

Luciana Branco Fernandes

**MDPV (3,4-Metilenodioxipirovalerona), nova droga psicoativa:  
análise de parâmetros comportamentais e neurotóxicos e de recetores  
de produtos de glicação avançada (RAGE) em murganhos**

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Luciana Fernandes

**MDPV (3,4-METILENODIOXIPIROVALERONA),  
NOVA DROGA PSICOATIVA: ANÁLISE DE  
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E  
NEUROTÓXICOS E DE RECETORES DE  
PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE)  
EM MURGANHOS**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal**

Orientador: Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro

Co-orientador: Professor Doutor Frederico Pereira

**Setembro de 2017**

**Universidade de Coimbra**



## **Agradecimentos**

Primeiramente, dirijo os meus agradecimentos ao Professor Doutor Carlos Ribeiro pela amabilidade e disponibilidade de me receber, ouvir os meus interesses, tendo criado a oportunidade de eu desenvolver a minha dissertação no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Ao Professor Doutor Frederico Pereira, devo o desenrolar de um ano preenchido de novas aprendizagens e desafios, na consecução deste emocionante projeto. Destaco principalmente o seu entusiasmo, boa disposição e motivação nas nossas reuniões, mas, sobretudo, o sentido crítico que me incutiu com o seu rigor e tendência em questionar tudo. Agradeço igualmente, a sua disponibilidade e paciência em desembaraçar as minhas dúvidas existenciais. Obrigada pela sua orientação!

Urge aqui salientar o incondicional apoio da Doutora Sofia Viana, que se traduziu num acompanhamento de grande profissionalismo, bem como numa vertente humana ímpar. A transmissão passiva de conhecimentos e dicas valiosas, a compreensão e paciência nas minhas falhas, fez com que o envolvimento, o entusiasmo e a curiosidade estivessem sempre presentes ao longo deste ano, ajudando a definir a pequena cientista que existe em mim. O seu espírito contagiante consegue tornar as mais longas sessões de microscópio em algo incrivelmente interessante. Sem dúvida que, a orientação para o caminho certo nas horas de angústias e hesitações, a ela o devo.

À Inês Pita, agradeço todo o apoio nos primeiros passos deste projeto bem como a disponibilidade em esclarecer qualquer dúvida. Aos colegas do piso, Sara, Ricardo e Vanessa por estarem sempre disponíveis a auxiliar em qualquer dificuldade laboratorial.

Este ano também me presenteou com novos laços enriquecedores e únicos, cada um à sua maneira. Às amigas do laboratório, Mafalda, Johanna, Teresa e Di, devo a força acrescida presente nas encorajadoras risadas e nas horas de almoço. Obrigada pelas conversas

motivacionais e terapêuticas durante as tardes de “estudo”, pelo apoio, carinho e pela troca de ideias no sentido de ajuda mútua. Não são de sempre, mas serão para sempre!

Às amizades de longa data, agradeço tudo aquilo que me dão de vocês. As palavras de carinho, ternura, confiança e apoio; os desabafos das paranoias e das alegrias; as memórias que construímos cada vez que estamos juntas. Diferentes partes de mim são preenchidas por cada uma de vós, talvez, por isso, me sinta a maior sortuda de vos ter como melhores amigas. Simplesmente obrigada, Maria, Sofia e Inês.

Todas as fontes de apoio foram determinantes para ultrapassar este ano, contudo, os maiores agradecimentos são dirigidos àqueles que me deram oportunidade de alcançar esta pequena conquista - a minha Família.

À minha Mãe e ao meu Pai, por me proporcionarem esta longa caminhada, independentemente do esforço associado; por todos os abraços, todas as festinhas e as palavras nas alturas certas; por serem a minha fonte de motivação e inspiração ao acreditarem sempre em mim. Não há retribuição ou palavras ao nível daquilo que fizeram e fazem por mim. Aos meus irmãos, que só me moem o juízo, mas que alimentaram constantemente em mim a vontade de ir a casa e de nada fazer. À minha Avó Lena, por todo o amor, carinho e preocupação traduzidos em mil e uma ações que tornaram esta caminhada absolutamente mais acessível.

Ao Alex, por fazer de tudo, todos os dias, para me fazer feliz; pelo apoio incondicional a nível emocional e culinário nos momentos mais desafiantes do último ano; por tudo o que somos. Não imagino como teria sido sem ti.

# Índice

Abreviaturas.....	III
Resumo .....	VII
Abstract.....	IX
<i>Capítulo I</i> .....	1
1 Introdução.....	3
1.1 <i>Psicoestimulantes</i> .....	4
1.1.1 Metanfetamina (META) .....	9
1.1.2 Catinonas Sintéticas e <i>Bath Salts</i> .....	13
1.1.3 3, 4-Metilenodioxipirovalerona (MDPV).....	16
1.2 <i>O cérebro e a perturbação pela utilização de substâncias</i> .....	23
1.2.1 Estriado, controlo motor, comportamento, emoções, DA e drogas psicoestimulantes .....	24
1.3 <i>Sistema Imunitário Inato</i> .....	29
1.3.1 Componentes celulares e moleculares da Imunidade Inata .....	30
1.3.2 Reconhecimento de patógenos pelo SI Inato .....	31
1.3.3 Recetores dos produtos de glicação avançada (RAGE) .....	33
1.3.4 Neuroinflamação e Psicoestimulantes .....	38
1.4 <i>Objetivos</i> .....	43
<i>Capítulo II</i> .....	45
2 Materiais e Métodos.....	47
2.1 <i>Modelo Animal e Fármacos</i> .....	48
2.2 <i>Planeamento experimental</i> .....	49
2.3 <i>Testes Comportamentais</i> .....	51
2.3.1 <i>Splash test</i> (ST).....	51
2.3.2 <i>Tail suspension</i> (TS).....	52
2.3.3 <i>Elevated Plus Maze</i> (EPM) .....	52
2.3.4 <i>Open Field</i> (OF) .....	54
2.4 <i>Ensaio Biológicos</i> .....	55
2.4.1 Western Blot .....	55
2.4.2 Imunohistoquímica – Free-Floating.....	58
2.4.3 Expressão Genética por RT-qPCR.....	60

2.5	<i>Análise Estatística</i> .....	63
	<i>Capítulo III</i> .....	65
3	Resultados.....	67
	3.1 <i>Análise comportamental em murganhos expostos a META e a MDPV: efeitos locomotores e emocionais</i> .....	68
	3.1.1 Alterações comportamentais nos murganhos registadas durante e imediatamente após as administrações das toxinas .....	68
	3.1.2 Efeitos da META e da MDPV no comportamento tipo ansioso e depressivo em murganhos.....	69
	3.1.3 Efeitos da META e da MDPV na atividade locomotora e exploratória em murganhos .....	71
	3.2 <i>Efeitos da META e da MDPV em marcadores de neurotoxicidade estriatal – TH, mielina e gliose – em murganhos</i> .....	73
	3.3 <i>Efeitos da META e da MDPV no eixo S100<math>\beta</math>-RAGE em estriado de murganho</i> .....	79
	<i>Capítulo IV</i> .....	83
4	Discussão.....	85
	<i>Capítulo V</i> .....	93
5	Conclusão .....	95
	Referências.....	97

## Abreviaturas

<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>AGE</b>	<i>Advanced glycation end-product</i>
<b>AP</b>	<i>Alkaline phosphatase</i>
<b>ATS</b>	<i>Amphetamine-type stimulant</i>
<b>BHE</b>	Barreira hematoencefálica
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CTR</b>	Controlo
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAMP</b>	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>dnRAGE</b>	Isoforma <i>dominant-negative</i> (sem a terminação C) do RAGE
<b>EPM</b>	<i>Elevated Plus Maze</i>
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GFAP</b>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<b>GP</b>	Globo Pálido
<b>GPe</b>	Globo Pálido externo
<b>GPI</b>	Globo Pálido interno
<b>Ip.</b>	Intraperitoniais
<b>Iba-1</b>	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemistry</i>
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos

<b>MBP</b>	<i>Myelin basic protein</i>
<b>MDMD</b>	Metilendioximetanfetamina
<b>MDPV</b>	3, 4-Metilendioxipirovalerona
<b>META</b>	Metanfetamina
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MSN</b>	<i>Medium-sized spiny neurons</i>
<b>NAc</b>	Núcleo Accumbens
<b>NET</b>	Transportador de noradrenalina
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NPS</b>	<i>New psychoactive substance</i>
<b>ntRAGE</b>	Isoforma <i>N-truncated</i> (sem a terminação N) do RAGE
<b>OF</b>	<i>Open Field</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>RAGE</b>	Recetor de produtos de glicação avançada
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogénio
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>RT-qPCR</b>	<i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i>
<b>SERT</b>	Transportador de serotonina
<b>SI</b>	Sistema Imunitário
<b>SN</b>	Substância negra
<b>SNe</b>	Substância negra compacta
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNr</b>	Substância negra reticulada
<b>sRAGE</b>	Isoforma solúvel do RAGE
<b>ST</b>	<i>Splash test</i>

<b>STN</b>	Núcleo subtalâmico
<b>TH</b>	Tirosina Hidroxilase
<b>TLR</b>	Recetor <i>Toll-like</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TS</b>	<i>Tail suspension</i>
<b>VIH</b>	Vírus da imunodeficiência adquirida
<b>VMAT</b>	Transportador vesicular de monoaminas
<b>VTA</b>	Área ventro-tegmental
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>



## Resumo

Durante os últimos anos, temos assistido a uma mudança radical no paradigma de consumo de drogas, com o aparecimento de novas substâncias psicoativas. As catinonas sintéticas são um dos grupos de substâncias mais popularizados, com 3, 4-Metilenodioxipirovalerona (MDPV) a destacar-se como o principal ingrediente dos tão conhecidos *Bath salts*. Esta molécula é um poderoso estimulante do sistema nervoso central (SNC) e é conhecido por mimetizar os efeitos de substâncias ilegais, como a cocaína ou a metanfetamina (META). Considerando a gravidade dos seus efeitos em vários órgãos (incluindo o cérebro), o MDPV já despertou alerta internacional.

