximadamente 560nm, a pH 7,8) pela oxidação bifásica da luciferina, na presença luciferase.

O primeiro passo envolve a ativação da proteína pelo ATP para produzir um intermediário anidrido misto reativo. No segundo passo, o intermediário ativo reage com o oxigénio para criar um dioxetano transitório, o qual se decompõe rapidamente num produto oxidado, a oxiluciferina, dióxido de carbono, adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato, juntamente com emissão de luz. Quando o ATP é o reagente limitante, a intensidade da luz emitida é proporcional à concentração de ATP.

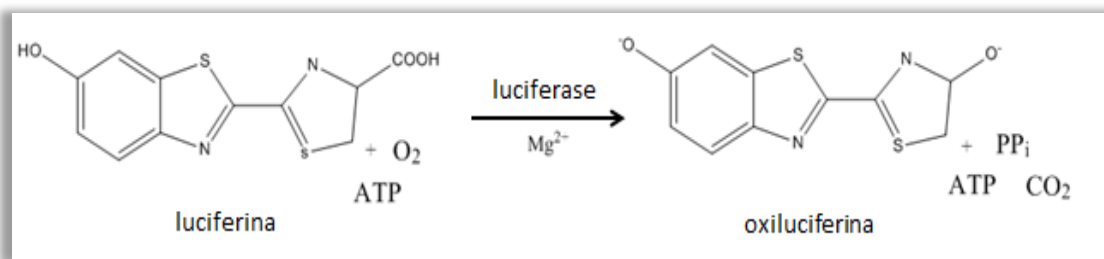


Figura 14- Reação de oxidação da luciferina catalisada pela luciferase na presença de ATP.

Para a determinação de ATP foram semeadas 1×10^6 células em placas de 6 poços. Após 24 horas, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e as células foram incubadas, a 37°C , com os compostos a testar (BZP, TFMPP e Mistura C). Após as 24 horas de incubação, o sobrenadante de cada poço foi recolhido e centrifugado durante 5 minutos a 210 g, em centrífuga refrigerada a 4°C . O sobrenadante foi rejeitado e cada poço das placas foi lavado duas vezes com 1 mL de HBSS (com cálcio e magnésio). O HBSS de lavagem foi recolhido para o tubo de centrífuga contendo o pellet. Centrifugou-se novamente a 210 g durante 5 minutos (4°C) e rejeitou-se o sobrenadante. Assegurando que não restava HBSS, o pellet celular foi lisado pela adição de 250 μL de 5% HClO_4 a cada poço, e posterior incubação durante 20 minutos, a 4°C . De seguida, recolheram-se as células raspando cada poço com um raspador de borracha (o qual deve ser mantido em etanol e lavado entre cada utilização em cada poço). A suspensão foi transferida para o tubo contendo o pellet (colocado no gelo). Por pipetagem, promoveu-se também a lise celular do pellet. A cada poço das placas voltou-se a adicionar 250 μL de HClO_4 de forma a assegurar que todo o conteúdo celular foi removido e transferido para o mesmo tubo de centrífuga. Após centrifugação durante 10 minutos a 16.000g (4°C), separou-se o pellet (para determinação proteica) do sobrenadante (para determinação de ATP, GSG e GSSG).

Todas as amostras foram congeladas a -80°C até realização das respetivas quantificações.

Para determinar o conteúdo intracelular de ATP, neutralizou-se o sobrenadante ácido descongelado das amostras/ padrões/ branco (5% HClO_4) com igual volume de KHCO_3 0,76M. A neutralização foi verificada com base na ausência de libertação de CO_2 , após a adição da base e agitação persistente em vortex. De seguida, as amostras/ padrões/ branco foram centrifugados durante 2 minutos a 16.000 g (4°C). O conteúdo intracelular de ATP foi, então, determinado em duplicado em placas de 96 poços brancas por adição de 75 μL de sobrenadante neutralizado das amostras/ padrões/ branco (5% HClO_4) e 75 μL de solução de luciferina/ luciferase [0,15 mM luciferina, 300,000 unidades de luz de luciferase *Photinus pyralis*, 50mM glicina, 10 mM MgSO_4 , 1 mM Tris, 0,55 mM EDTA, 1%BSA (pH 7.6)]. A luminescência emitida foi determinada em leitor de placas (BioTek Instruments, Vermont, USA) e a quantidade de ATP extrapolada de uma curva de calibração (0-20 μM) realizada em todas as experiências. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de proteína de cada amostra e expressos em nmol/ mg de proteína.

4.1.10- Determinação proteica

A proteína foi quantificada pelo ensaio proposto por Lowry e colaboradores (1951). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto corado com absorção máxima a 750 nm. Assim, a medição foi feita a uma absorvância de 750 NM usando um leitor de microplacas (PowerWaveX; Bio-Tek, Winooski, VT, USA) e foi comparada com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA, Sigma).

4.1.11- Determinação da Glutathiona reduzida (GSH) e do dissulfito de Glutathiona (GSSG)

Uma das primeiras consequências do metabolismo xenobióticos é a perturbação da homeostasia dos grupos tiol (proteicos e não proteicos), podendo resultar na perda da função proteica, dando início a uma cascata de eventos que levam a lesão celular.

Para elucidar a ação tóxica de uma determinada substância e dos seus metabolitos, as medições de glutathiona devem incluir a quantificação de ambas as formas reduzida e oxidada, o que pode ser feito através do ensaio de reciclagem da redutase DTNB-GSSG, descrito por Anderson (1985). Este ensaio encontra fundamento num processo enzimático sensível e específico baseado nas duas reações seguintes:



Na primeira reação verifica-se uma oxidação da GSH pelo DTNB para dar GSSG com formação estequiométrica de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB); na segunda reação observamos uma redução da GSSG a GSH pela ação de uma redutase altamente específica da glutathiona (glutathiona redutase, GR) e NADPH (2). A taxa de formação de TNB é seguida a 415 nm e é proporcional à soma da GSH e da GSSG presente. O ensaio pode ser monitorizado a 340 nm (absorção da NADPH).

O procedimento da preparação das amostras, tal como referido anteriormente foi o mesmo que o descrito no item 4.1.9.

4.1.11.1- Determinação da Glutathione total (GSH total)

Após descongelação do sobrenadante ácido as amostras foram diluídas 10 vezes com 5% HClO₄. De seguida, neutralizou-se com igual volume de KHCO₃ 0,76M e agitou-se no vortex (pH aproximadamente entre 6.8-7.2). Abriu-se o tubo e agitou-se em vortex tantas vezes quantas necessário até não haver mais formação de CO₂. Centrifugou-se durante 10 minutos a 16.000g (4°C) e adicionou-se, em triplicado, 100 µL de cada amostra/ padrão/ branco (5% HClO₄) a cada poço das placas e 65 µL do reagente preparado imediatamente antes da determinação [o reagente contém 0,24 mM de NADPH e 1,3 mM de DTNB em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 71,5 mM, NaH₂PO₄ 71,5 mM e EDTA 0,63 mM, pH 7,5)]. As placas foram então incubadas durante 15 min, a 30 ° C, num leitor de microplacas (SPECTRAMax 340PC ROM versão 3.13, Molecular Devices, EUA). Após incubação foram adicionados 40 µL de GR (10UI/mL em tampão fosfato mantido no gelo). A formação estequiométrica de TNB foi seguida a 415 nm (30°C), em modo cinético, a cada 10 segundos durante 3 minutos usando um leitor de microplacas (SpectraMAX 340pc rom V3.13, Molecular Devices, US), e a quantidade de GSH total foi extrapolada de uma curva de calibração (0-15 µg/mL) realizada em todas as experiências. O conteúdo total de GSH reduzida (tGSH) foi calculado subtraindo os valores de GSSG aos valores de tGSH de cada amostra (equação 5).

$$\text{GSH} = \text{tGSH} - (2 \times \text{GSSG}) \quad (\text{Equação 5})$$

Os resultados obtidos foram normalizados pelo conteúdo de proteína da cada amostra e expressos em µg/ mg de proteína.

4.1.11.2- Determinação do dissulfito de Glutathione (GSSG)

Para a determinação da GSSG adicionou-se 10µL de 2-vinilpiridina a cada alíquota de 200µL de sobrenadante ácido e misturou-se continuamente durante 1 hora, a 0°C, para derivatização dos grupos sulfidrílo (SH). O protocolo restante para determinação da GSSG é igual ao descrito para determinação da GSHtotal.

A quantidade de GSSG foi extrapolada de uma curva de calibração (0-8 $\mu\text{g/mL}$) realizada em todas as experiências, normalizada pelo conteúdo de proteína de cada amostra e expressa em $\mu\text{g/ mg}$ de proteína.

4.1.12- Avaliação da integridade mitocondrial (ensaio de incorporação de TMRE)

A mitocôndria desempenha um papel central nos processos bioquímicos associados com a vida e a morte das células eucariotas. Em condições fisiológicas normais o potencial de membrana gera um gradiente electroquímico estimulando a produção de ATP, o qual pode ser usado nos processos dependentes de energia. A oxidação da glucose e ácidos gordos pelas enzimas presentes na cadeia respiratória mitocondrial estabelecem um gradiente de pH através da membrana intracelular mitocondrial resultando num potencial eléctrico transmembranar entre 80 a 120 mV e um gradiente de pH entre 0,5 e 1,0.

A despolarização do potencial de membrana leva a uma abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (MPTP) que por sua vez leva a uma perda de proteínas intramembranares incluindo o citocromo C, facilitando assim a indução da apoptose. É sabido que a ativação das caspases acelera o processo de perda do potencial de membrana.

O TMRE é um corante fluorescente incorporado pela mitocôndria viável e acumula-se de forma indiretamente proporcional ao potencial de membrana da célula (Scaduto and Grotyohann 1999).

Para esta determinação foram semeadas 50.000 células em placas de 96 poços. Após 24 horas, o meio foi cuidadosamente aspirado e as células foram incubadas com cada uma das concentrações a testar das drogas e da sua mistura C, a 37°C. Ao fim de 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com HBSS e incubadas a 37°C com 100 μL de TMRE 2 μM , durante 30 minutos. Como o TMRE é um composto não solúvel em água, foi preparada uma solução stock de 2 mM reconstituindo o pó em DMSO e guardado ao abrigo da luz. Esta solução de TMRE 2 μM a utilizar no ensaio foi preparada no meio de cultura sem soro imediatamente antes do uso (a concentração de DMSO não ultrapassou os 0,05%). De seguida, o meio foi cuidadosamente aspirado e trocado por meio de 0,2% BSA em HBSS. A fluorescência foi medida a 37 °C num leitor de fluorescência de microplacas (BioTek Instruments, Vermont, USA) ajustado para

544 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os resultados foram expressos em % relativamente ao controlo.

4.1.13- Análise estatística

Os dados sobre a citotoxicidade resultantes do ensaio de redução do MTT foram obtidos a partir de, pelo menos, três experiências independentes e usando a regressão não linear *logit*.

Para os ensaios bioquímicos os resultados foram apresentados como a média $\pm$ o erro padrão da média (SEM) de pelo menos três ensaios independentes.

As comparações estatísticas foram realizadas por análise da variância unidireccional (ANOVA), seguido de teste de comparação múltipla de Dunnett.

Todos os cálculos estatísticos foram executados com o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, São Diego, California, EUA), e os resultados apresentados com um intervalo de confiança de 95% dos valores médios. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.2- Caracterização do perfil metabólico da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura, por Cromatografia Gasosa acoplada a detetor de Massa (GC-MS)

Para o estudo do perfil e interações metabólicas da BZP, TFMPP e suas misturas foi adoptada a metodologia de cromatografia gasosa com detetor de massa (GC/MS), método este que é indubitavelmente um dos mais extensamente utilizados e referidos na literatura científica para a análise qualitativa e quantitativa das drogas de abuso por garantir um elevado padrão de qualidade de análise para a identificação inequívoca de substâncias num curto espaço de tempo (Hemmersbach and de la Torre 1996).

4.2.1- Reagentes

Todos os reagentes utilizados cumpriam os requisitos analíticos de qualidade.

Na tabela 8 estão descritos os reagentes e respetivos fornecedores.

Tabela 8- Lista de reagentes utilizados na realização dos procedimentos experimentais e respetivos locais de aquisição.

Fornecedor	Reagente
Fisher Chemicals (Ourense, Portugal)	• Acetato de etilo • Metanol (MeOH) (99,8%)
Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri)	• 4-Hidroxi-3-metoxibenzilamina • Anidrido Trifluoroacético (TFAA) ($\geq 99\%$) • β-Glucuronidase <i>Helix pomatia</i> do tipo 2; • Ácido Clorídrico (HCl) (37%)
Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany)	• 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) (98%)
Chemos GmbH (Regenstauf, Germany)	• Benzilpiperazina (BZP)
Merck (Darmstadt, Germany)	• Água (H₂O) • Hidróxido de Amónia (NH₄OH) (25%) • Acetato de Sódio (C₂H₃NaO₂)

4.2.2- Padrões e amostras

De modo a tornar possível a quantificação das drogas e seus metabolitos é necessário traçar uma curva de calibração. Assim foram preparadas várias concentrações de padrões (BZP e TFMPP) em solução metanólica. As curvas de calibração foram obtidas utilizando as razões área do pico do analito/ área do pico do padrão interno (PI) e as respetivas concentrações, sendo a linearidade avaliada pelo coeficiente de correlação quadrado (R^2).

As amostras (sobrenadantes resultantes do ensaio de redução do MTT) encontravam-se congeladas a -80°C e foram selecionadas tendo em conta concentrações para as quais o efeito observado no ensaio de MTT foi bem previsto pelos modelos matemáticos (EC10 da mistura 1, EC15 da mistura 2 e EC10 da mistura 3) e concentrações para as quais o efeito de MTT se desviou do previsto dos modelos matemáticos (EC60 da mistura A, EC80 da mistura B e EC65 da mistura C), de forma a averiguar a influência metabólica nos desvios às previsões observados.

Tabela 9- Concentrações (mM) selecionadas para os ensaios metabólicos.

Mistura	Mistura A (EC50)		Mistura B (EC01)		Mistura C (2:1)	
Composto	EC60	EC10	EC80	EC15	EC60	EC10
Mistura	1,82	0,9	1,28	0,5	0,55	0,297
BZP	1,715514	0,848331	1,035431	0,404465	0,366667	0,198
TFMPP	0,104486	0,051669	0,244569	0,095535	0,183333	0,099

4.2.3-Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática tem como objetivo quebrar os metabolitos conjugados glucoronídeos e sulfatos, antes da extração.

Nesta etapa são realizados paralelamente três procedimentos: um para os padrões, um para determinação dos compostos-pai (BZP e TFMPP) e outro para determinação dos metabolitos nas amostras selecionadas.

Para hidrólise dos padrões e determinação dos metabolitos são utilizados 500µL de soluções-padrão e das amostras; para determinação dos compostos-pai utiliza-se o mesmo volume final mas sujeitando previamente as amostras a uma diluição de cerca de 10 vezes. Adicionou-se 20 µL do PI, a 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (250µg/mL), (após ensaio de optimização para verificar qual quantidade necessária para ser identificada com uma área superior a 1×10^6); 500 µL de tampão de acetato de sódio 0,2M (pH 5.2), 25 µL de β-glucoronidase (apenas às amostras) e incubou-se em banho de água a 55°C, durante 2h30 minutos.

4.2.4- Extração em fase sólida

Após hidrólise enzimática, padrões e amostras foram transferidos para uma coluna OASIS MCX® 1cm³ de extração em fase sólida. De seguida, por ação do vácuo, procedeu-se às lavagens, primeiro duas vezes com 1 mL de HCL 0,1M e, de seguida, duas vezes com 1 mL de metanol. Depois das lavagens, foi efetuada a eluição com 2 vezes 1 mL de 5% de hidróxido de amónio em metanol. O extrato recolhido foi seco lentamente em corrente de azoto e os tubos foram deixados abertos no exsiccador com pentóxido de fósforo, pelo menos durante a noite.

4.2.5- Derivatização e injeção no GC-MS

Para a análise metabólica da BZP, da TFMPP e das misturas estudadas, é fundamental o processo de derivatização como forma de aumentar a sensibilidade da sua detecção (Ewald et al. 2005). A derivatização permite, assim, melhorar a qualidade cromatográfica dos compostos (através de modificações na sua polaridade, para uma melhor separação na fase estacionária apolar da coluna cromatográfica) e também otimizar a formação de fragmentos mais característicos no espectro de massa (Segura et al. 1998).

O processo de derivatização usado para análise referida recorre ao uso do TFAA e acetato de etilo, permitindo a trifluoroacetilação de grupos amina primários e secundários, de grupos hidroxilo e grupos carboxilo (N,O-TFA) (figura 15) (Orata 2012).

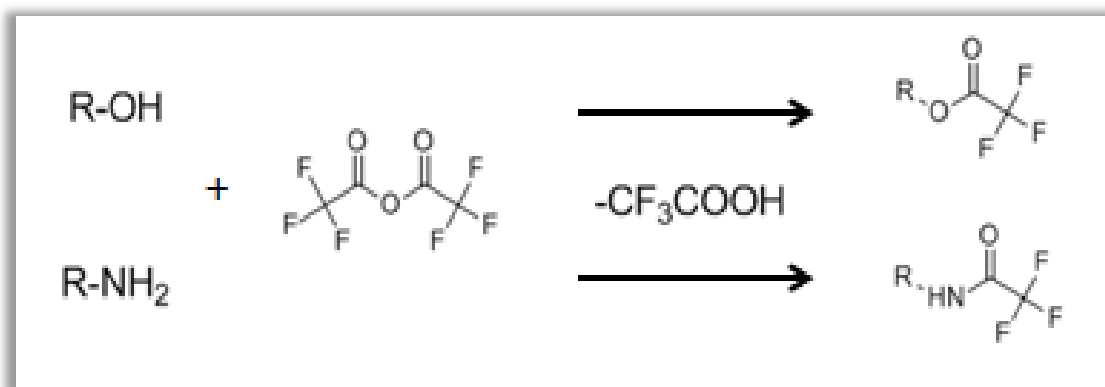


Figura 15-Mecanismo genérico de derivatização usando como reagente o anidrido trifluoroacético (TFAA), obtendo como derivados o O-TFA e N-TFA.

Uma vez extraídos os padrões e as amostras, procedeu-se então à sua derivatização.

Antes de iniciar a derivatização tem de se garantir que as tampas para os vials de derivatização contém septos de forma a evitar perdas por evaporação.

Os frascos foram retirados do exsiccador e adicionou-se ao resíduo seco 50 μ L de acetato de etilo e 50 μ L do reagente de derivatização (TFAA) e foram fechados imediatamente. Incubou-se durante 30 minutos a 70°C e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Após arrefecimento, secou-se em corrente de azoto e seguidamente dissolveu-se o resíduo obtido em 100 μ L de acetato de etilo.

As amostras e os padrões foram injectados no GC-MS, intercalando com injeções de metanol.

A análise do GC-MS foi feita num cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 (USA) equipado com um detetor de massa seletivo Varian Saturn 4000 Ion Trap (USA) e um software Saturn GC-MS versão 6.8. A porta do injetor foi aquecida a 250 °C. A temperatura inicial da coluna do forno foi de 80 °C durante 1 minuto, subindo 2 °C por minuto até aos 150 °C e permanecendo a essa temperatura durante 5 minutos. Seguidamente subiu-se 20 °C por minutos até aos 300 °C, ficando assim 2 minutos (tempo aproximado de análise de 50 minutos). O split foi de 20. Os espectros de massa foram obtidos por modo de impacto electrónico e o intervalo foi de 30 a 600 m/z. O detetor esteve desligado até aos 5 minutos. O volume de injeção foi de 2 µL e a análise foi efetuada em modo SIM e em *Full Scan*.