O abuso de psicoestimulantes tem sido associado a problemas neurocognitivos, psiquiátricos e fisiológicos. A META é uma toxina dopaminérgica, envolvida na ativação da microglia e dos astrócitos que acompanham a neurotoxicidade que promove em determinadas regiões do SNC. Estas alterações contribuem para as disfunções motoras e psiquiátricas inerentes ao seu abuso. De igual forma, o MDPV também exibe uma elevada afinidade para o sistema dopaminérgico, mas nada se sabe quanto aos seus efeitos ao nível da função motora e dos mecanismos de neurotoxicidade. Assim, o nosso objetivo foi comparar as propriedades comportamentais e neurotóxicas estriatais do MDPV e da META, despoletadas numa fase inicial da sua administração. Para tal, utilizou-se um regime neurotóxico ( $4 \times 10\text{mg/Kg}$ ) e avaliaram-se os efeitos das toxinas nas terminações nervosas dopaminérgicas e na ativação glial, explorando ainda o seu possível impacto nos recetores dos produtos de glicação avançada (RAGE) do sistema imune inato.

É importante realçar que os nossos resultados revelaram, pela primeira vez, que o MDPV não é tão neurotóxico como a META, no período inicial de 24 horas. Ao contrário da META, o MDPV não causou disfunção motora nos testes comportamentais e não alterou os teores totais da tirosina hidroxilase nem provocou a ativação das células gliais. No entanto, é interessante constatar que a MDPV aumentou o comportamento exploratório dos murganhos. Adicionalmente, nenhuma das drogas alterou a expressão e os níveis proteicos do RAGE e do seu ligando, S100 $\beta$ . Finalmente, nenhuma das drogas pareceu afetar a integridade da mielina no estriado.

Este estudo comparativo é inovador e permitiu esclarecer os efeitos comportamentais e neurotóxicos iniciais associados a uma administração em *binging* de MDPV. Apesar de se ter

apresentado um perfil aparentemente inofensivo para esta *Designer drug*, estudos têm mostrado potenciais processos oxidativos que esta molécula pode desencadear. Considerando também os seus assustadores efeitos comportamentais no homem, mais estudos têm que ser feitos para percebermos com mais clareza o perfil toxicológico desta droga.

**Palavras-chave:** *Designer drugs*, MDPV, Metanfetamina, neurotoxicidade, RAGE, estriado

## Abstract

Over the last few years, the traditional drug scene has been modified with the emergence of new psychoactive substances (NPS). Synthetics cathinone are the most popular ones, with 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) arising as the primary ingredient in the so-called “bath salts”. This drug is a powerful central nervous system (CNS) stimulant and is used to mimic the effects of controlled substances such as cocaine and methamphetamine (METH). Considering the severity of its central and peripheral toxicities, MDPV has already caused an international alert.

The use of psychostimulants is related to profound adverse consequences with neurocognitive, -psychiatric and -physiologic impairments. METH is a dopaminergic toxin, known to trigger activation of microglia and astrocytes by neurotoxicity induced in discrete regions of the brain. These CNS interferences contribute to the motor and psychiatric symptoms associated with its dependence. Likewise, MDPV also hijacks the dopaminergic system, but nothing is known about its outcomes in motor behavior and neurotoxicity in the CNS. Therefore, our aim was to compare the behavioral and neurotoxic properties of MDPV and METH in their earlier stages of action, focusing on the striatum. To address this issue, we subjected mice with a binge-like regimen ( $4 \times 10$  mg/Kg, two hours-apart) and evaluated the effects of both toxins on presynaptic dopaminergic neurons and on glial cells activation, and their impact on the innate immune receptor of advanced glycation end-products (RAGE).

Surprisingly, our results show for the first time that MDPV does not share with METH its drastic behavioural and neurotoxic effects, within the first 24 hours. Unlike METH, MDPV did not develop motor dysfunction nor did impose tyrosine hydroxylase TH depletion or glial activation. Interestingly, one should stress that MDPV increased exploratory behavior. Notably, both drugs failed to change RAGE and its ligand, S100 $\beta$ , levels in striatum at this point. Moreover, none of the drugs appeared to cause damage to myelin.

Taken together, this comparative study gives new insights into initial effects of MDPV regarding to motor deficits and to neuroinflammation state. Although it appears to be a harmless drug, evidences show its strong involvement in oxidative processes which may be in place for longer exposure time. For this reason, there is much that needs to be done to fully disclose the dangers that may come with this drug.

**Key-words:** Designer drugs, MDPV, Methamphetamine, neurotoxicity, RAGE, striatum

# ***Capítulo I***

*Introdução*



## 1 Introdução

As novas substâncias psicoativas sintéticas têm contribuído para uma realidade alarmante no mundo das drogas de abuso. Por serem *Designer drugs*, muitas resultam da otimização racional da função biológica associada, gerando moléculas com propriedades farmacológicas desconhecidas e, muitas vezes, em produtos ainda mais potentes do que os de partida. Face aos perigos de saúde pública que podem representar, estas substâncias têm despertado grande interesse na comunidade científica. A 3, 4-Metilenodioxipirovalerona (MDPV) é uma das drogas que mais popularidade ganhou e é o principal constituinte dos *Bath salts*: uma mistura de catinonas sintéticas<sup>1,2</sup>.

Estas drogas são disponibilizadas em diversos meios (*smart shops*, lojas virtuais, mercado negro) a baixo custo e são apresentadas como substâncias euforizantes alternativas às drogas clássicas, como a Metanfetamina (META) ou outros psicoestimulantes<sup>3</sup>. Tal como acontece com outros psicoestimulantes, o consumo destas substâncias tem originado um quadro de intoxicação associado a perturbações psiquiátricas que incluem agressividade, ansiedade extrema, alucinações e outros sintomas psicóticos<sup>4</sup>.

A META é um psicoestimulante, sendo uma das drogas do tipo anfetamínico mais vulgar e uma das que pode provocar um grave padrão de neurotoxicidade, associado a efeitos como a perturbação dos sistemas dopaminérgico e imune e a neuroinflamação<sup>5</sup>.

A MDPV, partilha com a META, uma elevada afinidade pelo sistema dopaminérgico nigroestriatal<sup>6</sup>. No entanto, nada se sabe relativamente ao impacto desta nova *Designer drugs*, MDPV, nas células do sistema imune central. Assim, é totalmente pertinente abordar esta questão, para melhor perceber os perigos subjacentes ao seu consumo.

## 1.1 Psicoestimulantes

O ser humano e os fármacos psicoestimulantes (drogas) têm um vínculo tão antigo como quase a sua própria existência. Desde cedo, as civilizações antigas aprenderam a obter das plantas produtos com propriedades medicinais (aliviar sintomas e/ou curar doenças). Entre eles, encontram-se substâncias psicoativas como o ópio, com efeitos analgésicos, sedativos e tranquilizantes ou, a cannabis, com efeitos analgésicos e hipnóticos, ou a folha da coca, para sensação de bem-estar e de energia. No entanto, o homem também aprendeu que podia recorrer a este tipo de produtos como fontes de euforia, prazer, alucinações e misticidade<sup>7</sup>.

Apesar desta longa relação, o uso de drogas nem sempre esteve acessível a todos os indivíduos, tendo sido exclusivo de elites, intelectuais, sacerdotes ou curandeiros. A generalização do uso de drogas aconteceu no fim do século XIX, com os primeiros passos da Química Orgânica. Nesta época, foram extraídas e isoladas substâncias a partir de plantas, como a morfina ou a cocaína. A cocaína foi adicionada a vários produtos comerciais e prescrita para o tratamento da depressão, ansiedade ou para o tratamento da adicção de morfina em soldados da Guerra Civil Americana (1861-65).<sup>8</sup>

Os efeitos colaterais do uso destes compostos psicoativos só começaram a ser reconhecidos apenas no século XX. De facto, na sequência da Convenção Internacional do Ópio em 1912, com a reunião de 13 nações, foram impostas restrições à circulação, venda e consumo destas substâncias<sup>9</sup>. Paralelamente ao aparecimento de restrições, a indústria farmacêutica foi introduzindo novos fármacos com propriedades psicoativas para desempenharem as mesmas funções das que foram sendo regulamentadas.

A Segunda Guerra Mundial foi o marco mundial da difusão do uso e abuso de drogas, disponibilizadas como substâncias que aumentam a coragem ou diminuem a fadiga. Exemplos destas drogas incluem as drogas de abuso sintéticas anfetamina, META, metilendioximetanfetamina (MDMA, ecstasy) e, mais tarde, a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) (anos 40).

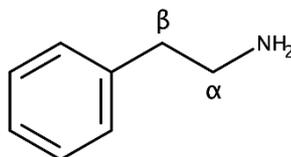
Particularmente, as estruturas da anfetamina e da META foram patenteadas e comercializadas para o tratamento da asma, narcolepsia, depressão, obesidade ou hiperatividade com défice de atenção infantil, em alguns casos como substituintes da cocaína (depressão, obesidade). Os sintomas severos do abuso destas substâncias tornaram-se evidentes após a Segunda Guerra Mundial. Contudo, a anfetamina e a META foram incluídas na lista de

substâncias controladas *Schedule II*, apenas em 1971. A sua prescrição passou a ser permitida em situações clínicas devidamente justificadas, sendo proibida a sua livre circulação<sup>10,11</sup>.

Com efeito, as drogas de abuso sintéticas, visavam mimetizar os efeitos psicoativos das drogas ilegais, fugindo ao controlo legal. Progressivamente, foram também surgindo restrições ao uso destas novas substâncias que, contrariamente ao pretendido, apenas incentivaram o consumo e o aparecimento de mercados clandestinos com o objetivo de procurar análogos farmacológicos às drogas tradicionais. Em consequência, esta cultura prolonga-se até aos dias de hoje e é ilustrada pelo fenómeno das *Designer drugs*<sup>12</sup>.

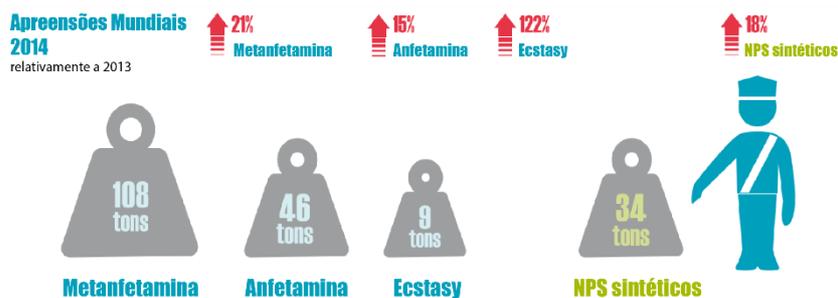
As drogas sintéticas têm a característica comum de não dependerem de recursos naturais para a sua produção, diminuindo os custos e acelerando o ritmo da sua produção. Assim, as *Designer drugs* constituem um grave problema mundial associado a todas as classes sociais, sendo alimentado pelo aparecimento exponencial de novas substâncias com propriedades desconhecidas e imprevisíveis.

A anfetamina e os seus análogos (META, ecstasy) constituem o grupo de *Designer drugs* com o historial mais longo: os estimulantes do tipo anfetamínico (ATS, *amphetamine-type stimulants*). Este conjunto de compostos caracteriza-se pela capacidade psicoestimulante de interferir nos sistemas monoaminérgicos do SNC e por possuírem a estrutura típica da Feniletilamina com derivações no anel, na amina ou nas posições  $\alpha$  e  $\beta$  da cadeia alquílica (figura 1.1)<sup>13</sup>.



**Figura 1.1 Derivatizações da Feniletilamina.** Anel aromático, amina e posições  $\alpha$  e  $\beta$  da cadeia alquílica como possíveis locais de derivatização para obter os vários ATS, partindo da Feniletilamina.

A popularidade destas drogas é refletida pela sua presença contínua no *ranking* das drogas mais consumidas mundialmente, tendo em 2011 sido consideradas o segundo tipo de drogas mais consumido (depois da canábis), de acordo com o *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC)<sup>14</sup>. De todos os ATS, a META domina os mercados mundiais com o maior número de apreensões, que tem vindo a aumentar progressivamente ao longo dos anos (figura 1.2)<sup>15</sup>.

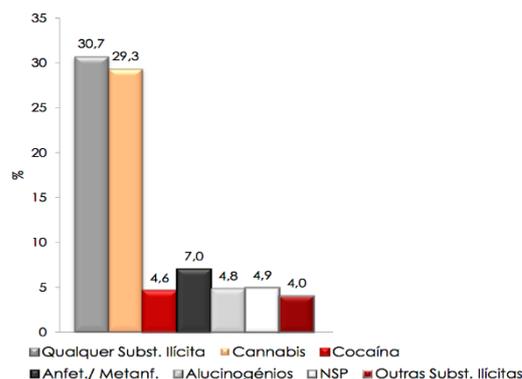


**Figura 1.2** Apreensões globais em toneladas de ATS e NPS em 2014, com os aumentos relativos ao ano de 2013<sup>15</sup>.

Paralelamente à problemática das ATS, começou a emergir, desde 2005, um conjunto de substâncias sintéticas psicoativas que ainda não estão abrangidas por quaisquer termos legislativos. O crescimento do abuso destas drogas despertou a atenção das entidades que as denominaram de *New Psychoactive Substances* (NPS)<sup>16</sup>. Estes produtos surgem com estruturas químicas análogas às drogas tradicionais (cannabis, cocaína, META, LSD ou ecstasy) e pretendem mimetizar os seus efeitos psicoativos. As estruturas químicas mais vulgares são os canabinóides, as catinonas, as feniletilaminas, as triptaminas e as piperazinas. Alternativamente, também podem ser classificados segundo os seus efeitos farmacológicos, como: estimulantes, depressores, halucinogénicos ou dissociativos<sup>17</sup>.

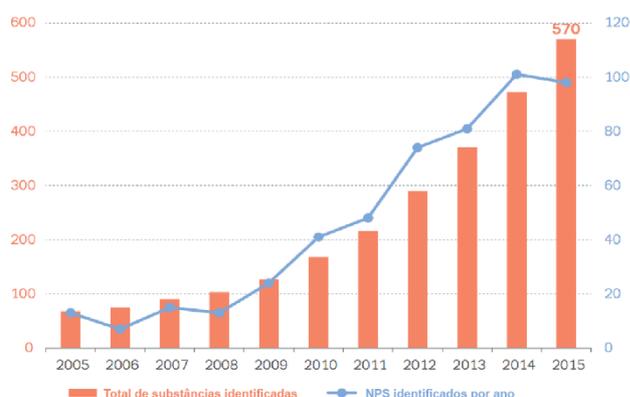
Segundo o UNODC, a quantidade de apreensões de META subiu 21% em 2014 relativamente ao ano anterior, mantendo-se como a ATS mais prevalente no mercado. Coincidentemente, a realidade das NPS destaca-se com o aumento de 18% de quantidade confiscada, com uma quantidade próxima à anfetamina (figura 1.2)<sup>15</sup>.

Similarmente, a presença destas substâncias já foi reportada em Portugal. Os primeiros indicadores das NPS surgiram no Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Geral de 2012 (INPG, 2012), onde 0,4% da população entre os 15-64 anos afirmou ter tido contacto com estas substâncias. No último Relatório Anual Drogas e Toxicodependências 2015, apresentado pelo Serviço de intervenção aos comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD), são revelados dados relativos a um inquérito a jovens com 18anos. Os dados indicaram uma prevalência semelhante do consumo de NPS semelhante ao de outras drogas, como a cocaína ou alucinogénicos ( $\approx 5\%$ ); os ATS aparecem com uma prevalência de consumo de 7% (figura 1.3)<sup>18</sup>.



**Figura 1.3 Prevalência de consumo por tipo de droga na população com 18anos em Portugal** (adaptado do Relatório Anual Drogas e Toxicodependências 2015<sup>18</sup>).

A informação inerente às NPS é muito mais vasta em contextos mundiais e sugere uma situação mais dramática e preocupante do que aquela que se vive em Portugal. Estes novos compostos, com propriedades biológicas ainda desconhecidas, destacam-se pela grande diversidade estrutural, permitindo a produção em massa de uma grande diversidade de produtos. Em 2015 a *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA) e a Europol, denunciaram o importante aumento de novos compostos psicoativos, com 98 novas NPS detetadas na Europa (figura 1.4)<sup>19</sup>.



**Figura 1.4 Evolução do número de novos NPS registados em cada ano, com o correspondente número de drogas monitorizadas** (retirado do Relatório EMCDDA-Europol 2015<sup>19</sup>).

Adicionalmente, a afirmação destas drogas no mercado internacional parece ser fortalecida pelo seu custo relativamente baixo e pelo fácil acesso em mercados online, com 58% da compra de NPS a ser via online (*Global Drug Survey* 2015). De acordo com o *Global Drug Survey* 2017, as NPS estão entre as drogas mais compradas via *online* (33%), contra apenas 14% de compras de ATS (anfetamina/META) (figura 1.5)<sup>20</sup>.

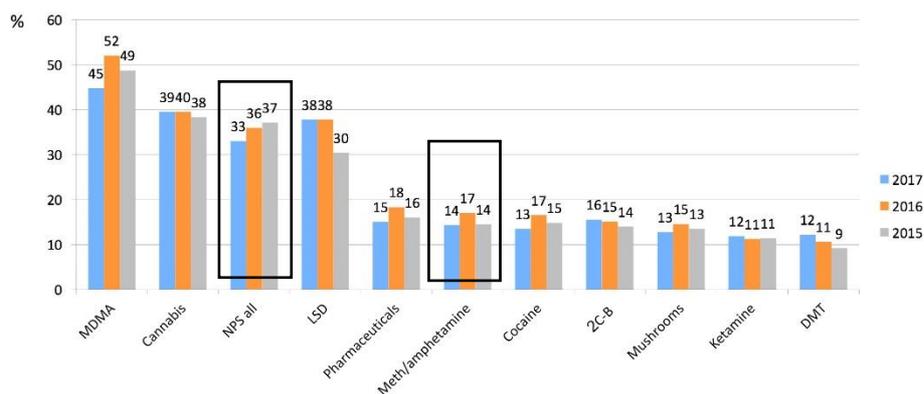


Figura 1.5 “Que tipo de drogas tem mais obtido em mercados online?” (retirado do *Global Drug Survey 2017*<sup>20</sup>).