4.2.6- Processo de identificação

A identificação de cada analito foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e pelos espectros de massa dos compostos testados, nomeadamente através da identificação dos iões selecionados (tabela 10). Em situação de dúvida da correcta identificação de um pico, recorreu-se à base de dados NIST05.

Tabela 10- Iões selecionados para identificação das substâncias em GC-MS e respectivos padrões de fragmentação.

Substância	Iões (m/z)
Padrão Interno	232, 345
BZP	175, 181, 272
OH-BZP	107, 203, 384
OH-Metoxi-BZP	137, 220, 234, 414
BZP-etilenodiamina	91, 120, 342
Benzilamina	91, 106, 203
Piperazina	141, 169, 278
TFMPP	200, 229, 326
OH-TFMPP	216, 341, 438
TFMPP-etilenodiamina	174, 187, 284, 396
Anilina	142, 161, 238, 257

5- RESULTADOS

5.1- Estudos de citotoxicidade

5.1.1- Análise das curvas de concentração-resposta dos compostos individuais (BZP e TFMPP)

Para investigar as potenciais interações entre as duas piperazinas, BZP e TFMPP, ao nível da citotoxicidade, e determinar se estas mesmas interações podem ser estimadas com recurso a dois modelos farmacológicos, o modelo de AC e o modelo de AI, foi necessário, numa primeira fase, testar os compostos individualmente para obtenção das respetivas curvas de concentração-resposta. Foram testados dois modelos celulares distintos, a linha celular HepaRG e hepatócitos primários de rato. Com base nos parâmetros das curvas de citotoxicidade obtidas para cada uma das drogas, foi possível calcular a previsão dos efeitos das misturas em ambos os modelos celulares. Na tabela 11 encontram-se resumidos os parâmetros (de localização, de declive e de efeito máximo) de cada uma das curvas concentração-resposta para as duas linhas celulares em estudo, de acordo com o modelo de regressão usado, e as concentrações que produzem individualmente 1% e 50% do efeito máximo obtido no ensaio (EC01 e EC50, respetivamente) e na tabela 12 estão apresentados os valores de EC50 obtidos através dos dois modelos de previsão de toxicidade de misturas utilizados, AC e AI, para ambas as linhas celulares em estudo.

Tabela 11-Parâmetros obtidos para as curvas de concentração-resposta das substâncias individuais e das misturas em hepatócitos primários de rato e na linha celular HepaRG, desenhadas com recurso à função assimétrica logit.

Parâmetros estimados para o modelo de regressão					EC50 ^c	EC01 ^d	Proporção relativa nas misturas		
Modelo de Regressão	Θ_1	Θ_2^a	Θ_{max}^b				Mix A	Mix B	Mix C
Células HepaRG									
BZP	Logit	-7,374	9,077	97,45	6,5788	2,0371	0,9352	0,9189	0,6667
TFMPP	Logit	3,927	11,41	98,34	0,4558	0,1797	0,0648	0,081	0,3333
Mix A (EC50)	Logit	-8,732	14,94	100,7	3,8330	1,8899	1	-	-
Mix B (EC01)	Logit	-8,732	14,94	100,7	3,8330	1,8899	-	1	-
Mix C (2:1)	Logit	-0,6664	9,853	100,8	1,1642	0,3985	-	-	1
Hepatócitos Primários de Rato									
BZP	Logit	-1,248	3,497	104,3	2,1542	1,1642	0,9426	0,8109	0,6667
TFMPP	Logit	5,650	6,394	99,57	0,1311	0,0250	0,0574	0,1890	0,3333
MixA (EC50)	Logit	-1,824	8,677	99,27	1,1629	0,4803	1	-	-
Mix B (EC01)	Logit	0,3492	7,368	105,9	0,8659	0,2095	-	1	-
Mix C (2:1)	Logit	3,382	10,59	100,3	0,4787	0,1764	-	-	1

Θ_1 - Parâmetro de localização da curva. **Θ^a** - Declive. **Θ^b** - Efeito máximo. **EC50^c**- Concentração que produz 50% do efeito máximo (mM). **EC01^d**- Concentração que produz 1% do efeito máximo (mM). **Mix A**- Mistura de BZP e TFMPP combinadas nas respetivas concentrações que provocam 50% do seu efeito máximo. **Mix B**- Mistura de BZP e TFMPP combinadas nas respetivas concentrações que provocam 1% de morte celular. **Mix C**- Mistura de BZP e TFMPP na razão de 2:1.

Tabela 12- Valores de EC₅₀ previstos pelos modelos AC e AI para a Mistura A, B e C para os hepatócitos primários de rato e células HepaRG.

Modelo Celular	Modelos de Previsão	Valores de EC ₅₀ (mM)					
		AC	AI	AC	AI	AC	AI
		Mix A		Mix B		Mix C	
Hepatócitos primários de rato		1,3933	1,9087	0,5891	0,6792	0,3651	0,3930
HepaRG		3,8139	6,6064	4,0604	6,9603	1,1574	1,4327

As curvas de concentração-resposta foram obtidas por incubação de uma ampla gama de concentrações de BZP e de TFMPP em hepatócitos primários isolados de rato e na linha celular HepaRG, por um período de 24 horas. De modo a garantir previsões fidedignas para os efeitos das misturas, toda a informação obtida experimentalmente deve ser exacta e reproduzível (Dias da Silva et al. 2013b; Rajapakse and Kortenkamp 2002). No ensaio de redução do MTT, os compostos testados individualmente produziram efeitos de citotoxicidade (morte celular) reproduzíveis e dependentes da concentração, ou seja, com o aumento das concentrações verificou-se uma diminuição da capacidade das oxiredutases mitocondriais reduzirem o MTT, o que se traduziu por uma diminuição da viabilidade celular (isto é, aumento da morte celular).

As curvas de citotoxicidade de cada uma das drogas testadas em hepatócitos primários de rato e na linha celular HepaRG, são apresentadas nas figuras 16 e 17, com o intervalo de confiança de 95% para o efeito médio de cada um dos compostos testados (a tracejado). As leituras de absorvância foram normalizadas relativamente ao controlo negativo (incubação com 1% de DMSO) e ao controlo positivo (incubação com 1% de Triton X-100), tal como descrito na secção 4. Apesar da concentração de DMSO ser muito diminuta, foi feito o controlo da sua citotoxicidade. A figura 18 compara os resultados obtidos com os ensaios do controlo com e sem DMSO (1%) e mostra que não existe diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; teste t Student desemparelhado).

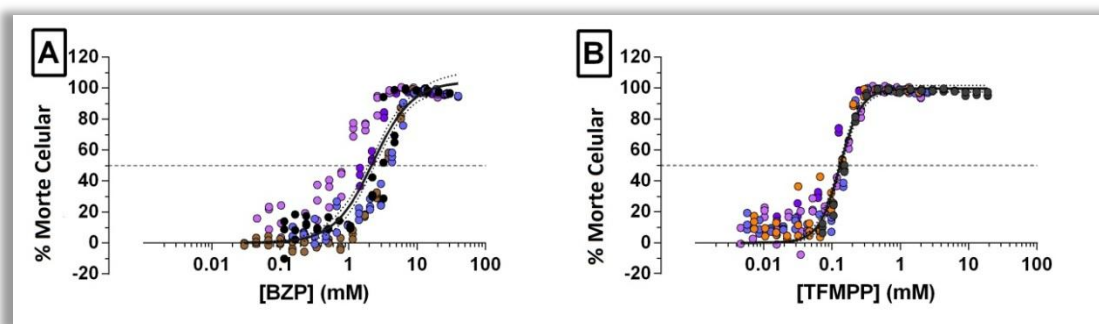


Figura 16- Curvas de concentração-resposta da BZP e da TFMPP em hepatócitos primários de rato. Os resultados experimentais encontram-se representados por círculos, correspondendo as diferentes cores a diferentes experiências independentes. Os dados foram obtidos com cinco experiências independentes (cada concentração foi testada em triplicado), através do ensaio de redução do MTT, após 24 horas de incubação.

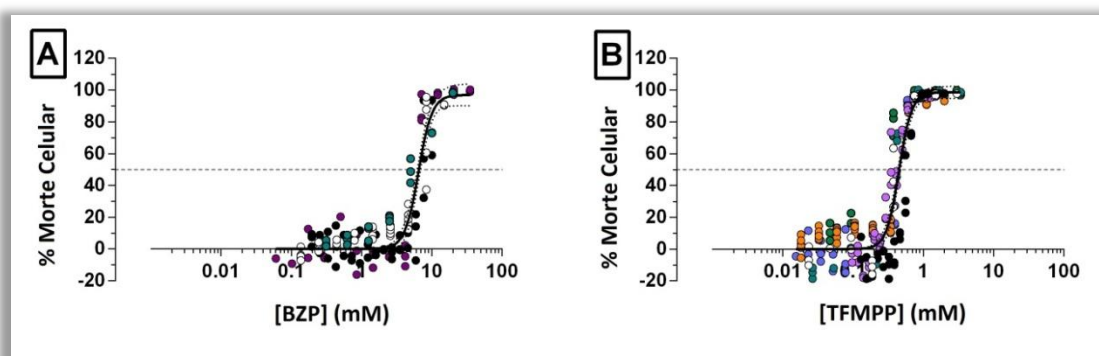


Figura 17- Curvas de concentração-resposta da BZP e da TFMPP em células HepaRG diferenciadas. Os resultados experimentais encontram-se representados por círculos, correspondendo as diferentes cores a diferentes experiências independentes. Os dados foram obtidos com, pelo menos, cinco experiências independentes e as concentrações testadas em três replicados, através do ensaio de redução do MTT, após 24 horas de incubação.

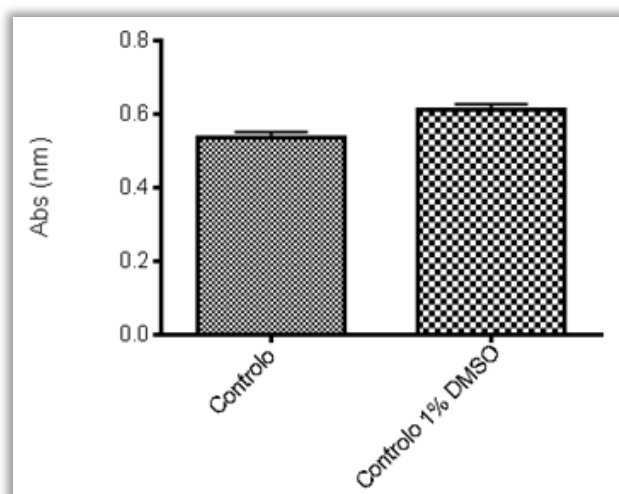


Figura 18- Absorvâncias obtidas no ensaio de redução do MTT, após incubações de 24 horas, para os controlos negativos (sem DMSO e com 1% de DMSO). Os resultados são apresentados pela média $\pm$ SEM. Teste t Student desemparelhado ($p > 0,05$).

Para as duas drogas em estudo, e em ambos os modelos celulares, foram obtidas curvas de concentração-resposta completas (até 100% de mortalidade).

Comparando as curvas de concentração-resposta da BZP e da TFMPP nos hepatócitos primários, verificamos que estas são distintas no que respeita ao declive. O mesmo já não se verifica com as curvas obtidas a partir do ensaio de MTT em células HepaRG, nas quais o declive se apresenta semelhante. Quando sobrepostas as curvas das substâncias testadas individualmente (figura 19), verifica-se que a curva correspondente à TFMPP nas células HepaRG se encontra deslocada para a esquerda comparativamente à da BZP, o que significa que a TFMPP (EC_{50} de 0,4558) é mais tóxica para estas células do que a BZP (EC_{50} de 6,5788). Esta observação foi corroborada pelos resultados obtidos nos hepatócitos primários de rato (EC_{50} -TFMPP de 0,1311 e EC_{50} -BZP de 2,1541). Comparando as duas linhas celulares, verificamos que ambos os compostos apresentam uma maior citotoxicidade nos hepatócitos primários de rato, comparativamente à linha celular imortalizada.

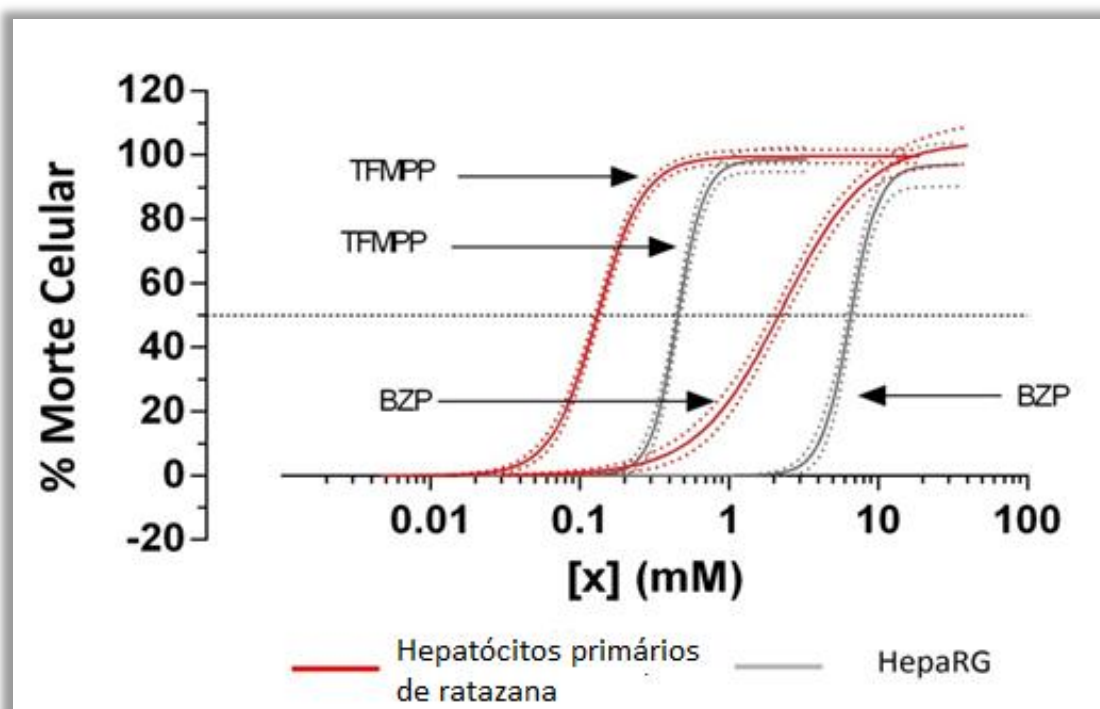


Figura 19- Curvas de concentração-resposta da BZP e da TFMPP em hepatócitos primários de rato (linha vermelha) e células HepaRG diferenciadas (linha cinzenta). As curvas foram traçadas pela função assimétrica logit (linhas contínuas) e as linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%.

5.1.2- Efeitos previstos e observados da mistura de BZP e TFMPP preparada na proporção relativa ao EC₅₀ de cada composto (Mistura A)

Como descrito na secção das metodologias, a mistura A foi preparada tendo por base os valores de EC₅₀ calculados a partir das curvas de concentração-resposta, encontrando-se, deste modo, a BZP e a TFMPP numa combinação proporcional à sua potência, ou seja, em concentrações capazes de produzir os mesmos efeitos (concentrações equipotentes), o que evita uma contribuição desproporcional de cada uma das substâncias relativamente ao efeito final.

Com base na curva de concentração-resposta de cada uma das drogas individualmente, foi possível, assumindo uma interação aditiva, prever a curva de mortalidade celular para a mistura A, recorrendo aos modelos AC e AI (figura 20). Os valores de EC₅₀ previstos pelos modelos AC e AI foram bastantes diferentes para ambos os modelos celulares, respetivamente de 1,3933 mM e 1,9087 mM para os hepatócitos primários de rato; e de 3,8139 mM e 6,6064 mM para a linha celular HepaRG (tabela 12). O facto destes modelos terem produzido curvas muito distintas permite uma boa avaliação do melhor modelo para prever os efeitos da mistura.

Após avaliação experimental da mistura A, verificou-se que os resultados obtidos apresentaram uma baixa variabilidade e permitiram traçar uma curva concentração-resposta completa. Pela análise da figura 20A (para as células HepaRG) verificamos que houve uma boa sobreposição da curva prevista pelo modelo AC com o intervalo de confiança de 95% do modelo de regressão logit dos dados experimentais. Comparativamente ao modelo AI, as curvas encontram-se deslocadas para a esquerda. Assim, a sobreposição entre o modelo AC e a curva experimental revela que as expectativas de efeitos aditivos baseadas no modelo AC estão de acordo com os resultados experimentais. Pelo contrário, o modelo de previsão AI subestima claramente os efeitos da mistura, já que a curva estimada pelo modelo se encontra francamente deslocada para a direita, face à curva obtida com os dados experimentais.

Na figura 20B, verificamos que a curva concentração-resposta da mistura A nos hepatócitos primários de rato, se encontra deslocada para a direita face às previsões do modelo AC, especialmente para as concentrações mais baixas testadas, o que pode revelar um ligeiro efeito antagónico entre as duas substâncias. No entanto, o mesmo não se verifica para as concentrações mais elevadas onde é possível observar uma sobreposição entre os dados experimentais e a previsão do modelo AC. Quando comparada com a curva prevista pelo modelo AI, a curva experimental encontra-se

deslocada para a esquerda a partir de aproximadamente 20% de morte celular, havendo uma sobreposição entre ambas para as gamas mais baixas de concentrações testadas.

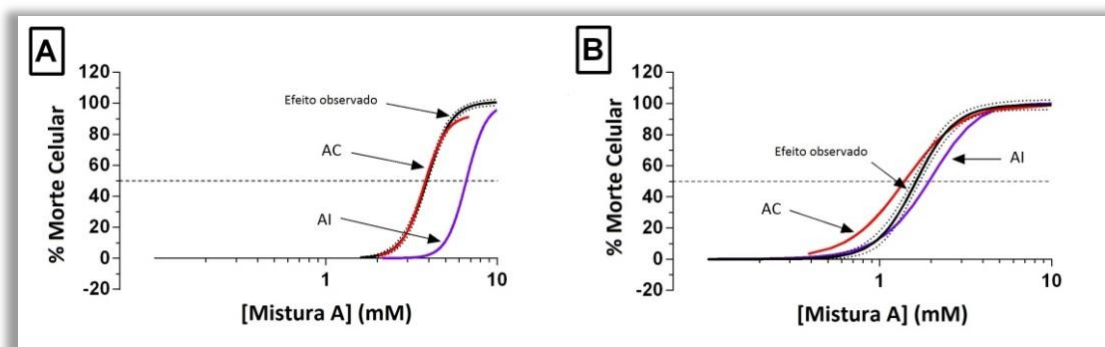


Figura 20- Mortalidade provocada pela mistura de BZP e pela TFMPP em concentrações proporcionais aos respectivos valores de EC₅₀ em células HepaRG (A) e em hepatócitos primários de rato (B). Os dados foram obtidos em, pelo menos, três experiências independentes através do ensaio de redução do MTT após 24 horas de incubação. A função assimétrica logit, traçada a partir dos dados experimentais, é representada pela linha preta contínua. As linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%. As linhas contínuas vermelha (AC) e roxa (AI) representam a previsão para a mistura EC₅₀ obtida através dos modelos AC e AI, respetivamente.

5.1.3- Efeitos previstos e observados da mistura de BZP e TFMPP preparada na proporção relativa ao ECo1 de cada composto (Mistura B)

Na mistura B, as drogas foram misturadas de um modo semelhante à da mistura A, mas aqui na proporção da sua ECo1, isto de forma a permitir testar possíveis efeitos de mistura quando as concentrações dos compostos testados individualmente não produziram toxicidade significativa. Os resultados obtidos nas experiências são apresentados na figura 21, para as células HepaRG (A) e para os hepatócitos primários de rato (B).