Como anteriormente referido, as NPS incluem drogas que pertencem às mais variadas classes estruturais, no entanto, existem algumas que se destacam. As NPS mais recorrentes são os Canabinóides sintéticos e as Catinonas sintéticas, tal como sugerido pelos *World Drug Report 2016* (UNODC)<sup>15</sup> e *European Drug Report 2016* (EMCDDA)<sup>21</sup> (figura 1.6).

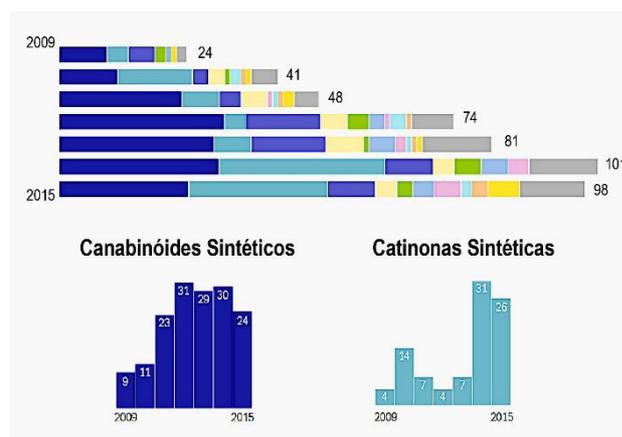


Figura 1.6 Representação do número de canabinóides e catinonas sintéticas no total de NPS apreendidos por ano (adaptado do *World Drug Report 2016* (UNODC)<sup>15</sup>).

Curiosamente, as catinonas sintéticas são na sua maioria compostos análogos, química e farmacologicamente, aos compostos anfetamínicos, sendo por isso, também rotulados de estimulantes do tipo anfetamínico. Esta especificidade permite delinear estratégias de estudo destes novos compostos, recorrendo às propriedades das ATS como termos de comparação. O projeto em questão seguiu esta linha de raciocínio, recorrendo às drogas mais representativas das ATS e das Catinonas sintéticas: a META e a MDPV, respetivamente.

### 1.1.1 Metanfetamina (META)

A META é uma substância com atividade psicoestimulante, vulgarmente utilizada para fins recreacionais pelos seus intensos efeitos euforizantes. Contudo, o seu elevado potencial de abuso pode transformar rapidamente o uso esporádico num desejo forte de consumo recorrente, traduzindo-se num consumo crónico de META associado a graves efeitos secundários.

A META está disponível em forma de pó branco ou cristal branco translúcido, correspondendo ao seu sal (pela junção de ácido clorídrico), e na forma de comprimidos pela adição de outros adjuvantes, com a função de substituir parcialmente a META (diminuindo a pureza). O consumo pode ser feito pelas vias oral, inalatória (fumar), intranasal (snifar) ou intravenosa. A forma cristalizada possui maior pureza e é suficientemente volátil para passar a vapor, podendo ser consumida por via inalatória<sup>22</sup>.

A sua estrutura difere daquela da anfetamina pela existência de um grupo metilo na amina, sendo igualmente dotada de um centro quiral. A metilação da amina confere maior lipossolubilidade à META (logP 1.94), comparativamente à anfetamina (logP 1.81). Assim, a META tem maior facilidade em permear barreiras lipídicas<sup>23</sup>. Os seus enantiómeros possuem diferentes efeitos farmacológicos, sendo o isómero S(+)-META responsável por induzir efeitos estimulantes<sup>24</sup>.

O início de ação e a intensidade dos efeitos farmacológicos da META dependem da dose e das vias de administração (afetam a biodisponibilidade), da extensão da sua distribuição, biotransformação e excreção. Algumas das suas propriedades farmacocinéticas encontram-se discriminadas na Tabela 1. Com efeito, os efeitos mais imediatos, intensos e duradouros, são proporcionados pelas vias intravenosa e inalatória (fumo), onde os picos da concentração plasmática são atingidos mais rapidamente e a excreção é relativamente mais lenta. Contudo, está descrito que os efeitos da META duram entre 4-8horas, com efeitos residuais até 12horas<sup>25</sup>.

**Tabela 1** Comparação de parâmetros farmacocinéticos das várias vias de administração da META.

	Biodisponibilidade (%)	T <sub>[plasmática]máx</sub>	T <sub>1/2</sub> (h)	Ref.
Via intravenosa	100	Minutos	12	26
Via inalatória	67 - 90	1 - 2,5h	10 - 11	26,27
Via intranasal	79	4h	10	27
Via oral	67	3h	10	28,29

Relativamente à biodistribuição, a sua elevada lipofilicidade e baixa afinidade para as proteínas plasmáticas<sup>30</sup>, permitem a sua distribuição generalizada pelo organismo. Recorrendo à técnica de *Positron emission tomography* (PET), Volkow e os seus colaboradores<sup>31</sup> observaram elevados níveis de acumulação nos pulmões e fígado (23,7 e 21,8%, respetivamente) e uma menor extensão no cérebro e rins (9,6 e 6,7%, respetivamente), sendo que o pico de concentração de META no cérebro foi atingido 9min após a sua administração. No entanto, a depuração cerebral da META é lenta.

A sua metabolização é essencialmente hepática e não origina metabolitos ativos (anfetamina não atinge concentrações farmacologicamente relevantes) e não parece ser alterada pelo seu uso crónico<sup>32</sup>. A META é excretada na urina na sua forma original e sob a forma de anfetamina, podendo sofrer acumulação com doses repetidas, o que permite a sua identificação na urina dos consumidores até 7dias após a última dose, na sequência de um consumo contínuo<sup>25,26</sup>. O pH da urina parece influenciar a quantidade excretada de META: pH ácido facilita a sua excreção através da urina<sup>29</sup>.

Do ponto de vista farmacodinâmico, os ATS caracterizam-se pela sua interação com os transportadores das monoaminas biológicas, perturbando a sua homeostasia. Estes compostos diferem na afinidade e interação com os diferentes sistemas monoaminérgicos. Contudo, é transversal a capacidade de aumentarem a concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica, prolongando a duração e intensidade da neurotransmissão.

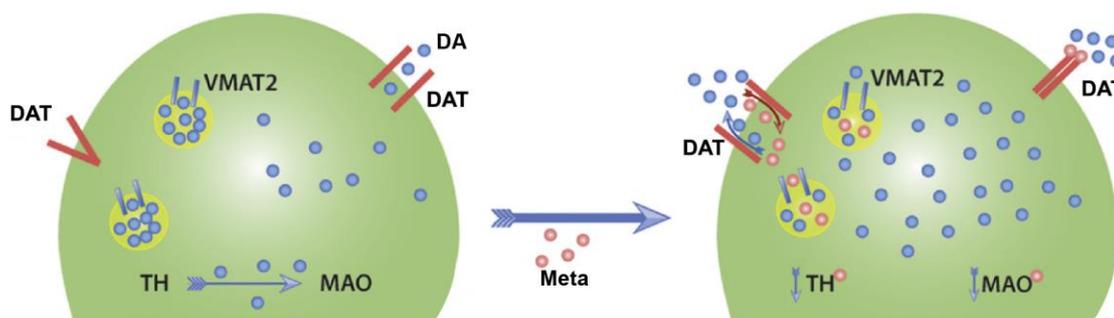
Especificamente, a META tem maior afinidade pelos transportadores da noradrenalina (NET, *norepinephrine transporters*) e dopamina (DAT, *dopamine transporters*) do que a anfetamina, sendo considerada uma droga mais potente do que a anfetamina<sup>33</sup>. A sua interação com o sistema noradrenérgico é responsável pelos seus acentuados efeitos simpaticomiméticos<sup>33</sup>. No entanto, são os seus efeitos na neurotransmissão dopaminérgica que são responsáveis pelo seu forte poder de reforço e adicção. A META distribui-se rapidamente por todas as áreas cerebrais. No entanto, a sua farmacocinética no estriado acompanha a cinética do efeito “*high*” proporcionado pela META e a densidade estriatal de DAT<sup>34</sup>. Por este motivo, de seguida são expostos os mecanismos de ação da META específicos ao sistema dopaminérgico.

A META é caracterizada por atuar em múltiplos alvos que concorrem para aumentar a dopamina (DA) na fenda sináptica: em transportares membranares e vesiculares de DA, em enzimas de degradação/produção de DA.

A META é um substrato dos DAT nos terminais dopaminérgicos pré-sinápticos, competindo com a DA pelo seu local de ligação e promovendo o transporte reverso de DA pelo DAT,

umentando conseqüentemente o efluxo de DA<sup>35</sup>. No entanto, o mecanismo que promove esta libertação de DA não está totalmente esclarecido (difusão por troca facilitada – modelo clássico – ou transporte pelo DAT tipo canal iônico, dependente dos canais de Ca<sup>2+</sup>)<sup>35–38</sup>.

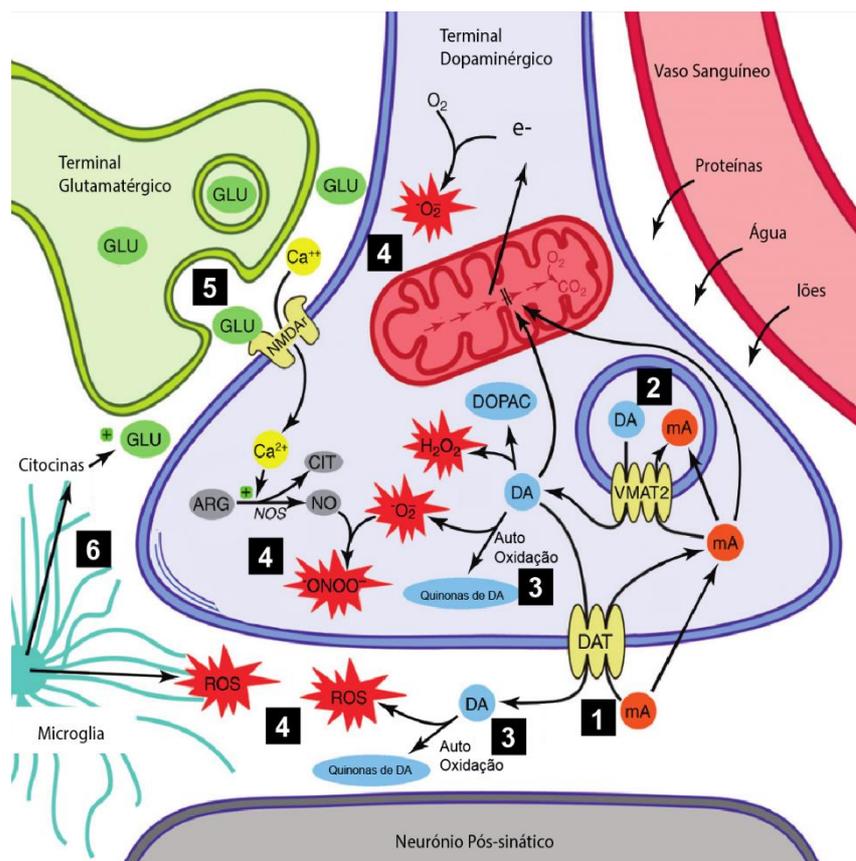
Para além da interação com os DAT, a META promove a redistribuição de DA nos terminais dopaminérgicos. Esta capacidade é em parte justificada pela interferência da META no armazenamento vesicular de DA, sendo substrato dos transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT, *Vesicular monoamine transporter*), diminuindo o armazenamento do neuromodulador nas vesículas por quebra do gradiente de pH dentro destas (como base fraca atravessa facilmente a membrana vesicular e liga-se aos prótons que mantêm o pH ácido, alcalinizando o ambiente)<sup>35</sup>. Outros mecanismos que contribuem para o aumento da DA no terminal pré-sináptico são a diminuição da degradação da DA, pela inibição da atividade enzimática da Monoamina Oxidase (MAO), e a interferência na atividade da enzima Tirosina Hidroxilase (TH)<sup>35,37</sup>. A síntese de DA é afetada discriminadamente, de acordo com a região cerebral<sup>39,40</sup>, sendo que no estriado a depleção de TH nos terminais dopaminérgicos representa um marcador importante da neurotoxicidade associada ao uso crónico de META<sup>41,42</sup>. Talvez mecanismos de *feedback* negativo pelo aumento de DA extracelular, justifiquem a inibição de ação da TH<sup>39,40</sup> (figura 1.7). Com efeito, parece ocorrer uma neurotoxicidade regiosseletiva associada à META. Foram descritas lesões cerebrais decorrentes do abuso de longa duração de META (em humanos e roedores), particularmente no estriado (caudado-putâmen ventral)<sup>43–46</sup>. Foi sugerido que a maior densidade de DAT e níveis de DA extracelulares nesta região cerebral contribuem para este fenómeno<sup>43</sup>.



**Figura 1.7 Alvos farmacológicos da META nos terminais dopaminérgicos estriatais.** A imagem ilustra a dinâmica da DA na ausência (esquerda) e na presença (direita) de META. Na presença da META, o DAT promove a entrada da toxina para o meio intracelular e a libertação de DA para a fenda sináptica; a influência da META no DAT, não permite o *uptake* da DA funcionando como inibidor competitivo. Uma vez no citoplasma, a META aumenta os teores de DA no axoplasma pré-sináptico: quebra o gradiente de prótons nas vesículas de armazenamento, pelo VMAT2; inibe a degradação da DA, pela enzima MAO, e diminui a atividade da TH (adaptado de Sulzer et al.<sup>35</sup>).

A Figura 1.8 resume alguns dos mecanismos subjacentes à neurotoxicidade associada ao consumo da META. Como resultado direto da ação da META nos terminais dopaminérgicos, mecanismos de compensação podem provocar, a longo prazo, a diminuição dos níveis de DA, da densidade dos DAT e de TH<sup>47,48</sup>. A perturbação da homeostasia de DA está associada à produção de radicais livres, quer pela disponibilidade de DA em ser degradada intra- e extracelularmente (ROS, espécies reativas de oxigénio e /ou RNS, espécies reativas de azoto)<sup>47,48</sup>. Perturbações mitocondriais<sup>49</sup> e alterações da função glial<sup>50</sup> também contribuem para a formação de espécies reativas. Para além disso, a ativação permanente da glia (astro- e microglíose) contribui para a produção de mediadores inflamatórios<sup>51</sup>. Mecanismos apoptóticos<sup>52</sup>, autofágicos<sup>53</sup>, bem como a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE)<sup>54</sup> e alterações da mielina<sup>55</sup>, foram também associadas à neurotoxicidade produzida pela META. Paralelamente, perturbações no equilíbrio entre o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e o glutamato induzidas pela META também contribuem para a excitotoxicidade e a toxicidade dopaminérgica<sup>56,57</sup>. Estas evidências experimentais de neurotoxicidade foram essencialmente produzidas em modelos animais.

No contexto de farmacologia clínica, o consumo de baixas doses de META provoca sentimentos de intensa euforia e desinibição, diminuição da fadiga e aumento da vigília e da libido (ações dopaminérgicas); as ações noradrenérgicas são responsáveis por efeitos simpaticomiméticos como taquicardia, aumento da pressão arterial e vasoconstrição cutânea. O abuso de META é impulsionado pela alteração do sistema dopaminérgico de recompensa, incluindo o desenvolvimento de tolerância: doses cada vez maiores são necessárias para gerar os mesmos efeitos. Consequentemente, o consumo de doses elevadas e repetidas de META pode desencadear comportamentos repetitivos, compulsivos e violentos, alterações psiquiátricas (ex.: ansiedade, depressão, psicoses) e distúrbios cognitivos (falta de coordenação motora, problemas na atenção e memória)<sup>58,59</sup>; os sintomas simpaticomiméticos podem intensificar-se, com casos de enfartes e acidentes vasculares cerebrais<sup>60,61</sup>.



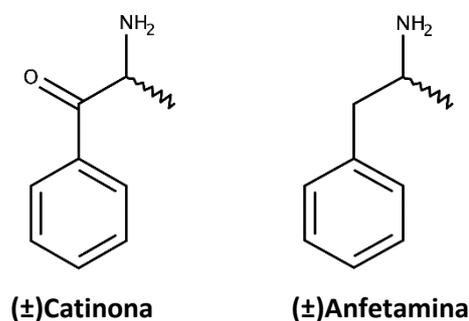
**Figura 1.8 Mecanismos associados à neurotoxicidade da META.** 1) Transporte da META pelo DAT induzindo a extrusão de DA para a fenda sináptica; 2) Intracelularmente a META provoca a redistribuição da DA das vesículas para o axoplasma; 3,4) A disfunção mitocondrial, oxidação da DA (intra- e extracelularmente) e a ativação da glia contribuem para produção de espécies reativas de oxigênio e azoto (ROS e RNS), produzindo stress oxidativo; 5) Excitotoxicidade mediada pelos recetores NMDA (sistema Glutamatergico); 6) A ativação da glia induz a libertação de citocinas (adaptado de Marshall et al.<sup>48</sup>).

### 1.1.2 Catinonas Sintéticas e Bath Salts

A *Catha edulis*, conhecida por Khat, é uma planta vulgarmente utilizada pelos seus efeitos psicoestimulantes, com origem na África ocidental. A catinona, o seu principal princípio ativo, foi apenas identificado em 1975. Foi-lhe atribuída a responsabilidade das propriedades psicoativas da planta<sup>62</sup>. Curiosamente, tinham anteriormente sido sintetizadas estruturas análogas, como a metilcatinona e a mefedrona (primeiras catinonas sintéticas). No entanto, em consequência dos seus efeitos secundários, não lhes foi atribuída qualquer aplicação clínica.

A catinona é uma versão oxidada da noradrenalina no grupo hidroxilo e difere da anfetamina pela presença de um grupo cetónico na posição  $\beta$  da cadeia lateral (figura 1.9). O grupo

carbonilo das catinonas aumenta a polaridade, relativamente aos seus análogos anfetamínicos, diminuindo assim a sua capacidade de permear por barreiras lipídicas, nomeadamente a BHE<sup>63</sup>.