Pela análise da figura 21 A, verificamos que para a linha celular HepaRG a curva da mistura B obtida experimentalmente é concordante com a curva prevista pelo modelo AC, mas encontra-se à esquerda da curva prevista pelo modelo AI. Pelo contrário, nos hepatócitos primários de rato, a curva da mistura B obtida experimentalmente encontra-se deslocada para a direita relativamente às curvas previstas por ambos os modelos, até cerca de 90% da morte celular.

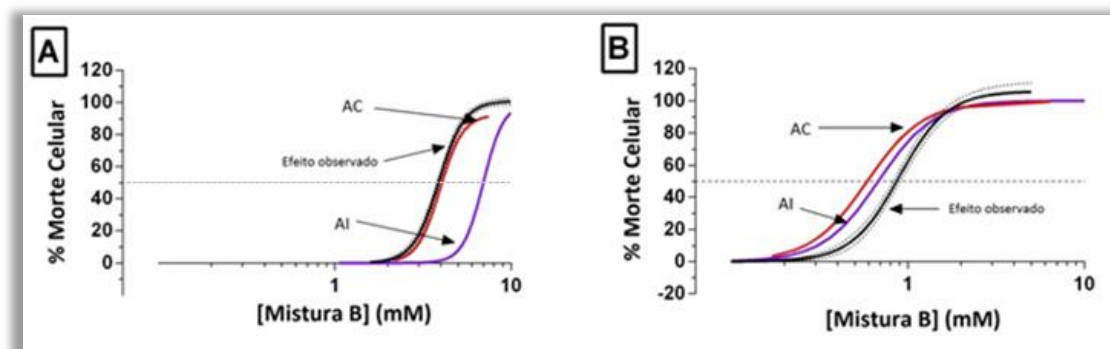


Figura 21- Mortalidade provocada pela mistura de BZP e pela TFMPP em concentrações proporcionais aos respectivos valores de ECo1 em células HepaRG (A) e em hepatócitos primários de rato (B). Os dados foram obtidos em, pelo menos, três experiências independentes através do ensaio de redução do MTT após 24 horas de incubação. A função assimétrica logit, traçada a partir dos dados experimentais, é representada pela linha preta contínua. As linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%. As linhas contínuas vermelha (AC) e roxa (AI) representam a previsão para a mistura ECo1 obtida através dos modelos AC e AI, respetivamente.

Na linha celular HepaRG é possível observar efeitos citotóxicos de mistura substanciais (e estatisticamente significativos relativamente aos controlos, $p < 0,001$) mesmo quando as drogas foram combinadas em concentrações que individualmente não produziriam qualquer efeito (figura 22). Assim, tal como anteriormente se tinha verificado com a mistura A, observou-se que os resultados obtidos experimentalmente com a mistura B foram idênticos aos previstos pelo modelo AC.

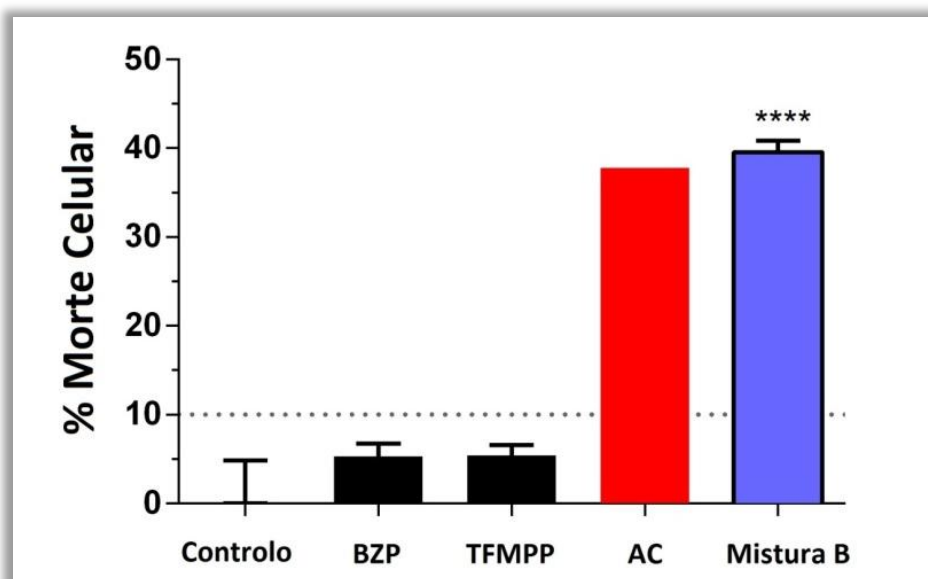


Figura 22- Mortalidade na linha celular HepaRG provocada pela BZP e pela TFMPP, em concentrações correspondentes ao seu ECo₁ (2,0371 mM e 0,1797 mM, respetivamente), quando presentes quer isoladamente, quer em mistura (Mistura B). A linha a tracejado representa o somatório dos efeitos individuais, obtido pelo cálculo da soma aritmética dos efeitos individuais da BZP e da TFMPP. Os resultados correspondem à média $\pm$ SEM. Teste *t* Student desemparelhado (***) $p < 0,001$.

5.1.4- Efeitos da mistura representativa de um cenário realista de exposição à BZP e à TFMPP (Mistura C)

Como foi referido na secção da Introdução, a BZP e a TFMPP são muitas vezes consumidas em conjunto, sendo mais vulgarmente combinadas numa razão de 2:1, respetivamente (Arbo et al. 2012). Assim, com o objetivo de simular um cenário real de consumo, foi desenhada a mistura C que combina as duas substâncias nesta razão.

Na figura 23, estão representadas as curvas de concentração-resposta obtidas experimentalmente, após incubação de 24 h de hepatócitos de rato e das células HepaRG com a mistura C, e as curvas correspondentes às previsões de citotoxicidade pelos modelos AC e AI para esta mistura. É possível verificar, para as células HepaRG (A), que a curva de concentração-resposta obtida experimentalmente compreende na totalidade do seu intervalo de 95% de confiança a curva prevista pelo modelo AC. No que respeita ao modelo AI, a curva prevista encontra-se deslocada à direita da curva resultante da mistura testada, pelo que subestima a sua toxicidade. Relativamente aos hepatócitos primários de rato, as curvas de previsão de ambos os modelos sobrepõem-se e a curva obtida experimentalmente encontra-se à sua direita.

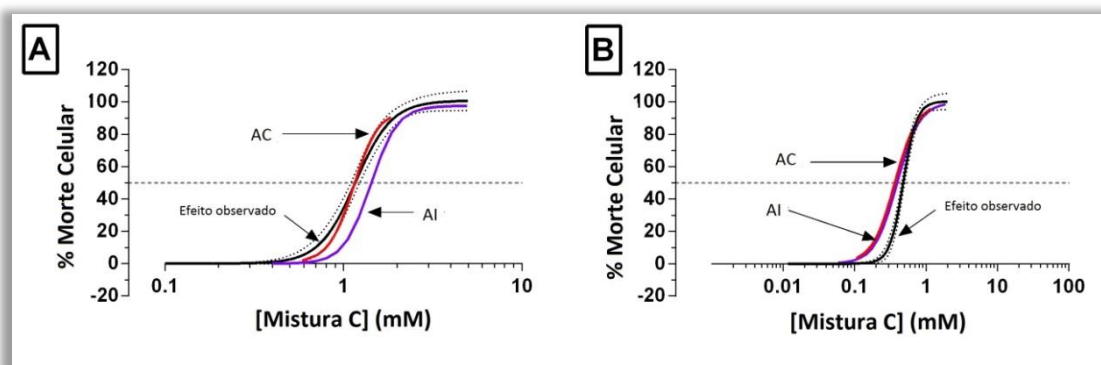


Figura 23- Curvas de concentração-resposta da mistura C em células HepaRG (A) e em hepatócitos primários de rato (B) obtidas experimentalmente e previstas pelos modelos AC e AI. A função assimétrica logit, traçada a partir dos dados experimentais, é representada pela linha preta contínua. As linhas a tracejado representam o seu intervalo de confiança de 95%. As linhas contínuas vermelha (AC) e roxa (AI) representam a previsão para a mistura realista obtida através dos modelos de adição de concentração e de ação independente, respetivamente.

5.2- Avaliação da influência do stress oxidativo e integridade mitocondrial na citotoxicidade das piperazinas

Uma vez demonstrada a citotoxicidade no ensaio de redução do MTT, foram testados diferentes marcadores de stress oxidativo e integridade mitocondrial (determinação dos níveis intracelulares de ROS, NOS, GSH e GSSG, ATP e incorporação de TMRE). Estes ensaios foram efetuados com o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos subjacentes à toxicidade da BZP, da TFMPP e das misturas. Para tal, procedeu-se à incubação das drogas individualmente e da mistura C, em hepatócitos primários de rato (revelou-se o modelo mais sensível), em concentrações equipotentes de citotoxicidade (foram testados três níveis de citotoxicidade distintos, nomeadamente o EC₂₀, EC₄₀ e EC₆₀) determinadas pelo ensaio de redução de MTT, após 24h (tabela 13).

Tabela 13- Concentrações da BZP, TFMPP e Mistura C e concentrações individuais de BZP e TFMPP na mistura C (mM), correspondentes aos três níveis de citotoxicidade utilizados para avaliação do stress oxidativo e integridade mitocondrial nos hepatócitos primários de rato (EC20, EC40 e EC60).

	BZP	TFMPP	Mistura C		
			Mix C	BZP	TFMPP
EC20	1,060	0,088	0,362	0,121	0,241
EC40	1,661	0,113	0,417	0,139	0,278
EC60	2,778	0,152	0,492	0,164	0,328

5.2.1- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, na geração de ROS e NOS

Analisando a figura 24 verificamos que, em todas as condições testadas, a produção de ROS e NOS aumentou relativamente ao controlo. Este aumento foi indiretamente proporcional ao aumento da concentração das amostras testadas. Observou-se uma maior produção de ROS e NOS com a BZP comparativamente à TFMPP, para os níveis mais baixos de citotoxicidade (EC20 e EC40). Comparando os resultados obtidos nas substâncias individualmente com os da mistura, verificamos que a mistura apresenta uma maior produção de ROS e NOS relativamente à TFMPP isoladamente para todas as concentrações testadas e também relativamente à BZP para as concentrações mais altas (143,28% BZP, 126,03% TFMPP e 152,72% Mix C, testadas no EC40 e 165,64% BZP, 181,08% Mix C, testadas no EC60). No entanto, nenhuma das diferenças relatadas entre substâncias testadas isoladamente e em mistura são estatisticamente significativas.

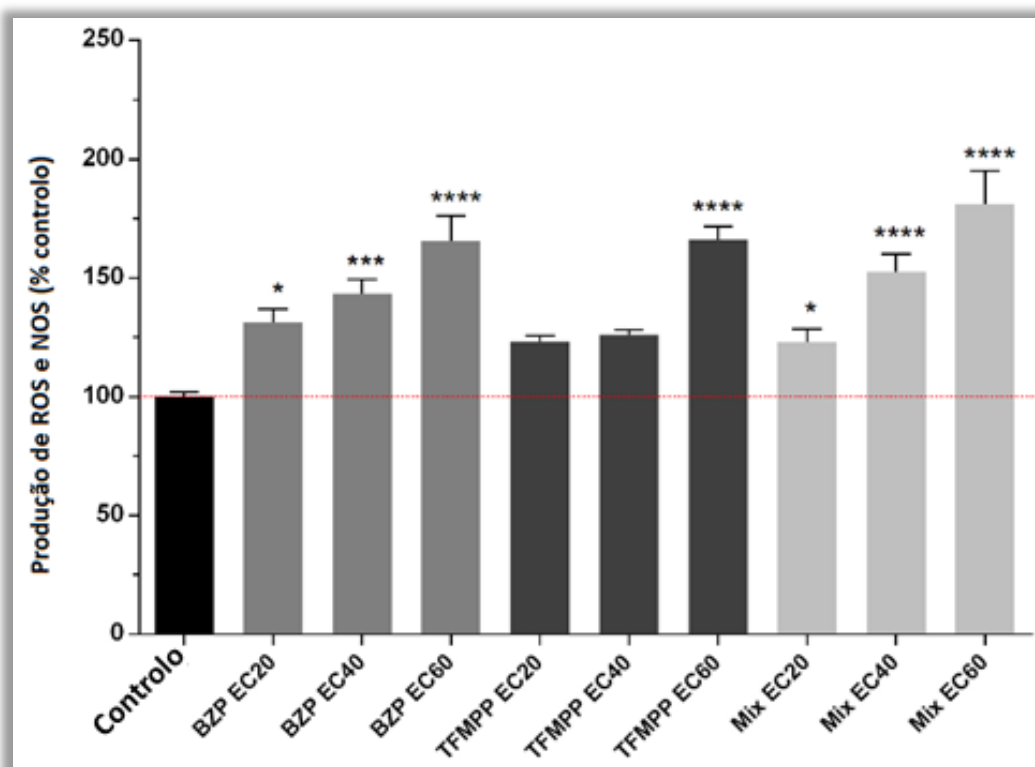


Figura 24- Efeitos da BZP, TFMPP e mistura C na produção de espécies reativas de oxigénio e azoto (ROS e NOS) nos hepatócitos primários de rato após 24 horas de incubação a 37°C. Os resultados são apresentados pela percentagem de produção de ROS e NOS relativamente ao controlo (média $\pm$ SEM) e foram obtidos através de quatro experiências independentes, realizadas em seis replicados. As comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Dunn's. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, relativamente ao valor do controlo).

5.2.2- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, nos níveis de GSH e GSSG

A presença de GSH no citosol e nos compartimentos aquosos da mitocôndria é essencial para neutralizar os efeitos nefastos dos radicais livres na célula e, desta forma, reduzir os efeitos prejudiciais dos compostos ao organismo a eles submetido.

Pela observação da figura 25 verificamos que a quantidade de tGSH diminuiu significativamente, e de forma dependente da concentração, quando as células se expõem à BZP e à mistura C, comparativamente ao controlo. Relativamente à TFMPP houve uma diminuição da tGSH indiretamente proporcional à concentração, mas não foi estatisticamente significativa comparativamente com o controlo. Comparando a influência das duas piperazinas em estudo, individualmente, verificamos que a BZP diminuiu os níveis de redGSH para valores inferiores aos induzidos pela TFMPP, bem como de tGSH. Comparando a TFMPP com a mistura C, verificamos que na mistura há maior diminuição dos níveis de GSSG e GSH, no entanto, a diferença entre elas é

estatisticamente não significativa. No que diz respeito à comparação entre a BZP e a mistura C, verificou-se uma maior diminuição nos níveis de redGSH nas células expostas ao composto individualmente, mas foi estatisticamente não significativa. A produção de GSSG foi maior nas células expostas à substância individualmente, não se tendo verificado alterações significativas no conteúdo total de glutathiona.

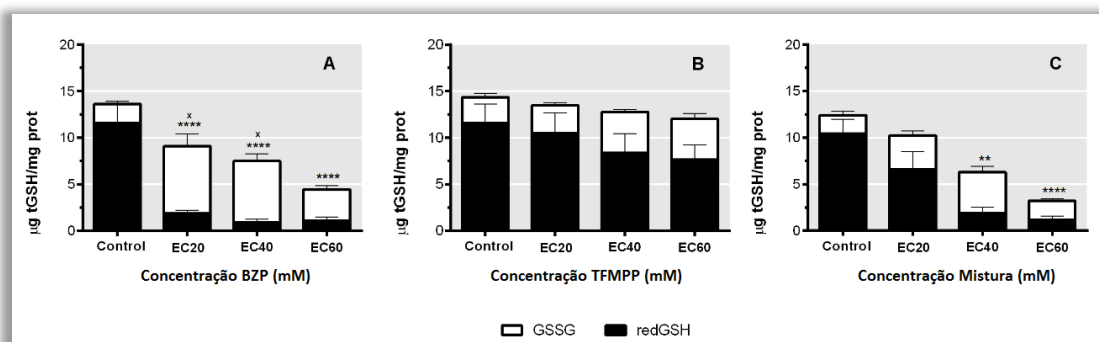


Figura 25- Efeitos da BZP (A), TFMPP (B) e mistura (C) no nível total de glutathiona (tGSH), glutathiona reduzida (redGSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG) nos hepatócitos primários de rato após 24 horas de incubação a 37°C. Os resultados são apresentados pela média $\pm$ SEM de cinco ensaios independentes. As comparações estatísticas foram feitas pelo teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, quando comparado com o controlo de redGSH; (* $p < 0,05$, quando comparado com o controlo de GSSG)

5.2.3- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, nos níveis de ATP intracelular

O ATP constituiu um reservatório de energia e a sua hidrólise, com consequente libertação dessa energia, encontra-se envolvida numa vasta gama de atividades celulares, nomeadamente na manutenção do estado energético da célula, na regulação metabólica e na sinalização celular. Assim, os níveis de ATP nas células refletem a sua integridade funcional, uma vez que todas elas estão dependentes da sua presença e quantidade para permanecerem vivas e realizarem as suas funções específicas. Uma vez que os níveis intracelulares de ATP podem estar comprometidos devido a variadas formas de stress celular, é de especial interesse no contexto deste estudo fazer a sua avaliação.

Na figura 26 verificamos que tanto as substâncias individualmente como a mistura C, provocaram uma diminuição dos níveis de ATP comparativamente ao controlo, de forma dependente da concentração. A BZP e a mistura apresentaram, para todas as concentrações testadas, uma diminuição estatisticamente significativa relativamente ao valor do controlo (9,75 nmol ATP/ mg de proteína). Para a TFMPP só

se verificou uma diminuição significativa nos níveis de ATP para a concentração de EC60 (5,91 nmol ATP/mg de proteína). A BZP foi a substância que apresentou uma maior potência na diminuição dos níveis de ATP, comparativamente à mistura C e à TFMPP, para níveis semelhantes de citotoxicidade.

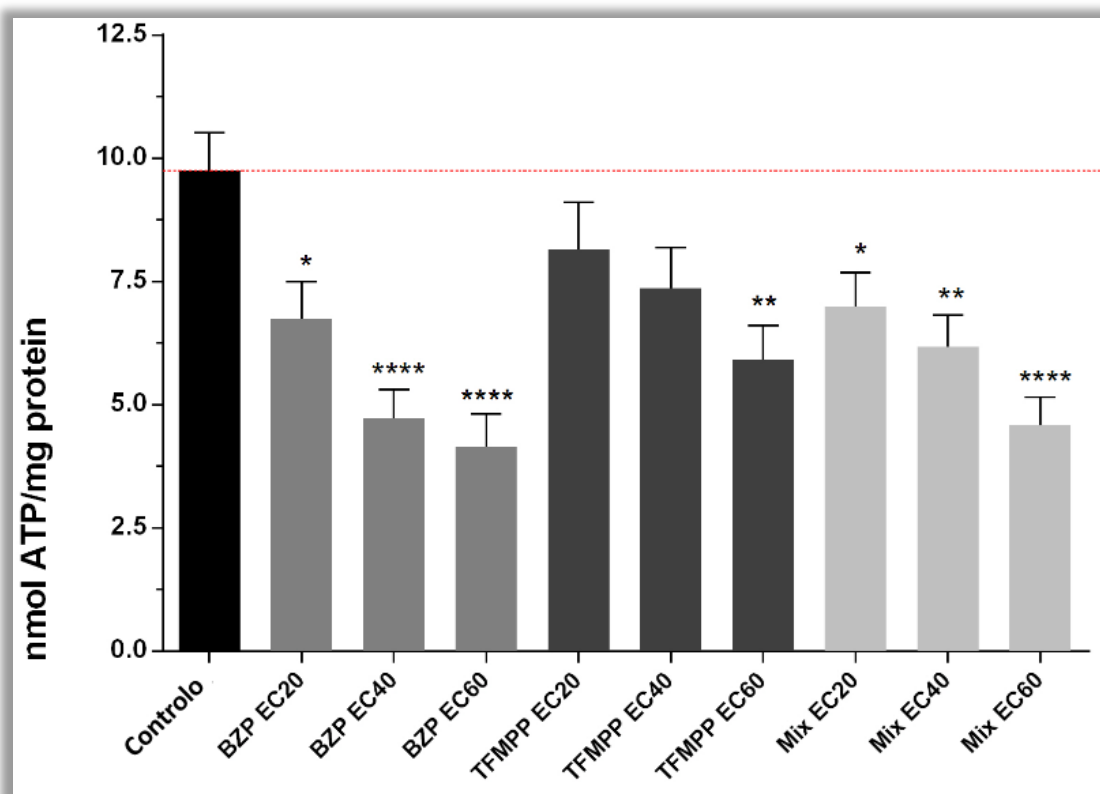


Figura 26- Efeitos da BZP, TFMPP e mistura C no conteúdo intracelular de ATP nos hepatócitos primários de rato após 24 horas de incubação a 37°C. Os resultados são apresentados pela média $\pm$ SEM de cinco ensaios independentes. As comparações estatísticas foram feitas pelo teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$, relativamente ao valor do controlo).

5.2.4- Efeito da BZP e TFMPP, individualmente e em mistura, na integridade mitocondrial

O potencial de membrana é fundamental na manutenção da função fisiológica da cadeia respiratória mitocondrial, um processo responsável pela geração de ATP. Uma perda significativa do potencial de membrana prejudica a fosforilação oxidativa, diminui a energia celular e induz a morte das células. Por este motivo, a determinação do potencial de membrana pelo ensaio de

incorporação do TMRE fornece informações de relevo sobre a integridade mitocondrial, a sua capacidade funcional e o estado fisiológico da célula.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados na presente dissertação estão apresentados na figura 27. Comparativamente ao controlo, quer as substâncias testadas individualmente quer a mistura revelaram, de forma proporcional à concentração, uma diminuição significativa na incorporação do TMRE, com excepção da concentração mais baixa da TFMPP (EC20).

A mistura C induziu uma maior diminuição da incorporação de TMRE relativamente ao controlo para todas as concentrações testadas (60,19% para EC20, 40,28% para EC40 e 35,34 para EC60). A BZP revelou neste estudo uma maior potência no comprometimento da integridade mitocondrial comparativamente à TFMPP, tendo apresentado para a maior concentração (EC60) uma percentagem de 73,56% de incorporação de TMRE comparativamente a 89,40% nas células expostas à TFMPP. Comparando a mistura C com os compostos testados individualmente apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a mistura e a TFMPP no EC40 (58,10% para a BZP, 73,93% para a TFMPP e 40,29% para a mistura C).

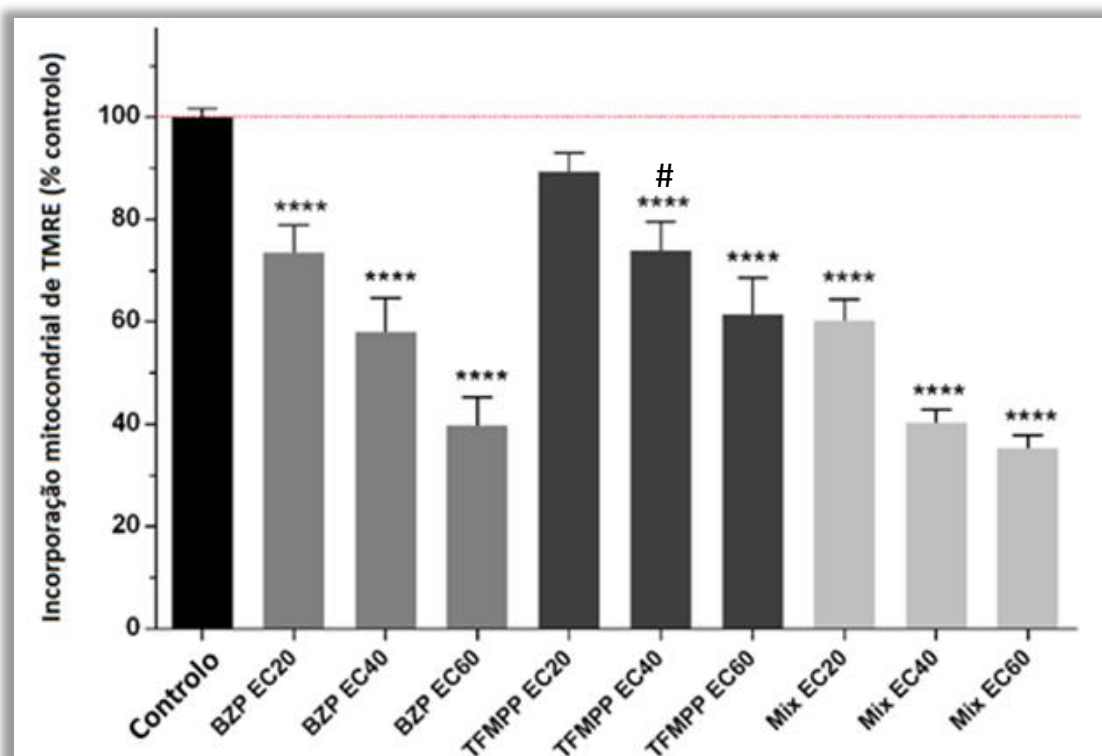


Figura 27- Efeitos da BZP, TFMPP e mistura C na incorporação na mitocôndria do etil-éster de tetrametilrodamina (TMRE) como medida da integridade da membrana mitocondrial, após 24 horas de incubação, a 37°C, em hepatócitos primários de rato. Os resultados são apresentados em percentagem relativamente ao controlo (média $\pm$ SEM). Os resultados foram obtidos em quatro experiências independentes realizadas em seis replicados. As comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Dunn's.

5.3- Comparação entre o perfil metabólico da BZP e da TFMPP quando incubadas individualmente e em mistura com hepatócitos isolados de rato

A análise dos sobrenadantes celulares após exposição à BZP e à TFMPP, individualmente e em mistura, tem como objetivo comparar o perfil metabólico em ambas as situações de forma a verificar se a sua associação induz alterações ao nível do metabolismo. Para tal, foi adoptada uma metodologia de GC-MS previamente desenvolvida no laboratório para a deteção e quantificação da MDMA e posteriormente adaptada aos derivados das piperazinas (da Silva et al. 2010; Monteiro 2012).

5.3.1. - Identificação das substâncias

Para pesquisa das substâncias inalteradas e metabolitos foram selecionados, para cada molécula, os íons mais característicos de acordo a sua abundância relativa e especificidade. Na tabela 14 estão representados os íons selecionados com base no padrão de fragmentação das substâncias após derivatização com TFAA, no entanto, os únicos compostos que conseguiram ser identificados inequivocamente foram o padrão interno (PI), a BZP, e a TFMPP (figura 28).

Tabela 14- Substâncias identificadas com base nos respectivos íons selecionados com base no padrão de fragmentação, após derivatização com o anidrido trifluoroacético (TFAA).

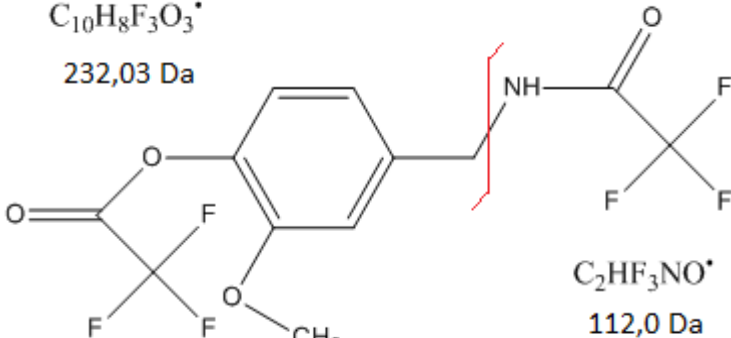
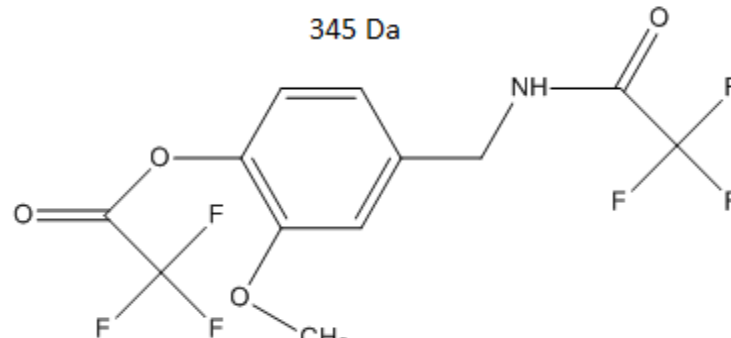
Substância	Íon (m/z)	Padrão de fragmentação
PI	232	$C_{10}H_8F_3O_3^+$ 232,03 Da  $C_2HF_3NO^+$ 112,0 Da
	345	$C_{12}H_9F_6NO_4$ 345 Da 

Tabela 14 (Cont.)- Substâncias identificadas com base nos respectivos iões selecionados com base no padrão de fragmentação, após derivatização com o anidrido trifluoroacético (TFAA).

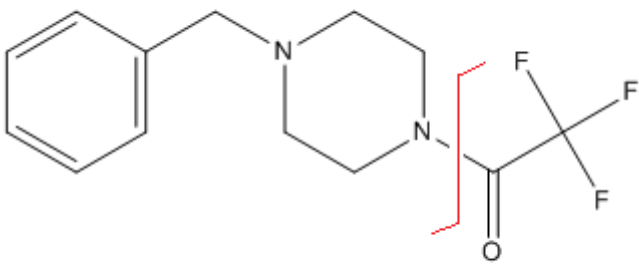
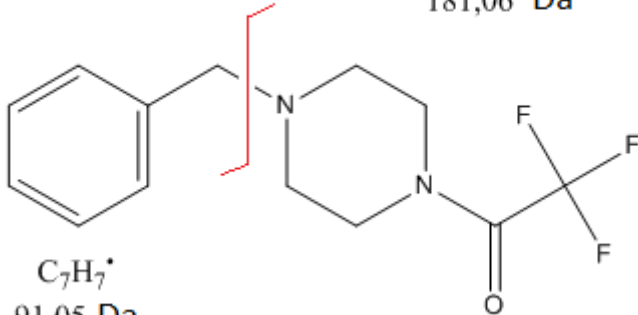
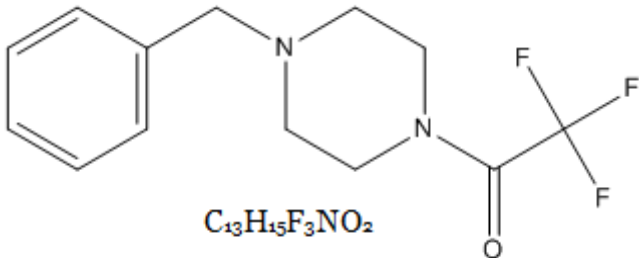
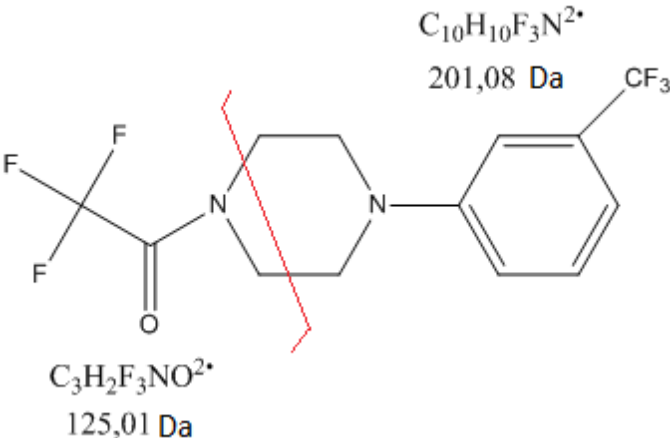
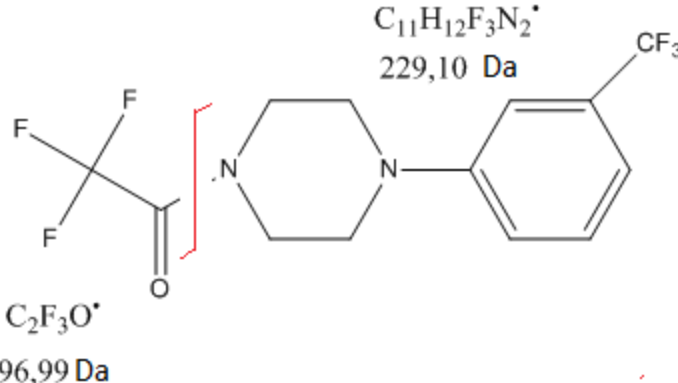
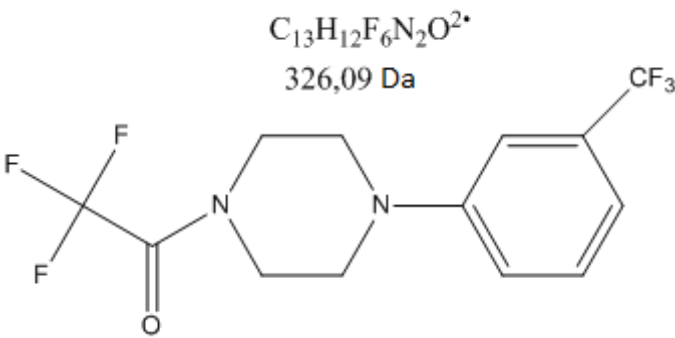
BZP	175	$C_{11}H_{15}N_2^+$ 175,12 Da  $C_2F_3O^+$ 96,99 Da
	181	$C_6H_7^+$ 91,05 Da  $C_6H_8F_3N_2O^+$ 181,06 Da
	272	 $C_{13}H_{15}F_3NO_2$ 272,27 Da

Tabela 14 (Cont.)- Substâncias identificadas com base nos respectivos iões seleccionados com base no padrão de fragmentação, após derivatização com o anidrido trifluoroacético (TFAA).

TFMPP	200	 $C_{10}H_{10}F_3N_2^+$ 201,08 Da $C_3H_2F_3NO_2^+$ 125,01 Da
	229	 $C_{11}H_{12}F_3N_2^+$ 229,10 Da $C_2F_3O^+$ 96,99 Da
	326	 $C_{13}H_{12}F_6N_2O_2^+$ 326,09 Da

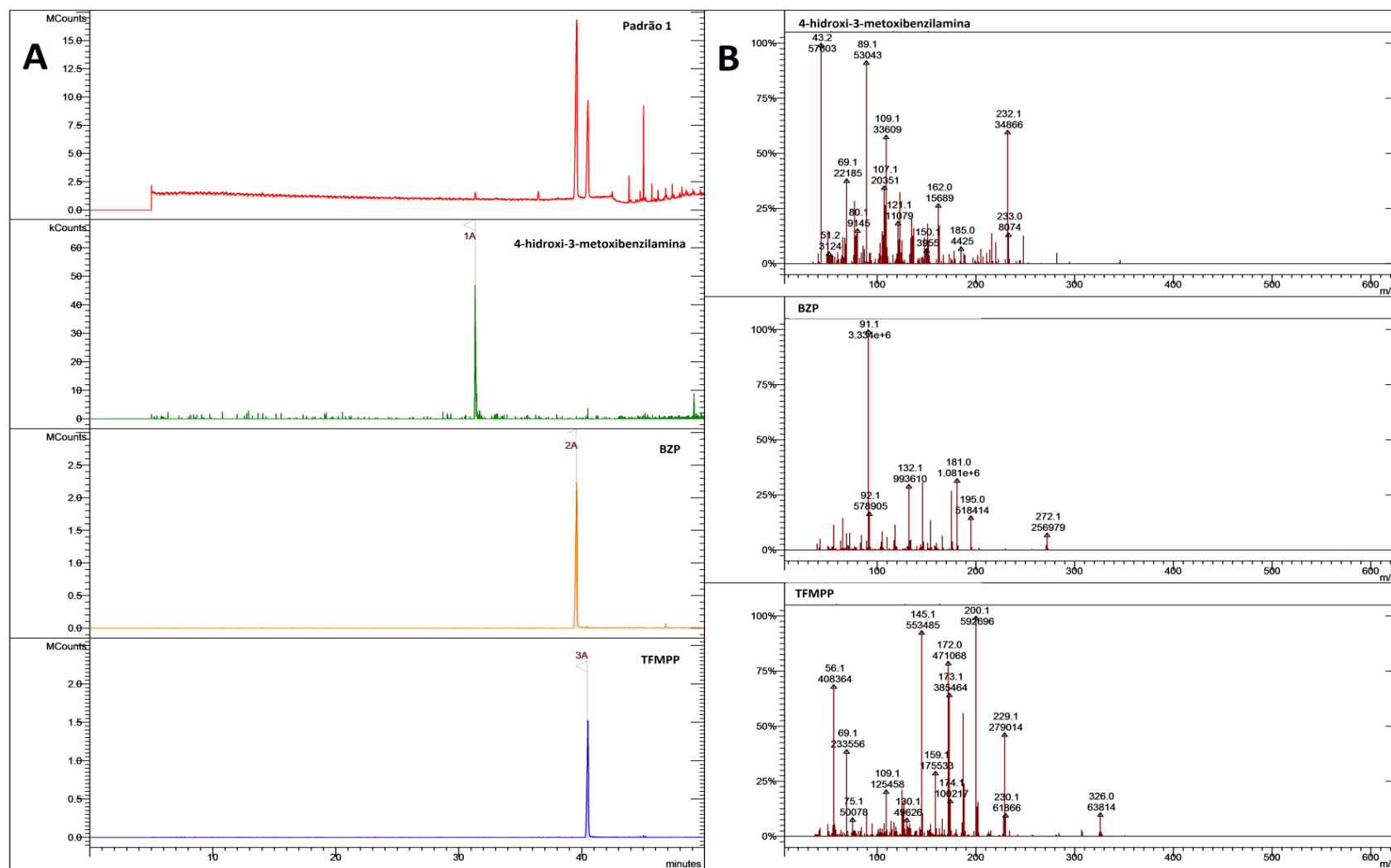


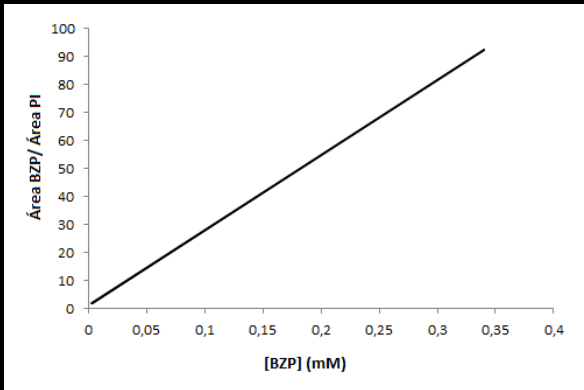
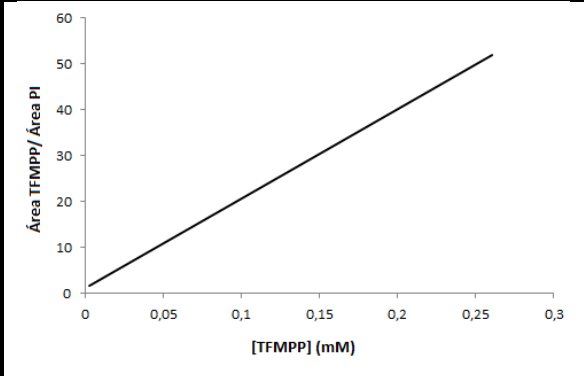
Figura 28- (A) Cromatograma representativo de uma solução de calibração (vermelho) contendo padrão interno (verde), BZP (amarelo) e TFMPP (azul) injetada no GC-MS após extração e derivatização com o anidrido trifluoroacético (TFAA). (B)- Espectro de massa do padrão interno, da BZP e da TFMPP.