**Figura 1.9** Estruturas químicas dos enantiómeros das substâncias psicoestimulantes catinona e anfetamina.

Para além da semelhança estrutural, as catinonas partilham os mesmos efeitos característicos dos análogos anfetamínicos, sendo também considerados estimulantes do tipo anfetamínico. Estes psicoestimulantes produzem os seguintes efeitos: aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, broncodilatação, aumento do estado de alerta e do metabolismo; sensações de euforia, bem-estar e energia; aumento da libido; diminuição da fadiga<sup>64</sup>. No entanto, em doses elevadas as catinonas podem provocar desorientação, movimentos involuntários, agitação, comportamentos violentos, ansiedade e crises de psicose aguda, caracterizadas por alucinações, paranoia e/ou delírios<sup>65,66</sup>. Todos estes sintomas sugerem perturbações na homeostasia dos neuromodeladores monoaminérgicos: mecanismo partilhado com os análogos anfetamínicos<sup>67</sup>.

As catinonas sintéticas são comercialmente rotuladas como *Bath salts* ou *Plant food*, estando disponíveis várias marcas para estas drogas (*Super Coke*, *Blow*, *Cloud Nine*, *Ivory Wave*, *Bliss*) (figura 1.10)<sup>66</sup>. Os rótulos, geralmente, indicam que estas substâncias não se destinam a consumo humano. Normalmente, apresentam-se como um pó cristalino branco ou castanho, podendo ser consumidas por via oral, respiratória (fumar ou snifar) ou via intravenosa<sup>68</sup>.



**Figura 1.10** Exemplo de *Bath salts* populares. Marcas Blow<sup>303</sup> e Ivory Wave<sup>304</sup> de misturas que contêm catinonas sintéticas.

A composição química dos *Bath salts* não é indicada nas embalagens. No entanto, estes constituem uma mistura de uma, duas ou várias catinonas com outros compostos (caféina, lidocaína, doxilamina), sendo as catinonas as substâncias em maior proporção. A mefedrona, a metilona e a MDPV são algumas das catinonas detetadas com maior frequência nos produtos<sup>69</sup>. A Tabela 2 representa a análise qualitativa de diferentes nomes de *Bath salts*. Esta tabela evidencia que a MDPV é a catinona mais abundante, existindo em mais de 50% dos produtos comercializados<sup>1,69,70</sup>. Adicionalmente, também se observou que os componentes dos *Bath salts* existem em quantidades variáveis em diferentes marcas e, até na mesma marca<sup>69</sup>.

Em 2012, estas três *Designer drugs* foram incluídas na lista das drogas *Schedule I*, que inclui todas as substâncias químicas cuja venda, posse e uso estão proibidos<sup>71</sup>.

Apesar das características psicoestimulantes transversais a todos estes compostos, a variabilidade existente no mercado (misturas diferentes com o mesmo nome, misturas com múltiplos constituintes, composições em permanente mudança) torna bastante desafiante a caracterização dos seus efeitos farmacológicos no humano<sup>72</sup>.

**Tabela 2** Detalhes resultantes da análise qualitativa/quantitativa de diferentes marcas de *Bath salts*. As setas azuis pretendem salientar a relativa abundância da MDPV (adaptada de Schneir et al. <sup>69</sup>).

Product Name	Purchase Location	Purchase Date	Price (USD)	Declared Weight (mg)	Measured Weight (mg)	Synthetic Cathinones			Other (Designer) Amines		Other Drugs		Total Stimulants (mg) <sup>†</sup>
						Drug Detected	Amount (mg) <sup>†</sup>	Drug Detected	Measured Weight (mg) <sup>†</sup>	Drug Detected	Measured Weight (mg) <sup>†</sup>		
Crazy Train	Internet	08/11/11	\$9.95	ND	168	MDPV	0.26	Fluoroamphetamine	21	Caffeine	17	38.0	
Eight Ballz	Internet	08/11/11	\$9.95	ND	75	MDPV	24	Ethylamphetamine	0.09			24.1	
Eight Ballz Ultra	San Diego	08/11/11	\$30.00	1000	921	MDPV	275					276.6	
Premium						MDPBP	1.6						
Ivory Dove Ultra	Internet	08/11/11	\$21.24	200	288**	Ethcathinone	17	Ethylamphetamine	72			89.5	
						MDPV	0.45						
Ivory Wave Ultra	Internet	08/11/11	\$21.24	200	264**	MDPV	85					85.0	
Ivory Wave Ultra	Internet	08/11/11	\$29.99	500	616**	PVP	130					130.0	
						Ethylone	155					155.0	
						Ethcathinone	182					182.0	
						Pentredone	17					17.0	
						MDPBP	7.6					7.6	
Pixie Dust	San Diego	08/11/11	\$20.00	ND	1045	Buphedrone	555			Caffeine	95	845.0	
						Methylone	102			Doxylamine	184	184.0	
Scarface	San Diego	08/11/11	\$21.55	ND	389	Flephedrone	93			Lidocaine	74	160.0	
						Butylone	13	5-IAI	147	Doxylamine	8.1	8.1	
Stardust	San Diego	08/11/11	\$21.55	ND	293	Pentredone	138					138.0	
Strawberry Bath	San Diego	08/11/11	\$20.00	500	498	MDPV	118					118.0	
Ultimate Sextacy	Internet	08/11/11	\$21.24	200	498**	MDPV	55			Lidocaine	10	65.1	
Aphrodisiaca													
						Pentredone	11					11.0	
						Ethylone	0.8					0.8	
						MDPBP	0.32					0.32	
Vanilla Sky	Internet	08/11/11	\$21.24	ND	254	PVP	53	Ethylamphetamine	0.27	Lidocaine	13	190.5	
						Ethcathinone	73					73.0	
						Ethylone	58					58.0	
						Pentredone	4					4.0	
						MDPBP	2.2					2.2	
White Pony	Internet	08/11/11	\$29.99	500	554	MDPV	360					360.0	
						MDPBP	1.2					1.2	
White Rush	Internet	08/11/11	\$29.99	250	231	MDPPP	0.28			Lidocaine	0.3	228.5	
						PBP	223					223.0	
						PVP	4					4.0	
						MDPV	0.35					0.35	
						Ethylone	0.85					0.85	
White Sand	San Diego	08/11/11	\$26.93	500	673**	Ethcathinone	0.19					0.19	
						Mephedrone	142			Caffeine	219	219.0	
										Lidocaine	226	226.0	
Cloud 9	San Francisco	08/24/11	\$35.00	250	265	Flephedrone	219					219.4	
						Pentredone							
Eight Ballz Ultra	San Francisco	08/24/11	\$29.99	500	426	MDPV	126					126.7	
Premium						MDPBP							
Eclipse	Sacramento	08/25/11	\$26.94	1000	998	MDPV	93	Ethylamphetamine	1.1	Caffeine	448	542.1	
										Lidocaine	56	56.0	
										Doxylamine	184	184.0	

Em 2010 cresceu a sensibilização para estas drogas. Na verdade, houve um aumento de chamadas para a *American Association of Poison Control Center (AAPCC)* a relatar casos de

exposição a catinonas sintéticas (cerca de 10000). Entre 2011 e 2014 houve um total de 31000 chamadas relacionadas com estes psicoestimulantes<sup>73</sup>. O relatório de 2012 do AAPCC indicou que o pico de utilização destas drogas ocorreu em 2011, com 22000 emergências hospitalares envolvendo o consumo de *Bath salts*: 33% relacionaram-se com o consumo isolado e 52% refletiram a combinação com outras drogas (DAWN, *Drug Abuse Warning Network*)<sup>74</sup>.

A MDPV parece estar sempre presente em casos de intoxicação fatal com estas drogas. Em 2012 foram relatadas 29 mortes nos Estados Unidos<sup>75</sup> e 99 mortes na União Europeia<sup>76</sup>: estes óbitos tiveram em comum a presença de MDPV no *cocktail* de drogas consumido. Este facto é consistente com a análise qualitativa apresentada anteriormente.

Este quadro torna imperativa a compreensão das propriedades farmacológicas da MDPV. Além disso, o seu estudo permite prever possíveis características farmacológicas de futuros análogos NPS que surjam no mercado com uma cadência imprevisível.

### 1.1.3 3, 4-Metilenodioxipirovalerona (MDPV)

A classificação da MDPV como um NPS está associada à sua crescente popularidade como droga de uso recreacional; no entanto, a sua estrutura química foi pela primeira vez descrita em 1969, tendo sido patenteada como um estimulante central pela farmacêutica Boehringer Ingelheim<sup>77</sup>.

A molécula MDPV (figura 1.11) difere da estrutura mais simples característica das catinonas contendo derivatizações no anel aromático (grupo 3,4-metilenodioxi; à semelhança do ecstasy), na amina (pirrolidina) e na posição  $\alpha$  da ramificação da etilamina (grupo propil).

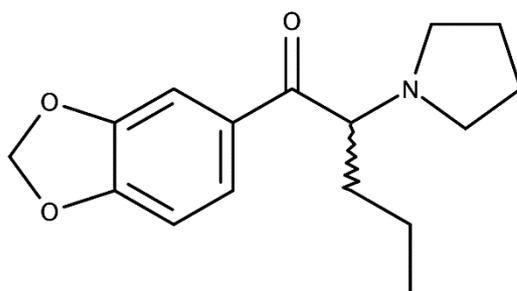


Figura 1.11 Estrutura química da 3, 4-Metilenodioxipirovalerona (MDPV).

A MDPV apresenta-se como um pó cristalino branco, na sua forma de sal com HCl, castanho, como base livre, ou cinzento (formulação Europeia)<sup>78</sup>. O seu sal pode ser dissolvido em água e ser administrado por via intravenosa. No entanto, as outras formulações de MDPV, com baixa solubilidade em água, são fumadas, inaladas ou ingeridas oralmente<sup>78</sup>.

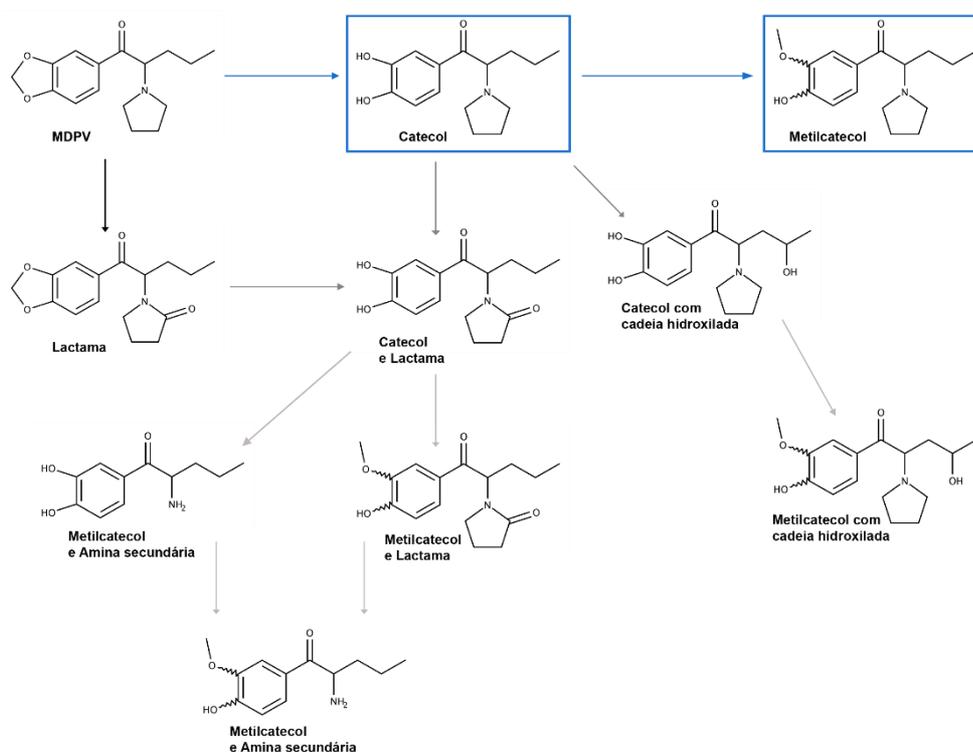
Não existem ainda estudos farmacocinéticos (nem em humanos ou em modelos animais) que estudem e comparem as diferentes vias de administração, ou até diferentes misturas deste composto. O facto do anel metilenodioxi ser responsável pela cinética não-linear do ecstasy (avaliação em humanos e roedores) permite sugerir que tal também aconteça com a MDPV<sup>79</sup>. Alguns estudos envolveram estudos da permeabilidade na BHE pela MDPV, da sua metabolização e excreção: um estudo preliminar sugeriu que a MDPV tem um tempo de semi-vida de 2h, em humanos<sup>80</sup>.

Em Gibbons et al. (2010) foram obtidas previsões dos valores de logP e logBHE para diferentes catinonas e para os respetivos análogos anfetamínicos, recorrendo a estudos de modelação molecular. Estes autores destacaram a MDPV como sendo a molécula mais lipofílica<sup>63</sup>. Mais tarde, Simmler et al. (2013), compararam o transporte transendotelial *in vitro* de várias drogas, tendo concluído que a MDPV possui uma elevada permeação por difusão passiva na barreira e, adicionalmente, também é transportado por mecanismos de transporte ativo, em contraste com as outras drogas. Na Tabela 3, estão representados os valores de permeabilidade dos fármacos anfetamina, META e MDPV num modelo de endotélio humano da BHE, onde se destaca a elevada permeabilidade do sentido apical para o basolateral da MDPV [valores de permeabilidade foram obtidos em comparação com a permeabilidade de um marcador extracelular com cor (Lucifer yellow)]<sup>6</sup>. Na verdade, este composto é uma exceção no grupo das catinonas, visto que o anel da pirrolidina diminui a sua polaridade, aumenta a sua lipofilicidade (logP 3.06)<sup>23</sup> e, com isto, permite maior permeação lipídica.

**Tabela 3** Parâmetros comparativos da permeabilidade dos compostos (permeabilidade dos compostos comparativamente a um controlo), num modelo de endotélio humano da BHE (retirado de Simmler et al.<sup>6</sup>).

	Apical para Basolateral	Basolateral para Apical	Permeabilidade	Transporte ativo
<b>Anfetamina</b>	6.3 ± 3.7	5.2 ± 1.3	+	Não
<b>META</b>	5.4 ± 1.1	6.4 ± 3.0	+	Não
<b>MDPV</b>	37.2 ± 11.3	12.0 ± 11.2	++	Sim

Um estudo preliminar *in vitro* sobre metabolitos indicou a formação dos análogos catecol e metilcatecol como os principais metabolitos de fase I da MDPV (abertura do anel metilenodioxí, seguida da desmetilação) (figura 1.12). Por outro lado, as enzimas de fase II produziram os conjugados de ácido glucurónico e sulfato dos metabolitos anteriores, numa proporção de 40% e 50% do produto metabolizado, respetivamente<sup>81</sup>. Em Meyer et al. (2010)<sup>82</sup>, produziram um estudo com maior detalhe que envolveu o fracionamento de vários metabolitos da MDPV, partindo de urina de rato e de humano. Adicionalmente ao catecol e ao metilcatecol, previamente descritos<sup>81</sup>, foram identificadas estruturas correspondentes à oxidação de um carbono na pirrolidina (lactama) e na cadeia propílica (formação da função álcool), incluindo as conjugações destas diferentes estruturas, em humanos. A formação de derivados sulfatados ou conjugados com o ácido glucurónico (metabolização fase II) também deve ser considerado.<sup>82</sup>



**Figura 1.12 Metabolismo da MDPV.** Compostos resultantes da metabolização da MDPV, sendo o catecol e o metilcatecol os compostos mais abundantes (quadrados azuis).

Passemos à análise dos estudos sobre a farmacodinâmica da MDPV. *A priori*, seria de especular a semelhança farmacológica entre a MDPV e o ecstasy (anel metilenodioxí em comum), no entanto, rapidamente esta ideia foi refutada. Curiosamente, o mecanismo de ação da MDPV afasta-se daquele associado às drogas estruturalmente análogas, assemelhando-se mais ao mecanismo de ação da cocaína.

Em 2013, três grupos de investigação, Baumann et al. (2013)<sup>83</sup>, Simmler et al. (2013)<sup>6</sup> e Eshlemen et al. (2013)<sup>84</sup>, realizaram uma avaliação sistemática da farmacodinamia MDPV, tendo sido classificada como um bloqueador seletivo dos transportadores das catecolaminas, destacando-se como uma das drogas mais potentes comparativamente às tradicionais.

Ensaíos *in vitro* permitiram verificar que a MDPV tem uma elevada afinidade de ligação para com os DAT e NET, exibindo, até, maior afinidade para o DAT comparativamente à META, visto que apresenta um valor menor de  $K_i$  (constante de dissociação do inibidor). Similarmente, esta catinona exibiu uma potência de inibição do *uptake* ( $IC_{50}$ ) pelos transportadores DAT e NET superior em relação à META e à cocaína, com a inibição em DAT<sup>6,83,84</sup>. Relativamente ao transportador da serotonina (SERT), a MDPV revela baixa afinidade pelo transportador, bem como uma baixa potência de inibição do *uptake* por este transportador. Isto sugere que a MDPV é mais seletiva para os transportadores das catecolaminas, ao contrário do que acontece com a cocaína. Na Tabela 4 podem ser consultados os valores  $K_i$  e  $IC_{50}$  para estes três psicoestimulantes.

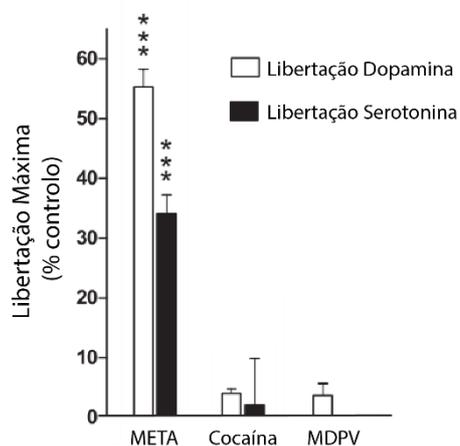
É relevante constatar que os efeitos da MDPV parecem ser estereosseletivos, uma vez que, os seus dois isómeros óticos diferem nas potências de inibição dos seus alvos farmacológicos (DAT e NET): a S(+)-MDPV apresenta uma potência de 200 e 80 vezes, respetivamente, maior do que a potência da R(-)-MDPV<sup>85</sup>.

**Tabela 4** Parâmetros de afinidade de ligação aos transportadores monoaminérgicos e sua inibição de transporte com a respetiva dose utilizada (adaptada de Simmler et al.<sup>6</sup>).