5.3. 2- Estudo do perfil metabólico da BZP e TFMPP, isoladamente e em mistura, após incubação com hepatócitos primários de rato

Como já foi referido na secção 2, a BZP e a TFMPP partilham algumas vias metabólicas, o que, conseqüentemente, pode dar lugar a competição entre elas por transportadores membranares, enzimas, proteínas plasmáticas, etc, e originar alterações no metabolismo das substâncias quando administradas em conjunto. Por este motivo, foi feito um estudo preliminar para avaliar esta possível interação ao nível do metabolismo e eventuais repercussões em termos de toxicidade. Foram analisados os sobrenadantes de duas concentrações de mistura A para dois níveis de citotoxicidade distintos (EC60 e EC10). Em paralelo, selecionaram-se sobrenadantes resultantes da incubação com os compostos BZP e TFMPP individualmente nas mesmas concentrações em que as substâncias estavam presentes na mistura A.

Para a quantificação das substâncias foi necessário traçar a curva de calibração para a BZP e a TFMPP, sem que no entanto tenham sido conseguidos bons níveis de linearidade (tabela 15).

Tabela 15- Curvas de calibração para a BZP e TFMPP.

Substância	Curva de Calibração	Equação da recta	R ²
BZP		$y=268,34x-1,1181$	0,9579
TFMPP		$y=194,57x+1,1394$	0,9533

Com base na metodologia utilizada, apenas foi possível quantificar a BZP nos sobrenadantes das células expostas à substância individual e à mistura A. Os sobrenadantes testados após a exposição à TFMPP isoladamente e na mistura A não revelaram a presença do composto, não obstante as concentrações de TFMPP estarem dentro da gama de linearidade do método, sendo possível detetar a TFMPP para concentrações de padrões mais baixas do que as concentrações testadas (isoladamente e na mistura). Relativamente à BZP observou-se, para ambas as concentrações de mistura A testadas, que a quantidade detetada nos sobrenadantes das células expostas à mistura foi superior à quantidade detetada nas células expostas às mesmas concentrações de BZP isoladamente (tabela 16). Com o método utilizado não foi possível identificar qualquer metabolito, quer da BZP, quer da TFMPP.

Tabela 16- Concentração (mM) quantificada pelo método de GC-MS, nos sobrenadantes dos hepatócitos primários de rato expostos à BZP, à TFMPP e à mistura A em duas concentrações distintas (EC₆₀ e EC₁₀).

Mistura A	Concentração detetada de BZP (mM)		
	Real	Individual	Mistura
EC ₆₀	1,716	0,522	0,812
EC ₁₀	0,848	0,232	0,255
Mistura A	Concentração detetada de TFMPP (mM)		
	Real	Individual	Mistura
EC ₆₀	0,104	n.d	n.d
EC ₁₀	0,052	n.d	n.d

Concentração real: concentração de BZP e de TFMPP com que os hepatócitos primários de rato foram incubados isoladamente e na mistura A para dois níveis de citotoxicidade (EC₆₀ e EC₁₀).

6- DISCUSSÃO

As piperazinas constituem um grupo de drogas recreativas que surgiram na década de 90 e, pelos seus efeitos psicoativos, fácil aquisição e crença errada de se tratarem de substâncias relativamente seguras, constituem uma das classes de drogas recreativas sintéticas mais vendidas, apesar do seu estatuto ilegal em alguns países (Lee et al. 2011; Sheridan et al. 2007; Wood et al. 2008).

Estas drogas são muitas vezes consumidas em associação, como uma “alternativa segura” à MDMA e também com o intuito de aumentar os efeitos desejados. No entanto, a toxicidade das misturas tem sido negligenciada e a maioria dos estudos científicos incidem sobre a toxicidade dos compostos individuais, subestimando o risco real associado aos “cocktails” de drogas (Dias da Silva et al. 2013b). As informações disponíveis acerca da segurança, propriedades farmacológicas e toxicológicas, contra-indicações, interações e advertências de consumo destas drogas são ainda atualmente muito limitadas, pelo que as consequências para a saúde são ainda pouco conhecidas e difíceis de prever (Gee and Fountain 2007; Staack and Maurer 2005; Zawilska 2011).

No âmbito da presente dissertação interessa-nos, em particular, aprofundar o estudo das interações entre as piperazinas de forma a prever e explicar alguns dos seus efeitos uma vez que, tal como já verificado para outras drogas de abuso, pensa-se que o co-consumo destas substâncias, devido à sua ingestão acidental ou deliberada de misturas, pode contribuir em parte para os eventos de intoxicações inesperadas (Antia et al. 2009b; Dias da Silva et al. 2013c). Uma vez que o número de combinações possíveis entre estas drogas é, em teoria, infinito e impossível de testar quer *in vivo*, quer *in vitro*, torna-se premente a implementação de metodologias adequadas à previsão de efeitos de mistura, como forma de avaliação de risco.

Como já foi referido, o presente trabalho de investigação teve como objetivos: (i) verificar potenciais interações entre duas drogas de abuso do tipo das piperazinas, a BZP e a TFMPP, (ii) determinar se estas mesmas interações podem ser estimadas com recurso a dois modelos farmacológicos, o modelo de AC e o modelo de AI, (iii) estudar os mecanismos subjacentes à sua toxicidade e (iv) estudar eventuais alterações no perfil metabólico das drogas resultantes das suas interações.

Quer por questões éticas, quer por questões económicas, os ensaios foram realizados em dois modelos celulares *in vitro* que se consideraram mais adequados para o estudo de hepatotoxicidade e metabolismo, nomeadamente os hepatócitos primários de rato e a linha celular humana HepaRG.

6.1- Avaliação dos efeitos citotóxicos da BZP e da TFMPP individualmente e em mistura

6.1.1- Relação concentração-resposta dos compostos testados individualmente nos hepatócitos primários de rato e células HepaRG

A primeira etapa deste estudo consistiu na construção das curvas concentração-resposta da BZP e da TFMPP, em ambos os modelos celulares, de forma a permitir definir as diferentes misturas que se pretendiam testar. 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 [isto é, abrangendo o efeito nulo (0% de morte celular) até à resposta máxima (100%) no ensaio de redução do MTT].

Dos resultados obtidos para cada uma das substâncias testadas individualmente, verificamos que, em ambos os modelos celulares, a TFMPP se revelou mais tóxica para as células hepáticas comparativamente com a BZP, ou seja, a concentração necessária para matar metade das células foi 17 vezes menor para a TFMPP ($EC_{50}\text{-TFMPP}=0,13\text{ mM}$ vs $EC_{50}\text{-BZP}=2,15\text{ mM}$) nos hepatócitos primários de rato; e 15 vezes menor na linha celular HepaRG ($EC_{50}\text{-TFMPP}=0,46\text{ mM}$ vs $EC_{50}\text{-BZP}=6,58\text{ mM}$).

O ensaio de MTT demonstrou ser um método eficaz para a determinação dos efeitos de citotoxicidade, permitindo a realização de experiências com alto rendimento e baixa variabilidade, produzindo resultados reprodutíveis e curvas dose-resposta completas.

Apesar da boa reprodutibilidade das experiências de avaliação de citotoxicidade pelo ensaio de redução do MTT, verificamos a existência de alguma variabilidade interexperimental nos resultados obtidos para a BZP, no modelo de hepatócitos de rato. Alguma variabilidade de resultados, dentro do mesmo modelo celular para a mesma substância, pode ser justificada, no caso dos hepatócitos primários de rato, pela qualidade dos hepatócitos isolados, isto é, a percentagem de células viáveis obtidas após o isolamento a partir de fígado de rato. Por este motivo, é fundamental o extremo cuidado e a experiência do investigador nomeadamente na rapidez e eficiência da punção venosa da veia porta e durante os procedimentos de perfusão do fígado e

dispersão mecânica após a digestão enzimática do tecido hepático. Os valores de viabilidade celular após o isolamento, como foi referido na secção das metodologias, devem ser superiores a 80%, o que está de acordo com os resultados obtidos nas experiências realizadas no âmbito deste trabalho experimental (Cerec et al. 2007; Gripon et al. 2002). Adicionalmente, a variabilidade metabólica interindividual dos animais utilizados também pode afetar significativamente a farmacocinética de xenobióticos, neste caso em particular, a toxicidade de compostos que são bioativados/inativados.

No caso da linha celular HepaRG, apesar de muito reduzida, a variabilidade observada pode estar relacionada com alterações nas passagens ou de pontuais diferenças no tempo de diferenciação (aproximadamente 15 dias).

6.1.2- Comparação das curvas concentração-resposta das misturas obtidas experimentalmente com os resultados das substâncias testadas individualmente e com os modelos de previsão

A avaliação do tipo de mistura, nomeadamente em termos de aditividade, sinergismo ou antagonismo, depende da determinação experimental do seu efeito e da comparação com a estimativa desse mesmo efeito que, por sua vez, é calculada com base nos perfis de resposta obtidos para as substâncias que compõem a referida mistura, testadas individualmente, nas mesmas condições. Assim, após caracterização exhaustiva das relações concentração-efeito da BZP e TFMPP, individualmente, foram preparadas as misturas EC50 (mistura A), EC01 (mistura B) e EC2:1 (mistura C) e aplicados os modelos AC e AI para prever os seus efeitos de citotoxicidade (Dias da Silva et al. 2013b; Drescher 1995).

A partir dos resultados obtidos verificamos, de uma forma geral, a existência de efeitos aditivos nas três misturas preparadas na linha celular HepaRG, e que estes efeitos aditivos podem ser previstos com segurança a partir das curvas concentração-resposta das substâncias que as compõem individualmente utilizando o modelo AC. No caso dos hepatócitos primários de rato, foi observado um antagonismo em relação aos efeitos aditivos previstos pela AC, para todas as misturas.

Quando testada a mistura A, e apesar do intervalo apertado de 95% de confiança dos resultados obtidos experimentalmente, verificou-se, no caso das células HepaRG,

uma sobreposição da curva obtida experimentalmente com a curva prevista pelo modelo aditivo AC. Para os hepatócitos primários de rato, verificou-se que a curva obtida para a mistura se encontrava, exatamente, entre as curvas previstas pelos modelos AC e pela AI. Assim, seria necessário avaliar misturas diferentes destas substâncias, que permitissem diferentes previsões pelos modelos AC e AI, neste modelo de hepatócitos primários, para permitir concluir se os resultados observados se tratavam de um antagonismo ao modelo de AC, ou um sinergismo ao modelo de AI. Mesmo no caso das células HepaRG, apenas com base na análise de uma única mistura (mistura A), não se poderia afirmar com certeza que os resultados obtidos não se tratariam de um sinergismo ao modelo de AI.

Segundo Faust e colaboradores (2003), a diferença entre as previsões originadas pelos dois modelos depende de vários fatores como o declive das curvas concentração-resposta dos compostos individuais que compõem as misturas, o número de compostos presentes e as suas proporções na mistura. Este último parâmetro foi variado neste estudo ao serem testadas três misturas compostas pelas mesmas substâncias, permitindo obter uma melhor percepção das diferenças entre ambos os modelos de previsão (Drescher 1995).

Assim, quando testada a mistura ECO1 (mistura B) verificou-se que, para as células HepaRG, o modelo AC reproduziu a toxicidade da mistura. Pelo contrário, o modelo AI subestimou-a, tal como se tinha verificado com a mistura A. Os nossos resultados comprovaram as premissas do conceito AC, mostrando que a BZP e a TFMPP, mesmo quando combinadas em concentrações que seriam individualmente ineficazes, produzem efeitos de citotoxicidade significativa ($p < 0,0001$). Ou seja quando a BZP e a TFMPP são consumidas em conjunto, mesmo estando em quantidades individuais muito reduzidas ou que não produzem efeito deletério, podem exibir citotoxicidade considerável. Nos hepatócitos primários de rato verificou-se um desvio da curva experimental para a direita comparativamente a ambos os modelos, o que revela um possível desvio à aditividade entre a BZP e a TFMPP neste modelo celular, indicando um possível antagonismo entre as duas drogas.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade da associação da BZP e da TFMPP em cenários realistas foi estudada a mistura C, a qual revelou experimentalmente, nas células HepaRG, uma sobreposição com os dados previstos pelo modelo AC. Nos hepatócitos de rato, a curva de citotoxicidade obtida experimentalmente encontra-se deslocada à direita comparativamente aos modelos de previsão, o que tal como anteriormente verificado com a mistura B, indica a possibilidade de um antagonismo entre as duas drogas para as gamas de concentrações mais baixas nestas células (concentrações que provocam até cerca de 60% de efeito). Neste caso particular de

antagonismo, podem contribuir vários fatores como a diferente disponibilidade das drogas para os locais de ligação alvo, ligação a proteínas plasmáticas, a enzimas de metabolização, entre outros, de acordo com as concentrações em que estão presentes, alterando o tipo de interação observada.

Pela interpretação geral dos resultados obtidos, o modelo AC revelou-se o mais fidedigno na avaliação da toxicidade de misturas, no entanto, ambos os modelos aditivos de previsão apresentam limitações como por exemplo, o facto de não contemplarem interações farmacocinéticas entre as substâncias que compõem as misturas (Berenbaum 1989). Comparativamente ao modelo AI, com excepção dos hepatócitos primários (misturas B e C), todas as curvas experimentais se encontravam desviadas para a esquerda, indicando que, de um modo geral, este modelo subestima a toxicidade real da mistura. O facto de o modelo AC prever uma maior toxicidade que o modelo AI para as concentrações mais baixas suporta a noção que o primeiro modelo é pragmático e realista, mostrando-se por isso capaz de garantir um nível de protecção adequado quando se prevê a toxicidade de misturas, não a subestimando.

A aplicabilidade do modelo AC pressupõe que cada componente da mistura apresenta um mecanismo de toxicidade semelhante e que não interagem um com o outro, potenciando ou antagonizando-se. No entanto, sabe-se que algumas vias metabólicas da BZP e da TFMPP são comuns, o que pode justificar alguns desvios à aditividade prevista pelo modelo AC. Por este motivo foram posteriormente avaliadas possíveis alterações ao perfil metabólico resultante da combinação das duas drogas, em hepatócitos primários.

Com os nossos resultados conseguimos obter uma evidência de que os efeitos da mistura de BZP e TFMPP podem ser corretamente previstos pelo modelo AC após obtenção dos perfis de citotoxicidade de cada uma das substâncias individualmente em células HepaRG. Já nos hepatócitos primários de rato foram observados alguns desvios à aditividade. Foi também possível observar que o modelo AI subestima a toxicidade das misturas, sendo esta observação evidente nas células HepaRG, para todas as misturas testadas, e, como tal, este modelo pode ser considerado inadequado para a avaliação dos efeitos conjuntos destes compostos nos modelos *in vitro* testados. Os resultados obtidos mostram que a BZP e a TFMPP agem de forma aditiva para produzir o efeito global da mistura e o facto destes terem mostrado uma melhor correspondência com o modelo AC comparativamente ao modelo AI sugerem que existe uma possível semelhança na forma como a BZP e a TFMPP conduzem à morte celular. No entanto, de forma a se poder afirmar esta semelhança, assim como explicar as interações mecanísticas são necessárias investigações mais profundas.

O aumento de toxicidade observado aquando da exposição das células às misturas das duas piperazinas pode explicar, em parte, as incertezas no diagnóstico de intoxicação, na magnitude da mesma ou na relação causal com a morte, em caso de letalidade, quando os níveis sanguíneos ou tecidulares por si só não justificariam a ocorrência de intoxicação. Assim, torna-se claro que os efeitos aditivos das drogas devem ser tidos em consideração na análise da gravidade dos seus efeitos tóxicos e na interpretação de resultados clínicos e forenses relacionados com o abuso destas substâncias em associação.

6.1.3- Comparação dos modelos celulares: hepatócitos primários de rato e células HepaRG

No que diz respeito aos ensaios de toxicidade de drogas, um dos principais parâmetros de interesse de estudo é a sua hepatotoxicidade uma vez que o fígado é o órgão responsável pelo metabolismo e eliminação e é também reservatório de compostos tóxicos para o organismo humano. Os sistemas *in vitro* para o estudo da toxicidade de drogas e, mais particularmente, de interações metabólicas (incluindo a indução e inibição de enzimas metabólicas), são na sua grande maioria obtidos a partir de porções deste órgão metabolizador (Sahi et al. 2010; Walsky and Boldt 2008).

Uma vez que os hepatócitos representam cerca de 70-80% dos constituintes hepáticos celulares e comportam uma importante e heterogénea porção de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (enzimas de fase 1 e 2), têm-se mostrado um modelo *in vitro* fundamental para estudos farmacológicos e toxicológicos, nomeadamente na investigação do metabolismo, interações metabólicas e citotoxicidade de compostos (Andersson 2010; Guguen-Guillouzo and Guillouzo 2010; Guillouzo and Guguen-Guillouzo 2008; Hengstler et al. 2000; Steinberg et al. 1999). Vários estudos toxicológicos têm demonstrado também uma boa correlação entre os resultados *in vitro* obtidos com os hepatócitos e resultados de estudos *in vivo* (Asha and Vidyavathi 2010; Gomez-Lechon et al. 2004; Li et al. 1997).

Diferentes tipos de tecido hepático, incluindo fígados inteiros ou fracionados de dadores de órgãos, podem ser usados para preparar culturas de hepatócitos humanos (Gomez-Lechon et al. 2004). Os hepatócitos, uma vez isolados, são colocados em condições de cultura quimicamente definidas que permitem a expressão das funções bioquímicas hepáticas típicas, entre as quais a capacidade de metabolização de xenobióticos (Gomez-Lechon et al. 2007; Gomez-Lechon et al. 2004). Este modelo é

vantajoso, comparativamente a outros, uma vez que as células se encontram intactas, resultado do efeito barreira oferecido pela integridade da membrana celular, o que permite a preservação da expressão de genes, das vias metabólicas, das enzimas e co-fatores, refletindo o ambiente a que os xenobióticos estão expostos no fígado (Gomez-Lechon et al. 2004). No entanto, os hepatócitos primários humanos também apresentam desvantagens, nomeadamente a disponibilidade escassa de tecido hepático humano para a obtenção de hepatócitos isolados, contornável pelo recurso a hepatócitos criopreservados que se encontram disponíveis comercialmente (Hengstler et al. 2000; Pelkonen et al. 2008), a fraca estabilidade das suas funções em cultura, verificando-se uma diminuição gradual da expressão do CYP450 (Andersson 2010; Aninat et al. 2006), variações populacionais na expressão de enzimas, o que pode ser ultrapassado utilizando uma mistura de hepatócitos de vários dadores (Aninat et al. 2006; Brandon et al. 2003), ausência de divisão celular em culturas primárias (Guillouzo and Guguen-Guillouzo 2008), necessidade de adição de co-fatores aos meios de cultura (Donato and Castell 2003; Pelkonen et al. 2008), entre outras.

Como alternativa ao modelo ideal de hepatócitos primários humanos existe uma vasta gama de modelos *in vitro* tal como culturas de hepatócitos primários de roedores e linhas celulares derivadas de hepatocarcinomas (Backhaus and Boedeker 2000; Castell et al. 2006; Malarkey et al. 2005; Peck and Wang 2013).

As culturas de hepatócitos primários de rato (figura 30) são uma boa alternativa para os hepatócitos primários humanos uma vez que apresentam respostas metabólicas mais elevadas do que as linhas de células humanas comuns e a variabilidade entre os dadores pode ser minimizado pela seleção de animais do mesmo sexo, idade e com regimes alimentares semelhantes (Guillouzo et al. 2007).

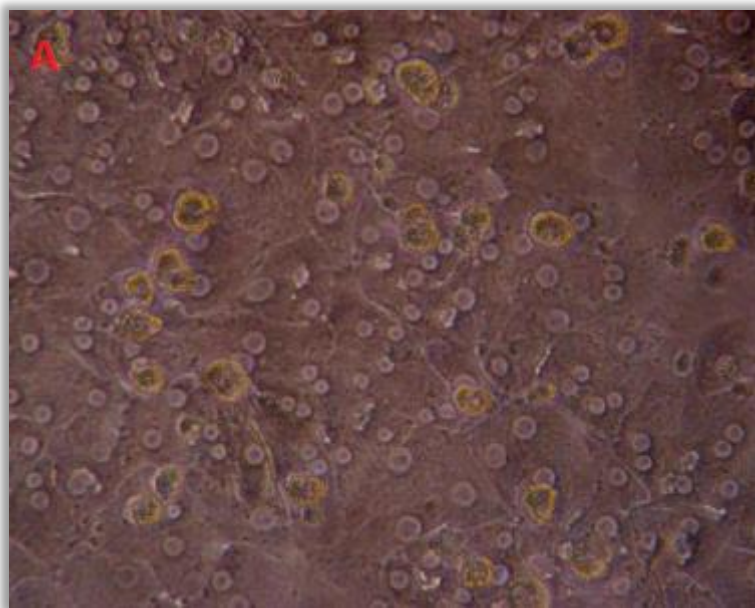


Figura 30- Aspecto característico de uma cultura de hepatócitos primários isolados de rato.

Mais recentemente foi descoberta uma nova linha celular, a linha HepaRG, derivada de um hepatocarcinoma humano (Gripon et al. 2002), a qual apresenta uma capacidade metabólica próxima da dos hepatócitos primários humanos e um potencial de proliferação indefinido e característico das células tumorais (Antherieu et al. 2010). Esta linha celular expressa não só enzimas do CYP450 e receptores nucleares CAR (*Constitutive androstane receptor*) e PXR (*Pregnane X receptor*) em níveis comparáveis aos encontrados nos hepatócitos primários, mas também outros marcadores específicos dos hepatócitos adultos, nomeadamente enzimas metabólicas de fase 2 e transportadores de xenobióticos. Esta linha celular também está apta a responder seletivamente a indutores de enzimas do CYP450 (Donato et al. 2008). As células HepaRG apresentam também a capacidade de se diferenciarem em células de hepatócitos e em células semelhantes às células biliares quando incubadas com 2% DMSO durante duas semanas (figura 31) (Cerec et al. 2007; Gripon et al. 2002; Lübberstedt et al. 2011). Apesar das células HepaRG terem menos competência metabólica comparativamente aos hepatócitos primários devido aos mais baixos níveis de expressão de algumas enzimas metabólicas, esta linha celular é metabolicamente mais competente do que as outras linhas de células imortalizadas de hepatomas humanos, como é o exemplo da linha HepG2, que também é altamente diferenciada, retendo várias características morfológicas e metabólicas (Gerets et al. 2012; Sassa et al. 1987).

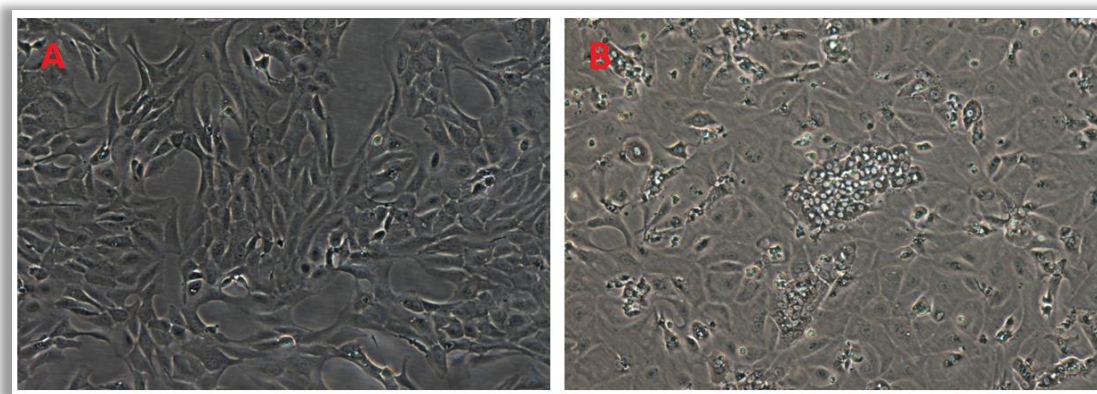


Figura 31- Aspecto característico de células HepaRG não diferenciadas (A) e após 15 dias de diferenciação com 2% de DMSO (B).

As linhas celulares de hepatócitos apresentam várias vantagens comparativamente com os hepatócitos primários, nomeadamente o facto de crescerem de forma continuada, apresentarem um tempo de vida útil quase ilimitado, apresentarem um fenótipo estável, estarem facilmente disponíveis e as condições de cultura serem mais simples e facilmente padronizáveis entre laboratórios (Donato et al. 2008).

Apesar das vantagens das linhas celulares imortalizadas de hepatócitos, estas também apresentam desvantagens nomeadamente o facto de apresentarem uma atividade limitada de algumas enzimas do citocromo P450 quando comparadas com fígados adultos humanos (Peck and Wang 2013) e não expressarem ou expressarem em níveis reduzidos algumas enzimas específicas do fígado humano e nem sempre as enzimas expressas são aquelas que se encontram no tecido hepático adulto. Por exemplo, a N-acetiltransferase que está presente neste modelo de estudo assemelha-se à enzima extra-hepática (predominando a N-acetiltransferase 1 em vez da 2). Adicionalmente, as células HepaRG também apresentam um conteúdo baixo da isoforma 2D6 do CYP450. Por estes motivos são reconhecidas algumas limitações na extrapolação dos dados obtidos com estes modelos para a situação *in vivo*, sendo reconhecido que para alguns compostos estas linhas celulares de hepatócitos não representam um bom modelo *in vitro* para estudar o metabolismo humano tal como, por exemplo, acontece com as arilaminas e hidrazinas (Aninat et al. 2006; Coroneos et al. 1991).

Comparando os resultados de citotoxicidade obtidos para os hepatócitos primários de rato e para as células HepaRG verificamos que, nas mesmas condições, as curvas de concentração-resposta obtidas para a linha celular imortalizada se encontram mais deslocadas para a direita, apresentando como tal, valores de EC₅₀ superiores

quando comparadas com os hepatócitos primários. Isto significa que as substâncias testadas se revelaram mais tóxicas quando testadas nos hepatócitos primários de rato. Sendo a BZP e a TFMPP, como anteriormente referido, metabolizadas a nível hepático por enzimas do CYP450, nomeadamente pela CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4 (Antia et al. 2009d), assumindo que sofrem bioativação, os resultados obtidos podem ser explicados pela menor expressão em geral de enzimas de CYP450 nas células HepaRG comparativamente aos hepatócitos primários de rato (Andersson et al. 2012; Kanebratt and Andersson 2008a).

6.2- Estudo dos mecanismos celulares envolvidos na hepatotoxicidade da BZP e da TFMPP, individualmente e em mistura

Uma vez que os mecanismos de toxicidade, quer das piperazinas quer das suas misturas, são praticamente desconhecidos, incluímos neste estudo a avaliação de parâmetros de stress oxidativo, estado energético e função mitocondrial dos hepatócitos primários de rato expostos às drogas individualmente e combinadas na proporção da mistura que é mais frequentemente consumida nos cenários reais de abuso (correspondendo à mistura C).

Como já foi anteriormente referido, as piperazinas são muitas vezes consumidas em cenários em que, por si só, as condições ambientais de fumo, calor e abuso de outras substâncias favorecem a formação de radicais livres. Quando os mecanismos de defesa antioxidante das células são deficientes face à quantidade de agentes oxidantes, o stress oxidativo aumenta com consequente dano vital para as estruturas celulares como é o exemplo dos ácidos nucleicos, das proteínas e dos lípidos (Dias da Silva et al. 2014; Powers and Lennon 1999). Uma das causas do stress oxidativo são as espécies reativas de oxigénio e azoto, cujo aumento de produção no fígado pode estar associado à metabolização de compostos. Devido à sua elevada reatividade, estas espécies podem interagir com os lípidos das membranas celulares conduzindo à destruição das membranas celulares num processo denominado por peroxidação lipídica. Por sua vez, os produtos resultantes da peroxidação lipídica também podem causar danos interagindo com alvos intracelulares como o ADN e proteínas, formando aductos (Bolton et al. 2000; Dias da Silva et al. 2014; Marnett 1999). A modificação destas

macromoléculas conduz a efeitos prejudiciais nas funções fisiológicas das células (Pacher et al. 2007).

No presente estudo observou-se um aumento da produção de ROS e NOS, proporcional à concentração, quando os hepatócitos primários de rato foram expostos à mistura, comparativamente aos compostos individuais. Entre os mecanismos que podem levar ao aumento das espécies reativas, estão a depleção de agentes antioxidantes, alterações na cadeia respiratória mitocondrial, falha na reparação do dano oxidativo, combinação dos metabolitos com GSH, entre outros.

A GSH presente no citosol e na zona aquosa da mitocôndria apresenta um papel fundamental na proteção contra os efeitos oxidantes provocados pelos radicais livres, atuando através de mecanismos que neutralizam estas espécies. Assim, alterações nos valores intracelulares de GSH e GSSG são fortes indicadores de perturbações redox, e um baixo nível de GSH pode indiciar uma ação hepatotóxica da BZP e da TFMPP.

A homeostase entre a GSH/GSSG é considerada uma chave determinante no equilíbrio redox da célula, sendo antiga a informação de que a glutathione tem ação não só na neutralização de ROS e NOS, como também tem um papel protetor contra a lesão celular favorecendo a regeneração da peroxidase lipídica e atividade do radical tocoferol (Di Mascio et al. 1991).

Neste estudo, para a BZP verificou-se uma diminuição no conteúdo de GSH e um aumento de GSSG, comparativamente ao controlo, de forma proporcional à concentração. Este decréscimo observado nos níveis de GSH, pode dever-se quer ao aumento verificado na formação de ROS e NOS, levando consequentemente ao aumento da formação de GSSG, quer a uma bioativação metabólica em metabolitos reativos, uma vez que estes se podem conjugar com a GSH. Esta hipótese também é válida para a diminuição de GSH observada após a exposição à TFMPP e à mistura, embora nestas duas condições experimentais, a diminuição da razão GSH/GSSG tenha sido menos evidente (Leier et al. 1996; Rossato et al. 2011).

As diferenças dos níveis de GSSG observadas de forma tão significativa entre a BZP e a TFMPP não seriam de esperar, bem como a elevada concentração intracelular de GSSG após exposição das células à BZP, uma vez que, por norma, os níveis de GSSG hepática se apresentam em níveis baixos de forma a manter a razão intracelular de GSH/GSSG elevada, minimizando assim a toxicidade da GSSG (Kretzschmar et al. 1992). O que acontece, normalmente, é que, após neutralização dos radicais livres pela GSH, a GSSG formada é expulsa para o meio extracelular contribuindo para a diminuição dos níveis de tGSH. Este efluxo é uma resposta celular de proteção da célula contra o stress oxidativo (Dias da Silve et al. 2014). No entanto, nas presentes condições experimentais observaram-se níveis elevados de GSSG intracelular, podendo

os mecanismos de extrusão da mesma, ou a capacidade da célula regenerar a forma reduzida da GSH estarem de alguma forma comprometidos. Assim, seria interessante testar no futuro a possível influência destas drogas na homeostasia da glutathione, nomeadamente a capacidade de inibir ou induzir as enzimas responsáveis pela manutenção dos níveis fisiológicos deste tripéptido antioxidante crucial.

Outro possível mecanismo de ação avaliado no presente estudo foi a diminuição dos níveis de ATP intracelulares. Na verdade, e como já foi referido, o ATP constitui um meio de armazenamento de energia fundamental para a sobrevivência e função celular participando em processos como a regulação metabólica e a sinalização celular. Nos hepatócitos primários de rato expostos à BZP, à TFMPP e à mistura verificou-se uma diminuição dos níveis de ATP, comparativamente ao controlo, dependente da concentração. Este resultado está de acordo com os indicadores de stress celular previamente descritos, refletindo a perda de integridade das células viáveis. Vários estudos mostram que o esgotamento das reservas de ATP conduz à morte celular através da indução de fenómenos de apoptose e necrose (Leist et al. 1997; Nicotera et al. 1998).

Por último, foi avaliada a integridade mitocondrial através da medição do seu potencial de membrana, o qual constitui um indicador do estado fisiológico da célula, sendo fundamental para a manutenção da cadeia respiratória mitocondrial (responsável pela formação de ATP). Assim, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial conduz a uma fosforilação oxidativa deficiente, levando a um esgotamento das reservas energéticas das células e, conseqüentemente à libertação de fatores apoptóticos culminando num aumento da morte celular. A manutenção do potencial de membrana é, portanto, fundamental para a função normal e sobrevivência das células.

Pela análise dos resultados obtidos verificamos um comprometimento da integridade mitocondrial para ambas as substâncias, isoladamente, mas que se revelou mais exacerbado no caso da BZP, comparativamente à TFMPP. No que diz respeito à comparação das substâncias individuais com a mistura C, apesar de se terem verificado algumas diferenças na incorporação do TMRE, estas só foram significativas no caso da TFMPP, quando testada na EC40.

De uma forma geral e para os diversos ensaios realizados, embora a magnitude de efeitos seja variável, não se verificaram diferenças entre as substâncias testadas individualmente e em mistura, quando comparadas as suas concentrações equipotentes. Esta similaridade nos parâmetros citotóxicos analisados, quando os hepatócitos de rato foram submetidos à BZP e à TFMPP, individualmente e em mistura, sugere uma semelhança no mecanismo de ação de cada uma das drogas isoladamente e que se mantém quando combinadas. Este facto está de acordo com a

maior aproximação do modelo de previsão AC, o qual prevê os efeitos aditivos de substâncias que provocam os mesmos efeitos por mecanismos de ação idênticos.

Sendo o presente estudo inovador, não constam na bibliografia informações relativas aos mecanismos de ação tóxicos da BZP, TFMPP em modelos celulares hepáticos, bem como são inexistentes estudos que avaliam a interação metabólica entre estas duas piperazinas.

Num estudo efetuado por Arbo e colaboradores (2014), no qual também foram estudados os mecanismos de ação da BZP e da TFMPP responsáveis pela cardiotoxicidade em cardiomioblastos H9c2 verificou-se, contrariamente aos nossos resultados e de forma interessante que, ambas as piperazinas não induziram a formação de espécies reativas, assim como não alteraram os níveis intracelulares de GSH, mesmo para concentrações citotóxicas elevadas (2000µM BZP e 500µM TFMPP). No que diz respeito à alteração do potencial de membrana da mitocôndria, apenas se observou uma perda de potencial significativa quando expostas as células à TFMPP nas concentrações de 100µM, 500µM e 1000µM. É de destacar que os cardiomioblastos apresentam uma atividade metabólica muito reduzida comparativamente aos hepatócitos, pelo que se poderá especular que a ativação metabólica destas drogas poderá ter um papel preponderante na ação citotóxica das mesmas.

É também interessante verificar que os resultados obtidos no presente estudo vão de encontro ao que já foi observado com misturas de drogas do tipo das anfetaminas, testadas num outro modelo celular hepático, as células Hep G2 (Dias da Silva et al. 2014; Dias da Silva et al. 2013a; Dias da Silva et al. 2013c). De facto, a avaliação da toxicidade da MDMA quando consumida conjuntamente com outras três anfetaminas [4-metiltioanfetamina (4-MTA), metanfetamina (METH) e *d*-anfetamina (*d*-AMP)] demonstrou que esta mistura produziu efeitos prejudiciais às células significativos, mesmo quando os compostos estavam individualmente combinados em concentrações muito baixas (0,228 mM- MDMA, 0,046 mM- 4-MTA, 0,532 mM- METH e 0,285 mM – *d*-AMP) (Dias da Silva et al. 2013b). A aditividade dos efeitos foi também demonstrada em misturas destes compostos anfetamínicos semelhantes às que foram testadas no estudo anterior, tendo sido igualmente o modelo AC o que melhor conseguiu prever os efeitos citotóxicos das misturas de anfetaminas. Também neste caso foi possível verificar a influência de mecanismos envolvendo o aumento do stress oxidativo, através do aumento na produção de ROS e NOS, da diminuição do conteúdo intracelular de GSH e de ATP, bem como na perda do potencial de membrana mitocondrial (Dias da Silva et al. 2014). Tal como acontece com as anfetaminas, que partilham o seu modo de atuação tóxica ao nível intracelular, também as piperazinas parecem atuar por mecanismos semelhantes, já que também no presente estudo o

modelo que melhor conseguiu prever os efeitos citotóxicos foi o modelo AC e as alterações nos parâmetros de stress oxidativo e de estado energético foram também semelhantes nas diferentes condições experimentais testadas.

6.3- Avaliação do impacto da mistura no perfil metabólico da BZP e da TFMPP

6.3.1- Escolha do método para avaliação metabólica da BZP, TFMPP e mistura

O método utilizado no presente estudo para a identificação e quantificação da BZP, TFMPP e respetivos metabolitos nos sobrenadantes celulares após exposição individual ou em mistura a estas drogas foi um método desenvolvido para quantificação simultânea da BZP e seus metabolitos (Monteiro 2012), método este muito semelhante ao método inicialmente desenvolvido e validado para estudos toxicocinéticos da MDMA (Dias da Silva et al. 2014), e que foi posteriormente adaptado para a BZP.

Com base neste método, a análise não pode ser efetuada sem processamento da amostra. Assim, em primeiro lugar, é necessário proceder à hidrólise dos metabolitos conjugados, uma vez que os conjugados sulfatos e glucoronídeos que são formados durante o metabolismo da BZP e da TFMPP não seriam extraídos nas condições analíticas do método. Para este estudo adoptou-se a hidrólise enzimática com a β -glucuronidase, uma vez que esta enzima possui atividade de sulfatase e de glucuronidase (Tsutsumi et al. 2005). Para efectuar a extração por fase sólida (SPE) das drogas e metabolitos utilizou-se uma coluna OASIS® MCX. A primeira etapa consiste numa lavagem com HCl, que possibilita a ionização dos compostos básicos presentes na forma não ionizada na amostra e consequentemente a sua ligação aos locais de troca iónica da coluna. Permite também a remoção de proteínas e sais e a conversão dos compostos interferentes ácidos na sua forma não ionizada. Estes interferentes ácidos e neutros são eliminados na lavagem seguinte efetuada com o metanol. Por último, de forma a neutralizar e eluir os compostos de interesse (básicos), utilizou-se como eluente uma mistura de 5% de NH_4OH em metanol.

Para a técnica de GC-MS poder ser aplicada, é necessário que todos os compostos de interesse sejam voláteis e estáveis às elevadas temperaturas requeridas

para análise. Para tal ser possível, foi necessário proceder-se à derivatização química com anidrido trifluoroacético (TFAA). Esta derivatização baseia-se numa reação de acilação (de Boer et al. 2001; Tsutsumi et al. 2006; Tsutsumi et al. 2005) que torna as substâncias voláteis, aumenta a estabilidade dos compostos piperazínicos e a resolução do pico cromatográfico, diminui os tempos de retenção e melhora a deteção pelo espectro de massa (de Boer et al. 2001). De forma a reduzir o impacto dos erros sistemáticos que afetam a precisão e a reprodutibilidade, conferindo uma maior confiabilidade aos resultados obtidos, é fundamental incluir em todos os procedimentos da análise um padrão interno (PI). A sua escolha correcta é de extrema importância e deve ser efetuada tendo em consideração alguns aspectos tais como as propriedades físicas e químicas serem similares às do(s) analito(s), a resposta no detetor ser semelhante à do(s) analito(s), não co-eluir com o(s) analito(s) e ser estável. Atendendo a essas características e com base na bibliografia científica, o PI usado no trabalho experimental da presente dissertação foi a 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina.

Com a aplicação deste método analítico não foi possível, nas condições experimentais testadas, identificar os metabolitos da BZP e da TFMPP. Por outro lado, também não conseguimos obter resultados satisfatórios para a linearidade e a sensibilidade da quantificação da BZP e da TFMPP. Assim, apesar de se ter conseguido obter alguns dados preliminares com esta metodologia é necessário ainda proceder à adaptação e validação do método, procurando ajustar os passos analíticos às drogas em estudo e aos seus metabolitos por forma a melhorar a capacidade analítica do estudo

6.3.2- Avaliação das interações metabólicas entre a BZP e TFMPP

Pela análise dos resultados preliminares obtidos com os sobrenadantes de hepatócitos primários de rato expostos à BZP e TFMPP isoladamente e em mistura, verificamos que a concentração de BZP detetada após a incubação com a mistura A, foi superior à concentração detetada nos sobrenadantes das células expostas à BZP individualmente. Este resultado pode ser explicado pelo facto da BZP e da TFMPP serem metabolizadas por enzimas comuns, nomeadamente enzimas do CYP450 como a CYP2D6, a CYP3A4 e a CYP1A2 (Lin et al. 2011; Maurer et al. 2004; Staack et al. 2002; Staack et al. 2004), podendo haver um processo de competição que torna o processo metabólico mais moroso e eventualmente menos extenso.

O facto da TFMPP não ter sido detetada nas amostras pode encontrar uma justificação na baixa sensibilidade do método, uma vez que as concentrações testadas são inferiores às concentrações da BZP. No entanto, é de salientar que as concentrações de TFMPP testadas estavam dentro da gama de linearidade do método e foram detetadas concentrações de padrão na curva de calibração inferiores às concentrações testadas (individualmente e na mistura). Por este motivo, acreditamos na hipótese de que o composto terá sido extensamente metabolizado durante o período de incubação, sendo impossível detetar as concentrações de TFMPP remanescentes uma vez que os valores já se encontram abaixo do limite de deteção do método. No entanto, tratando-se de um estudo muito preliminar, estas conclusões carecem de confirmação experimental, sendo necessário testar os sobrenadantes resultantes de incubações com concentrações mais elevadas de TFMPP isoladamente e em mistura. Uma vez que o método não permitiu a identificação de metabolitos (quer da BZP, quer da TFMPP), esta explicação carece de confirmação analítica. A hipótese colocada é plausível já que corrobora a bibliografia onde consta que a TFMPP é uma substância extensamente metabolizada e eliminada quase exclusivamente na forma de metabolitos (Arbo et al. 2012).

O ensaio efetuado para o presente estudo foi um ensaio piloto bastante preliminar e, entre os vários os motivos que contribuíram para que não se pudesse prosperar nesta investigação, destacam-se o tempo limitado para a obtenção dos resultados numa fase já tardia do estudo (posterior aos ensaios de citotoxicidade que forneceram os sobrenadantes para esta análise) e as dificuldades inerentes ao próprio equipamento de GC-MS que apresentou uma deficiência no perfil de fragmentação dos compostos, tendo praticamente impossibilitado a identificação dos metabolitos (para os quais não existia um padrão analítico da substância e que teriam que ser identificados com base no perfil de fragmentação). A metodologia adoptada também se revelou inadequada para quantificação da BZP e TFMPP, pelo que se sugere o desenvolvimento de um método mais adequado a esta análise para poder prosseguir este estudo que revelou alguns resultados preliminares promissores.

6.4- Estudos futuros

A presente dissertação resultou de um trabalho laboratorial com a duração de um ano letivo tendo cumprido praticamente todos os objetivos inicialmente propostos, com exceção do estudo metabólico que forneceu apenas alguns resultados preliminares, mas promissores, no que diz respeito à avaliação das interações metabólicas. Assim, propõe-se a sua continuação, bem como o desenvolvimento de um método mais adequado para estas substâncias e os respetivos metabolitos.

Relativamente à citotoxicidade, são também necessários estudos posteriores para averiguar outros possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos observados das drogas, individualmente e em mistura, como por exemplo o estudo do modo de morte celular (apoptose ou necrose) e outros sinais de stress como a quantificação do cálcio intracelular. Seria de igual modo interessante avaliar o perfil de citotoxicidade de cada um dos metabolitos das drogas, comparar o perfil de citotoxicidade a 37°C e em condições de hipertermia (cenários habituais de consumo) e comparar os dados obtidos com modelos de estudo *in vitro* com sistemas mais complexos, incluindo modelos experimentais *in vivo*.

7- CONCLUSÃO

Há mais de 7 décadas que a toxicidade das piperazinas tem vindo a ser estudada, inicialmente pela indústria farmacêutica para poderem ser utilizadas como fármacos e, mais recentemente, devido ao seu uso abusivo dadas as suas propriedades psicoativas. As piperazinas mais comumente consumidas são a BZP e a TFMPP, quer individualmente, quer em mistura de forma a mimetizar a ação da MDMA.

Neste estudo foi efetuada uma avaliação da citotoxicidade da BZP e da TFMPP individualmente e em três misturas distintas, de forma a permitir implementar metodologia que consiga prever a toxicidade que possa ocorrer com estas combinações de drogas. Foi também efetuado um estudo metabólico para correlacionar as diferenças de toxicidade das substâncias individualmente e em mistura com possíveis interações metabólicas. Assim, o trabalho experimental realizado para elaborar a presente dissertação permitiu, nos modelos testados, concluir que:

- a TFMPP é mais tóxica que a BZP, em hepatócitos primários de rato e em células HepaRG humanas imortalizadas;
- a BZP e a TFMPP atuam de forma aditiva quando presentes em misturas, nas células HepaRG e apresentam um ligeiro antagonismo nos hepatócitos primários de rato;
- o modelo AC é o modelo que prevê de forma mais fidedigna a toxicidade das misturas de BZP e TFMPP, não a subestimando (o que acontece com o modelo AI);
- a BZP e a TFMPP, quando combinadas em concentrações que individualmente não provocam toxicidade revelam-se citotóxicas;
- a avaliação dos mecanismos de citotoxicidade provocada quer pela exposição aos compostos individualmente, quer à mistura, revelou um aumento na produção de ROS e NOS, e diminuição nos níveis de GSH, ATP e potencial de membrana mitocondrial;
- os mecanismos de ação avaliados revelaram-se mais exacerbados na BZP comparativamente à TFMPP;
- no estudo metabólico verificou-se que a BZP é mais extensamente metabolizada quando é administrada individualmente do que em combinação com a TFMPP, embora o estudo tenha sido muito preliminar.
- o método selecionado para avaliação do metabolismo revelou-se inadequado, não tendo sido possível identificar metabolitos.

Apesar de não ser possível mimetizar exatamente as misturas a que realmente os consumidores estão expostos, devido à enorme variabilidade na quantidade e no tipo de substâncias que podem ser ingeridas em simultâneo, o nosso estudo permitiu prever um potencial aumento da toxicidade destas drogas quando consumidas em associação. Para além disso, se foi observado um aumento da hepatotoxicidade *in vitro* com estas

misturas relativamente simples, é de esperar que em outras misturas mais complexas e potentes que se verificam em cenários reais de consumo, se preveja um maior risco de ocorrência de toxicidade.

Em suma, os efeitos aditivos da BZP e da TFMPP que frequentemente são ingeridas em conjunto para mimetizar a ação estimulante da MDMA aumentam o risco associado ao co-consumo destas substâncias, uma vez que podem ser provocados efeitos prejudiciais mesmo quando as drogas são misturadas em baixas concentrações que individualmente não produziriam qualquer efeito citotóxico. Este tipo de interação deverá ser tido em consideração na interpretação de cenários de intoxicação, ao nível clínico e forense. Por outro lado, estes resultados que vêm ao encontro de estudos semelhantes já realizados com drogas estimulantes do tipo das anfetaminas, vem reforçar a urgência em alertar os consumidores deste tipo de drogas para o risco acrescido do consumo destas drogas em associação.

8-BLIOGRAFIA

- Aitchison LK, Hughes RN (2006) Treatment of adolescent rats with 1-benzylpiperazine: a preliminary study of subsequent behavioral effects. *Neurotoxicology and teratology* 28(4):453-8
- Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology* 113:548-55
- Andersson TB (2010) The application of HepRG cells in evaluation of cytochrome P450 induction properties of drug compounds. *Methods in molecular biology* 640:375-87
- Andersson TB, Kanebratt KP, Kenna JG (2012) The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 8(7):909-20
- Aninat C, Piton A, Glaise D, et al. (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34(1):75-83
- Antherieu S, Chesne C, Li R, et al. (2010) Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38(3):516-25
- Antia U, Lee HS, Kydd RR, et al. (2009a) Pharmacokinetics of 'party pill' drug N-benzylpiperazine (BZP) in healthy human participants. *Forensic science international* 186(1-3):63-7
- Antia U, Tingle MD, Russell BR (2009b) In vivo interactions between BZP and TFMPP (party pill drugs). *The New Zealand medical journal* 122(1303):29-38
- Antia U, Tingle MD, Russell BR (2009c) Metabolic interactions with piperazine-based 'party pill' drugs. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 61(7):877-82
- Antia U, Tingle MD, Russell BR (2009d) 'Party pill' drugs--BZP and TFMPP. *The New Zealand medical journal* 122(1307):55-68
- Antia U, Tingle MD, Russell BR (2010) Validation of an LC-MS method for the detection and quantification of BZP and TFMPP and their hydroxylated metabolites in human plasma and its application to the pharmacokinetic study of TFMPP in humans. *Journal of forensic sciences* 55(5):1311-8
- Arbo MD, Bastos ML, Carmo HF (2012) Piperazine compounds as drugs of abuse. *Drug and alcohol dependence* 122 (3):174-85
- Arbo MD, Silva R, Barbosa DJ, et al. (2014) Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicology letters* 229(1):178-89
- Asha S, Vidyavathi M (2010) Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review. *Applied biochemistry and biotechnology* 160(6):1699-722
- Auerbach SB, Kamalakannan N, Rutter JJ (1990) TFMPP and RU24969 enhance serotonin release from rat hippocampus. *European journal of pharmacology* 190(1-2):51-7

- Auerbach SB, Rutter JJ, Juliano PJ (1991) Substituted piperazine and indole compounds increase extracellular serotonin in rat diencephalon as determined by in vivo microdialysis. *Neuropharmacology* 30(4):307-11
- Austin H, Monasterio E (2004) Acute psychosis following ingestion of 'Rapture'. *Australasian psychiatry: bulletin of Royal Australian and New Zealand College of Psychiatrists* 12(4):406-8
- Backhaus T, Altenburguer, R., Boedeker, et al. (2000a) Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(9):2348-2356
- Backhaus T, Scholze M, Grimme LH (2000) The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic toxicology* 49(1-2):49-61
- Backhaus TA, Boedeker, W(2000) Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. . *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(9):2348-2356
- Balmelli C, Kupferschmidt H, Rentsch K, et al. (2001) [Fatal brain edema after ingestion of ecstasy and benzylpiperazine]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 126(28-29):809-11
- Barroso M, Costa S, Dias M, et al. (2010) Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1217(40):6274-80
- Baumann MH, Clark RD, Budzynski AG, et al. (2004) Effects of "Legal X" piperazine analogs on dopamine and serotonin release in rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1025:189-97
- Baumann MH, Clark RD, Budzynski AG, et al. (2005) N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or 'Ecstasy'). *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30(3):550-60
- Beaune P, Dansette PM, Mansuy D, et al. (1987) Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(2):551-5
- Berenbaum MC (1989) What is synergy? *Pharmacological reviews* 41(2):93-141
- Berger M (2003) Trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP): an entheogenic entactogen. Disponível em https://www.erowid.org/chemicals/tfmpp/tfmpp_article1.shtml. Acedido em 18-02-2014
- Berney-Meyer L, Putt T, Schollum J, et al. (2012) Nephrotoxicity of recreational party drugs. *Nephrology* 17(2):99-103
- Bishop SC, McCord BR, Gratz SR, et al. (2005) Simultaneous separation of different types of amphetamine and piperazine designer drugs by capillary electrophoresis with a chiral selector. *Journal of forensic sciences* 50(2):326-35

- Bliss C (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* 26:585-615
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, et al. (2000) Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology* 13(3):135-60
- Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, et al. (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and applied pharmacology* 189(3):233-46
- Burillo-Putze G. DB, Pazos JL, Mas PM, et al. (2011) [Emergen drugs (I): smart drugs]. In: Navarra AdSSd (ed). Navarra, p 263-274
- Butler RA, Sheridan JL (2007) Highs and lows: patterns of use, positive and negative effects of benzylpiperazine-containing party pills (BZP-party pills) amongst young people in New Zealand. *Harm reduction journal* 4:18
- Bye C, Munro-Faure AD, Peck AW, et al. (1973) A comparison of the effects of 1-benzylpiperazine and dexamphetamine on human performance tests. *European journal of clinical pharmacology* 6(3):163-9
- Caccia S (1990) 1-arylpiperazines as active metabolites of (4-substituted aryl-1-piperazinyl)alkyl heterocyclic drugs. *Acta Pharmacology Jugoslava* 40(3): 441-460
- Campbell H, Cline W, Evans M, et al. (1973) Comparison of the effects of dexamphetamine and 1-benzylpiperazine in former addicts. *European journal of clinical pharmacology* 6(3):170-6
- Castell JV, Jover R, Martinez-Jimenez CP, et al. (2006) Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2(2):183-212
- Cedergreen N, Christensen AM, Kamper A, et al. (2008) A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 27(7):1621-32
- Cerec V, Glaise D, Garnier D, et al. (2007) Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 45(4):957-67
- Chou K (2008) Distribution of BZP nad TFMPP [MSc thesis]. Auckland: University of Auckland
- Cioli V, Corradino C, Piccinelli D, et al. (1984) A comparative pharmacological study of trazodone, etoperidone and 1-(m-chlorophenyl)piperazine. *Pharmacological research communications* 16(1):85-100
- Cloez-Tayarani I, Harel-Dupas C, Fillion G (1992) Inhibition of [3H] gamma-aminobutyric acid release from guinea-pig hippocampal synaptosomes by serotonergic agents. *Fundamental & clinical pharmacology* 6(8-9):333-41
- Cohen BM, Butler R (2011) BZP-party pills: a review of research on benzylpiperazine as a recreational drug. *The International journal on drug policy* 22(2):95-101

- Conn PJ, Sanders-Bush E (1987) Relative efficacies of piperazines at the phosphoinositide hydrolysis-linked serotonergic (5-HT-2 and 5-HT-1c) receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 242(2):552-7
- Coroneos E, Gordon JW, Kelly SL, et al. (1991) Drug metabolising N-acetyltransferase activity in human cell lines. *Biochimica et biophysica acta* 1073(3):593-9
- Crime UNODC (2012) World Drug Report 2012. UNODC
- da Silva DG, de Pinho PG, Pontes H, et al. (2010) Gas chromatography-ion trap mass spectrometry method for the simultaneous measurement of MDMA (ecstasy) and its metabolites, MDA, HMA, and HMMA in plasma and urine. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 878(9-10):815-22
- Davies MT, Forrest J, Hartley F, et al. (1954) Piperazine adipate: a new anthelmintic agent. I. Physiochemical properties. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 6(10):707-10
- Davies S, Wood DM, Smith G, et al. (2010) Purchasing 'legal highs' on the Internet--is there consistency in what you get? *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 103(7):489-93
- de Boer D, Bosman IJ, Hidvegi E, et al. (2001) Piperazine-like compounds: a new group of designer drugs-of-abuse on the European market. *Forensic science international* 121(1-2):47-56
- de Sousa G, Florence N, Valles B, et al. (1995) Relationships between in vitro and in vivo biotransformation of drugs in humans and animals: pharmacotoxicological consequences. *Cell Biology and Toxicology* 11 (3-4): 147-153
- DEA. Drug Enforcement Administration (2002) BZP and TFMPP: chemicals used to mimic MDMA's effects. Office of Forensic Sciences Office of Forensic Sciences. Vol 35. p 123
- Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American journal of clinical nutrition* 53(1 Suppl):194S-200S
- Dias da Silva D, Carmo H, Lynch A, et al. (2013a) An insight into the hepatocellular death induced by amphetamines, individually and in combination: the involvement of necrosis and apoptosis. *Archives of toxicology* 87(12):2165-85
- Dias da Silva D, Carmo H, Silva E (2013b) The risky cocktail: what combination effects can we expect between ecstasy and other amphetamines? *Archives of toxicology* 87(1):111-22
- Dias da Silva D, Silva E, Carmo H (2013c) Cytotoxic effects of amphetamine mixtures in primary hepatocytes are severely aggravated under hyperthermic conditions. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 27(6):1670-8
- Dias da Silva D, Silva E, Carmo H (2014) Combination effects of amphetamines under hyperthermia - the role played by oxidative stress. *Journal of applied toxicology : JAT* 34(6):637-50

Donato MT, Castell JV (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clinical pharmacokinetics* 42(2):153-78

Donato MT, Lahoz A, Castell JV, et al. (2008) Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Current drug metabolism* 9(1):1-11

Drescher K, Boedeker, W (1995) Assessment of the combined effects of substances - the relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics* 51(2):716-635

Drugs (2004) New Zealand Expert Advisory Committee on Drugs advice to the Minister on: Benzylpiperazine (BZP). Disponível em <http://www.ndp.govt.nz/legalpartypills/documents/eacd-report-bzp-april2004.pdf>. Acedido em 23-02-2014

DUSDE (2002) Schedules of controlled substances; Temporary placement of benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine into Schedule I. Disponível em http://www.deadiversion.usdoj.gov/fed_regs/sched_actions/2002/fro9202.htm. Acedido em 14-02-2014

Elliot S, Caroline C. (2012) N-benzylpiperazine (BZP) Pre-Review Report. Disponível em http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/5.3aBZP_Pre-review.pdf, p 4-8. Acedido em 22-11-2013

Elliott S (2011) Current awareness of piperazines: pharmacology and toxicology. *Drug testing and analysis* 3(7-8):430-8

Elliott S, Smith C (2008) Investigation of the first deaths in the United Kingdom involving the detection and quantitation of the piperazines BZP and 3-TFMPP. *Journal of analytical toxicology* 32(2):172-7

EMCDDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2007) New commission proposal to strengthen control of synthetic drug BZP press release. Disponível em <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/07/1103&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>. Acedido em 12/11/2013.

EMCDDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2008) Council decision: "Appropriate controls' for BZP - new drug BZP to be placed under control across the EU (News Release No2/2008~). Lisbon

EMCDDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2009) Report on the risk assessment of BZP in the framework of the Council decision on new psychoactive substances. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities

Evans RM, Scholze M, Kortenkamp A (2012) Additive mixture effects of estrogenic chemicals in human cell-based assays can be influenced by inclusion of chemicals with differing effect profiles. *PloS one* 7(8):e43606

Ewald AH, Peters FT, Weise M, et al. (2005) Studies on the metabolism and toxicological detection of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA) in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 824(1-2):123-31

- Fantegrossi WE, Winger G, Woods JH, et al. (2005) Reinforcing and discriminative stimulus effects of 1-benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine in rhesus monkeys. *Drug and alcohol dependence* 77(2):161-8
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. (2003) Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic toxicology* 63(1):43-63
- FDA. Food and Drug Administration (2014). Disponível em <http://www.fda.gov>. Acedido em 13-02-2013
- Gastpar M, Gastpar G, Gilsdorf U (1985) Befuraline, its safety and efficacy in depressed inpatients. *Pharmacopsychiatry* 18(6):351-5
- Gee P, Fountain J (2007) Party on? BZP party pills in New Zealand. *The New Zealand medical journal* 120(1249):U2422
- Gee P, Gilbert M, Richardson S, et al. (2008) Toxicity from the recreational use of 1-benzylpiperazine. *Clinical toxicology* 46(9):802-7
- Gee P, Richardson S (2005) Researching the toxicity of party pills. *Nursing New Zealand* 11(11):12-3
- Gee P, Richardson S, Woltersdorf W, et al. (2005) Toxic effects of BZP-based herbal party pills in humans: a prospective study in Christchurch, New Zealand. *The New Zealand medical journal* 118(1227):U1784
- Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, et al. (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell biology and toxicology* 28(2):69-87
- Gibson G; Skett P (2001) Factors affecting drug metabolism: internal factors - In *Introduction to Drug Metabolism*. British Library 3.^a ed.
- Glennon RA, Pierson ME, McKenney JD (1988) Stimulus generalization of 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) to propranolol, pindolol, and mesulergine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 29(1):197-9
- Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT (2007) Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chemico-biological interactions* 168(1):30-50
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, et al. (2004) Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Current drug metabolism* 5(5):443-62
- GP- Governo de Portugal (2009) Diário da República. Lei n.º 18/2009, de 11 de Maio de 2009 (1) 1.^a Série
- Gripon P, Rumin S, Urban S, et al. (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(24):15655-60
- Grotewiel MS, Chu H, Sanders-Bush E (1994) m-chlorophenylpiperazine and m-trifluoromethylphenylpiperazine are partial agonists at cloned 5-HT_{2A} receptors

expressed in fibroblasts. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 271(2):1122-6

Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2010) General review on in vitro hepatocyte models and their applications. Methods in molecular biology 640:1-40

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, et al. (2007) The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. Chemico-biological interactions 168(1):66-73

Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C (2008) Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. Expert opinion on drug metabolism & toxicology 4(10):1279-94

Hamlyn AN, Morris JS, Sarkany I, et al. (1976) Piperazine hepatitis. Gastroenterology 70(6):1144-7

Hansten PD, Horn JR (1996) Drug Interactions Monographs. Applied Therapeutics Inc – Vancouver

Hemmersbach P, de la Torre R (1996) Stimulants, narcotics and beta-blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. Journal of chromatography B, Biomedical applications 687(1):221-38

Hengstler JG, Ringel M, Biefang K, et al. (2000) Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. Chemico-biological interactions 125(1):51-73

Herndon JL, Pierson ME, Glennon RA (1992) Mechanistic investigation of the stimulus properties of 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine. Pharmacology, biochemistry, and behavior 43(3):739-48

IFLA Research (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, D.C.

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (2009). Resume das Características do Medicamento Arava ®. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=26143&dc=&nome_comer=YXJhdmE=&dosagem=&cnpem=&chnm=&forma_farmac=&atc=&disp=&estado_aim=&pesquisa_titular=&cft=&grupo_produto=&pagina=1. Acedido em 22-04-2014

Iversen L, White M, Treble R (2014) Designer psychostimulants: Pharmacology and differences. Neuropharmacology

Jan RK, Lin JC, Lee H, et al. (2010) Determining the subjective effects of TFMPP in human males. Psychopharmacology 211(3):347-53

Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia 154(2):103-16

Kanebratt KP, Andersson TB (2008a) Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 36(7):1444-52

- Kanebratt KP, Andersson TB (2008b) HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36(1):137-45
- Katagi M, Miki A, Nakajima K, et al. (2003) Analyses of clandestine tablets of amphetamines and their related designer drugs encountered in recent Japan. *Journal of Forensic Toxicology* 20:303-319
- Katzung BG (2007) *Basic and Clinical Pharmacology*, 10th ed. Mc Graw-Hill Companies, New York
- Kerr J, Davis LS (2011) Benzylpiperazine in New Zealand: brief history and current implications. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 41(1):155-164
- King KA, Holtman JR, Jr. (1990) Characterization of the effects of activation of ventral medullary serotonin receptor subtypes on cardiovascular activity and respiratory motor outflow to the diaphragm and larynx. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 252(2):665-74
- Klaassen C (2008) *Cassarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill Companies 7th Ed
- Koley D, Bard AJ (2010) Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(39):16783-7
- Kretzschmar M, Pfeifer U, Machnik G, et al. (1992) Glutathione homeostasis and turnover in the totally hepatectomized rat: evidence for a high glutathione export capacity of extrahepatic tissues. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 44(5):273-81
- Lee H, Kydd RR, Lim VK, et al. (2011) Effects of trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP) on interhemispheric communication. *Psychopharmacology* 213(4):707-14
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, et al. (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *The Biochemical journal* 314 (Pt 2):433-7
- Leist M, Single B, Castoldi AF, et al. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of experimental medicine* 185(8):1481-6
- Leri F, Bruneau J, Stewart J (2003) Understanding polydrug use: review of heroin and cocaine co-use. *Addiction* 98(1):7-22
- Li AP, Maurel P, Gomez-Lechon MJ, et al. (1997) Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chemico-biological interactions* 107(1-2):5-16
- Lin JC, Bangs N, Lee H, et al. (2009) Determining the subjective and physiological effects of BZP on human females. *Psychopharmacology* 207(3):439-46
- Lin JC, Jan RK, Kydd RR, et al. (2011) Subjective effects in humans following administration of party pill drugs BZP and TFMPP alone and in combination. *Drug testing and analysis* 3(9):582-5

- Loewe L, Muchnik H (1926) Effect of combinations: mathematical basis of the problem. *Archiv fur Experimentalle Pathologie und Pharmakologie* 114:313-326
- Louis KS, Siegel AC (2011) Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in molecular biology* 740:7-12
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193(1):265-75
- Lübberstedt M, Muller-Vieira U, Mayer M. et al. (2011) HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 63:59-68
- Lucki I, Frazer A (1989) Effect of 1-(m-chlorophenyl)piperazine and 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazine on locomotor activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 249(1):155-164
- Lyon RA, Titeler M, McKenney JD, et al. (1986) Synthesis and evaluation of phenyl- and benzoylpiperazines as potential serotonergic agents. *Journal of medicinal chemistry* 29(5):630-4
- Magyar K (1987) Pharmacokinetic aspects of the mode of action of EGYT-475, a new antidepressant agent. *Polish journal of pharmacology and pharmacy* 39(2):107-12
- Malarkey D, Johnson K, Ryan L et al. (2005) New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic Pathology* 33:27-34
- Maldonado AL (1998) *Drogas de abuso. Medicina legal y toxicología*. 5^a edition, Barcelona
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* 424(1-2):83-95
- Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T (2000) Gas chromatographic-mass spectrometric procedures for determination of the catechol-O-methyltransferase (COMT) activity and for detection of unstable catecholic metabolites in human and rat liver preparations after COMT catalyzed in statu nascendi derivatization using S-adenosylmethionine. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 739(2):325-35
- Maurer HH, Kraemer T, Springer D, et al. (2004) Chemistry, pharmacology, toxicology, and hepatic metabolism of designer drugs of the amphetamine (ecstasy), piperazine, and pyrrolidinophenone types: a synopsis. *Therapeutic drug monitoring* 26(2):127-31
- Mayol RF, Cole CA, Colson KE, et al. (1994) Isolation and identification of the major urinary metabolite of m-chlorophenylpiperazine in the rat. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 22(1):171-4
- McCarty LS, Borgert CJ (2006) Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 45(2):119-43
- McNabb CB, Russell BR, Caprioli D, et al. (2012) Single chemical entity legal highs: assessing the risk for long term harm. *Current drug abuse reviews* 5(4):304-19

- Meririnne E, Kajos M, Kankaanpää A, et al. (2006) Rewarding properties of 1-benzylpiperazine, a new drug of abuse, in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 98(4):346-50
- Miranda F, Orozco G, Velazquez-Martinez DN (2002) Full substitution of the discriminative cue of a 5-HT(1A/1B/2C) agonist with the combined administration of a 5-HT(1B/2C) and a 5-HT(1A) agonist. *Behavioural pharmacology* 13(4):303-11
- Mohamed WM, Ben Hamida S, Cassel JC, et al. (2011) MDMA: interactions with other psychoactive drugs. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 99(4):759-74
- Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S (1978) Isolation and use of liver cells. *Methods in enzymology* 52:60-71
- Monteiro M (2012) Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for simultaneous quantification of benzylpiperazine and its metabolites: Application to a pilot toxicokinetic study in mice [MSc thesis]. Faculty of Pharmacy, University of Porto
- Monteiro MS, Bastos Mde L, Guedes de Pinho P, et al. (2013) Update on 1-benzylpiperazine (BZP) party pills. *Archives of toxicology* 87(6):929-47
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65(1-2):55-63
- Murphy M, Antia U, Chang HY, et al. (2009) Party pills and drug-drug interactions. *The New Zealand medical journal* 122(1293):3564
- Navarro VJ, Senior JR (2006) Drug-related hepatotoxicity. *The New England journal of medicine* 354(7):731-9
- Nicholson TC (2006) Prevalence of use, epidemiology and toxicity of 'herbal party pills' among those presenting to the emergency department. *Emergency medicine Australasia : EMA* 18(2):180-4
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology letters* 102-103:139-42
- Nikolova I, Danchev N. (2008) Piperazine based substances of abuse: A new party pills' on Bulgarian drug market. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 22(2):652-655
- O'Neil MJ, Koch CB, Roman KJ (2006) *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 14th ed. Whitehouse Station: Merck & Co., Inc.
- Orata F (2012) Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* 87(1):315-424
- Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, et al. (2000) Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environmental Health Perspect* 108(10):983-7

- Peck Y, Wang DA (2013) Three-dimensionally engineered biomimetic tissue models for in vitro drug evaluation: delivery, efficacy and toxicity. *Expert opinion on drug delivery* 10(3):369-83
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, et al. (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of toxicology* 82(10):667-715
- Pessayre D, Berson A, Fromenty B, et al. (2001) Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in liver disease* 21(1):57-69
- Pettibone DJ, Williams M (1984) Serotonin-releasing effects of substituted piperazines in vitro. *Biochemical pharmacology* 33(9):1531-5
- Plackett RL, Hewlett PS (1948) Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides; the toxicity of a mixture of poisons. *The Annals of applied biology* 35(3):347-58
- Powers SK, Lennon SL (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *The Proceedings of the Nutrition Society* 58(4):1025-33
- Rajapakse N, Kortenkamp A (2002) Combining xenoestrogens at levels below individual No-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspect* 110(9):917-921
- Rang H, Ritter JM, Flower RJ (2008) *Pharmacology*, Churchill Livingstone 6^a Edição
- Rao KM, Padmanabhan J, Kilby DL, et al. (1992) Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *Journal of leukocyte biology* 51(5):496-500
- Reed JC (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends in molecular medicine* 7(7):314-9
- Robertson DW, Bloomquist W, Wong DT, et al. (1992) mCPP but not TFMPP is an antagonist at cardiac 5HT₃ receptors. *Life sciences* 50(8):599-605
- Robin MA, Le Roy M, Descatoire V, et al. (1997) Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *Journal of hepatology* 26(1):23-30
- Rodgers RJ, Cole JC, Cobain MR, et al. (1992) Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behavioural pharmacology* 3(6):621-634
- Rossato LG, Costa VM, de Pinho PG, et al. (2011) Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat-isolated cardiomyocytes. *Archives of toxicology* 85(8):929-39
- Sahi J, Grepper S, Smith C (2010) Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport and safety evaluations in drug discovery. *Current drug discovery technologies* 7(3):188-98
- Sassa S, Sugita O, Galbraith RA, et al. (1987) Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochemical and biophysical research communications* 143(1):52-7

- Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal* 76(1 Pt 1):469-77
- Schechter MD (1988) Use of TFMPP stimulus properties as a model of 5-HT_{1B} receptor activation. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 31(1):53-7
- Schep LJ, Slaughter RJ, Vale JA, et al. (2011) The clinical toxicology of the designer "party pills" benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine. *Clinical toxicology* 49(3):131-41
- Schoeffter P, Hoyer D (1989) Interaction of arylpiperazines with 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C} and 5-HT_{1D} receptors: do discriminatory 5-HT_{1B} receptor ligands exist? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 339(6):675-83
- Scholze M, Boedeker W, Faust M, et al. (2001) A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 20(2):448-57
- Segura J, Ventura R, Jurado C (1998) Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 713(1):61-90
- Sheridan J, Butler R (2010) "They're legal so they're safe, right?" What did the legal status of BZP-party pills mean to young people in New Zealand? *The International journal on drug policy* 21(1):77-81
- Sheridan J, Butler R, Wilkins C, et al. (2007) Legal piperazine-containing party pills--a new trend in substance misuse. *Drug and alcohol review* 26(3):335-43
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002) Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental science & technology* 36(8):1751-6
- Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, et al. (2013) Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *British journal of pharmacology* 168(2):458-70
- Simmler LD, Rickli A, Schramm Y, et al. (2014) Pharmacological profiles of aminoindanes, piperazines, and pipradrol derivatives. *Biochemical pharmacology* 88(2):237-44
- Smith JA, Weidemann MJ (1993) Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 162(2):261-8
- Smith JC, Kacker A, Anand VK (2002) Midline nasal and hard palate destruction in cocaine abusers and cocaine's role in rhinologic practice. *Ear, nose, & throat journal* 81(3):172-7
- Staack RF (2007) Piperazine designer drugs of abuse. *Lancet* 369(9571):1411-3
- Staack RF, Fritschi G, Maurer HH (2002) Studies on the metabolism and toxicological detection of the new designer drug N-benzylpiperazine in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 773(1):35-46

- Staack RF, Fritschi G, Maurer HH (2003) New designer drug 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP): gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry studies on its phase I and II metabolism and on its toxicological detection in rat urine. *Journal of mass spectrometry* : JMS 38(9):971-81
- Staack RF, Maurer HH (2003) Piperazine-derived designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP): GC-MS studies on its metabolism and its toxicological detection in rat urine including analytical differentiation from its precursor drugs trazodone and nefazodone. *Journal of analytical toxicology* 27(8):560-8
- Staack RF, Maurer HH (2005) Metabolism of designer drugs of abuse. *Current drug metabolism* 6(3):259-74
- Staack RF, Paul LD, Springer D, et al. (2004) Cytochrome P450 dependent metabolism of the new designer drug 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP). In vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats as well as in vitro studies in human liver microsomes. *Biochemical pharmacology* 67(2):235-44
- Steinberg P, Fischer T, Kiulies S, et al. (1999) Drug metabolizing capacity of cryopreserved human, rat, and mouse liver parenchymal cells in suspension. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 27(12):1415-22
- Tekes K, Tothfalusi L, Malomvolgyi B, et al. (1987) Studies on the biochemical mode of action of EGYT-475, a new antidepressant. *Polish journal of pharmacology and pharmacy* 39(2):203-11
- Thompson I, Aldington S, Williams M, et al. (2006) Report for the Ministry of Health: The benzylpiperazine (BZP)/trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP) and alcohol safety study. Wellington, New Zealand
- Thompson I, Williams G, Aldington S, et al (2006a) The benzylpiperazine (BZP)/trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP) and alcohol safety study. Medical Research Institute of New Zealand, Wellington
- Thompson I, Williams G, Caldwell B, et al. (2010) Randomised double-blind, placebo-controlled trial of the effects of the 'party pills' BZP/TFMPP alone and in combination with alcohol. *Journal of psychopharmacology* 24(9):1299-308
- Timbrell J. (2002) *Principles of Biochemical Toxicology*. Informa Healthcare U.S.A. Inc. 4ª Edição.
- Tsutsumi H, Katagi M, Miki A, et al. (2005) Development of simultaneous gas chromatography-mass spectrometric and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination method for the new designer drugs, N-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) and their main metabolites in urine. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 819(2):315-22
- Tsutsumi H, Katagi M, Miki A, et al. (2006) Metabolism and the urinary excretion profile of the recently scheduled designer drug N-Benzylpiperazine (BZP) in the rat. *Journal of analytical toxicology* 30(1):38-43
- Vorce SP, Holler JM, Levine B, et al. (2008) Detection of 1-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine in urine analysis specimens using GC-MS and LC-ESI-MS. *Journal of analytical toxicology* 32(6):444-50

- Wada M, Yamahara K, Ikeda R, et al. (2012) Simultaneous determination of N-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine in rat plasma by HPLC-fluorescence detection and its application to monitoring of these drugs. *Biomedical chromatography : BMC* 26(1):21-5
- WADA. World Anti-Doping Agency (2006) The World anti-doping code - the 2007 Prohibited List International Standard. World Anti-Doping Agency. Disponível em http://www.dis-sportschiedsgericht.de/Material/DLV/IAAF/IAAF_Prohibited_List_2007.pdf. Acedido em 13-02-2014.
- Walsky RL, Boldt SE (2008) In vitro cytochrome P450 inhibition and induction. *Current drug metabolism* 9(9):928-39
- WHO, World Health Organization (2013) The global burden. Disponível em http://www.who.int/substance_abuse/facts/global_burden/en/, acedido em 12/10/2013
- Wikstrom M, Holmgren P, Ahlner J (2004) A2 (N-benzylpiperazine) a new drug of abuse in Sweden. *Journal of analytical toxicology* 28(1):67-70
- Wilkins C, Girling M., Sweetsur P., et al. (2006) Legal party pill use in New Zealand: Prevalence of use, availability, health harms and 'gateway effects' of benzylpiperazine (BZP) and trifluoromethylbenzylpiperazine (TFMPP). Auckland: Center for Social and Health Outcomes Research and Evaluation (SHORE)
- Wilkins C, Sweetsur P (2010) Differences in harm from legal BZP/TFMPP party pills between North Island and South Island users in New Zealand: a case of effective industry self-regulation? *The International journal on drug policy* 21(1):86-90
- Wilkins C, Sweetsur P, Girling M (2008) Patterns of benzylpiperazine/trifluoromethylphenylpiperazine party pill use and adverse effects in a population sample in New Zealand. *Drug and alcohol review* 27(6):633-9
- Wood DM, Button J, Lidder S, et al. (2008) Dissociative and sympathomimetic toxicity associated with recreational use of 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP) and 1-benzylpiperazine (BZP). *Journal of medical toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology* 4(4):254-7
- Wood DM, Dargan PI, Button J, et al. (2007) Collapse, reported seizure-and an unexpected pill. *Lancet* 369(9571):1490
- Yarosh HL, Katz EB, Coop A, et al. (2007) MDMA-like behavioral effects of N-substituted piperazines in the mouse. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 88(1):18-27
- Yeap CW, Bian CK, Abdullah AFL (2010) A review on benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine: origins, effects, prevalence and legal status. *Health and the Environment Journal* 2:38-50
- Zawilska JB (2011) "Legal highs" - new players in the old drama. *Current drug abuse reviews* 4(2):122-30
- Zhang YH, Liu SS, Liu HL, et al. (2010) Evaluation of the combined toxicity of 15 pesticides by uniform design. *Pest management science* 66(8):879-87

Zukiewicz-Sobczak W, Zwolinski J, Chmielewska-Badora J, et al. (2012) Analysis of psychoactive and intoxicating substances in legal highs. *Annals of agricultural and environmental medicine*: AAEM 19(2):309-14