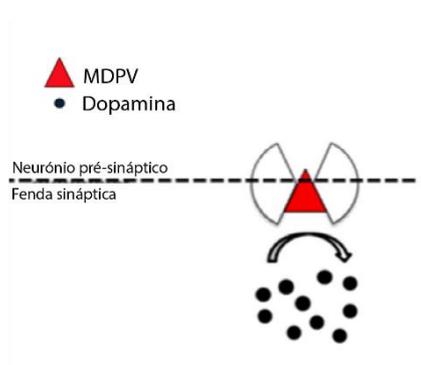
	Afinidade de ligação ( $K_i$ ) ( $\mu$ M)			Inibição do <i>uptake</i> ( $IC_{50}$ ) ( $\mu$ M)			Dose (mg)
	DAT	NET	SERT	DAT	NET	SERT	
<b>MDPV</b>	0,01	0,08	2,86	0,031	0,044	9,300	5
<b>META</b>	1,85	4,28	26,70	1,050	0,064	>10	30
<b>Cocaína</b>	0,28	4,47	1,10	0,768	0,451	2,370	75

Na sequência da caracterização da elevada afinidade da MDPV pelos DAT, foi importante determinar se o mecanismo que permite a sua inibição envolve o comportamento de substrato ou bloqueador por parte da MDPV. Por um lado, estudos de libertação de DA e de serotonina (5-HT) sugeriram que a MDPV induz uma baixa libertação de DA e nenhuma libertação de 5-HT. A ação dopaminérgica acompanhou a cocaína e foi significativamente menor do que a ação da META (figura 1.13)<sup>6</sup>. Adicionalmente, Baumann et al.<sup>83</sup> confirmou que a MDPV tem baixa eficácia no aumento do efluxo de DA. Consequentemente, foi possível concluir que o aumento de DA na fenda sináptica provocado pela MDPV se deve ao bloqueio do seu *uptake* pelo DAT

(tal como a cocaína) e não à sua libertação (em oposição à META) (figura 1.14). Adicionalmente, estudos de microdiálise em rato demonstraram que o MDPV é 10 vezes mais potente do que a cocaína na capacidade em aumentar a concentração de DA no espaço extracelular<sup>83</sup>.



**Figura 1.13 Estudos de liberação de neurotransmissores (DA e 5-HT).** Efeito máximo produzido por 100 $\mu$ M de META, Cocaína e MDPV na liberação de DA e 5-HT (adaptado de Simmler et al.<sup>6</sup>).



**Figura 1.14 Mecanismo de bloqueio do transportador da DA pela MDPV.** Na sequência da sua atividade como bloqueador do DAT, a MDPV inibe o *uptake* de DA na fenda sináptica (adaptado de De Felice et al.<sup>67</sup>).

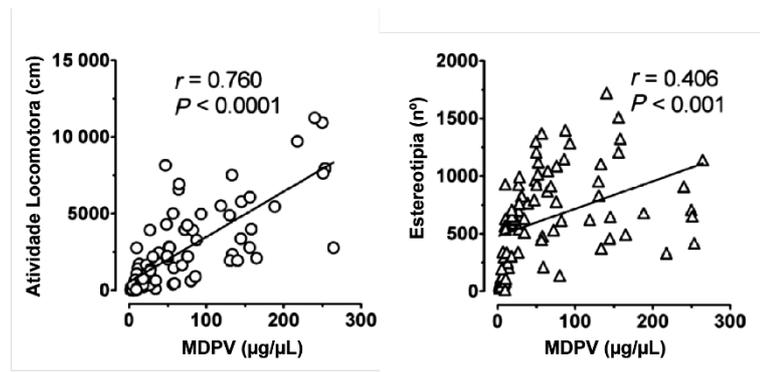
Apesar da MDPV partilhar o mesmo mecanismo de ação da cocaína, também é útil compará-la com a META, atendendo à sua seletividade para o sistema dopaminérgico.

Com efeito, recentemente foi investigado o potencial neurotóxico da MDPV, em comparação com estimulantes anfetamínicos, nomeadamente a META. Por exemplo, Eshleman et al. (2013)<sup>84</sup> demonstrou que a MDPV tem pouca afinidade para o VMAT2 e Anneken et al. (2015)<sup>86</sup> não verificou alterações na densidade relativa de DA, DAT, TH ou proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) no estriado de murganhos, após a administração de uma única dose de MDPV<sup>86</sup>. Contudo, foram ultimamente caracterizados

vários marcadores de neurotoxicidade em células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas: a) perda de viabilidade celular dependente da concentração utilizada (após 24 horas); b) aumento de ROS e RNS (metabolização do anel metilenodioxí, acumulação da DA extracelularmente); c) depleção de glutamina (talvez pela conjugação com metabolitos); d) danos na função mitocondrial; e) indução de mecanismos apoptóticos<sup>87</sup>. Apesar da aparente contradição entre os estudos *in vitro*, parece ser evidente que precisamos de mais estudos para caracterizar inequivocamente o potencial neurotóxico desta droga.

Existe pouca informação relativamente aos efeitos fisiológicos associados ao uso individual da MDPV no homem, já que os efeitos relatados são generalizados para as catinonas sintéticas ou para os *Bath salts*. No entanto, para misturas com maior quantidade relativa de MDPV ou no caso de serem consumidas grandes quantidades desta substância, são frequentemente relatados sinais de agitação e ansiedade excessiva, ataques de pânico, comportamentos violentos, sinais de psicose (alucinações, paranoia) e pensamentos suicidas<sup>80</sup>. De acordo com o relato de alguns consumidores, o consumo repetitivo após a primeira dose é habitual (*binging*), com 1-2 horas de intervalo, sendo que os efeitos desejáveis se prolongam por 2-4 horas. Contudo, os efeitos indesejáveis permanecem durante dias<sup>88</sup>. Por outro lado, alguns dos comportamentos induzidos pelo consumo da droga podem colocar em risco a vida do próprio e, em consequência, de todos os outros que o rodeiam<sup>80</sup>. A elevada seletividade da MDPV pelo sistema dopaminérgico sugere que esta droga tenha um elevado potencial de reforço, facilitando o abuso da mesma<sup>89</sup> (ver secção 1.2). Frequentemente, são relatados casos clínicos de intoxicações relacionadas com a associação de MDPV a outras substâncias psicoativas, como álcool ou outras substâncias ilícitas<sup>80</sup>.

Estudos em roedores sugeriram que a MDPV produz uma elevada atividade locomotora e estereotípias que são dependentes da concentração plasmática da droga<sup>90-92</sup> (figura 1.15). Foi também sugerido que as estereotípias produzidas pela MDPV são comparáveis aquelas induzidas pela META<sup>91,92</sup>. É relevante realçar que ocorreu substituição de outras drogas pela MDPV, em estudos de auto-administração, onde a catinona revelou ter um potencial aditivo<sup>91,92</sup>. Roedores também exibiram comportamentos de auto-mutilação, como morder, arranhar a própria pele ou *grooming* excessivo.<sup>92,93</sup>



**Figura 1.15** Relação entre as concentrações de MDPV e atividade locomotora/estereotipia. Correlações positivas (valor de  $r$ ) entre as concentrações plasmáticas de MDPV e a proporção de efeitos produzidos (atividade locomotora e estereotipia) (adaptado de Anizan et al.<sup>90</sup>).

Em resumo, os efeitos farmacológicos da MDPV, descritos no homem e em modelos animais, tornam implícita a necessidade de melhor se compreender o seu potencial toxicológico.

## 1.2 O cérebro e a perturbação pela utilização de substâncias

A perturbação pela utilização de substâncias é considerada uma patologia crónica e reincidente, que altera a fisiologia normal dos circuitos neuronais e distorce a visão clássica das necessidades básicas de um indivíduo. A evolução do uso para o abuso de substâncias, elimina os efeitos emocionais prazerosos e o efeito de reforço positivo, surgindo um estado físico e emocional de procura e consumo incontrolados da substância (*drug seeking*) que interfere na capacidade de resistir à sua ausência<sup>94</sup>.

Efetivamente, os padrões comportamentais associados ao abuso de substâncias devem ser lidos à luz das alterações que as drogas de abuso impõem aos circuitos neuronais associados à recompensa, à tomada e execução de decisões, à memória e à aprendizagem.

De todos os sistemas neuronais referidos, a estimulação do sistema de recompensa parece ser o que mais contribui para o desenvolvimento do comportamento associado ao abuso de substâncias. Este sistema resulta da comunicação de diferentes circuitos neuronais e é responsável pela aprendizagem com base em incentivos (prazer), produção de respostas dependentes de um contexto e no desenvolvimento de comportamentos segundo um determinado objetivo. Este sistema resulta da interconexão de várias estruturas cerebrais, nomeadamente: córtex frontal, núcleos da base (incluindo o estriado), amígdala ou hipocampo<sup>95</sup>.

As conexões entre as diferentes estruturas envolvem estímulos glutamatérgicos (excitatórios), GABAérgicos (inibitórios) e dopaminérgicos, sendo que estes últimos desempenham uma importante função reguladora da função estriatal. Assim, a DA é um neuromodelador crucial no sistema de recompensa<sup>89</sup>.

Como anteriormente referido, os psicoestimulantes do tipo anfetamínico e as catinonas partilham, de forma variável, a afinidade pelos sistemas monoaminérgicos, sendo que as drogas com maior poder de adicção (maior reforço) estão associadas a alterações acentuadas nos sistemas dopaminérgicos e, conseqüentemente, à disrupção do sistema de recompensa. A META ilustra um psicoestimulante com elevadas propriedades aditivas, visto que, possui uma grande especificidade pelo sistema dopaminérgico e está associada a importantes alterações da homeostasia da dopamina no estriado<sup>50</sup>. No entanto, o impacto da MDPV no estriado está menos estudado.

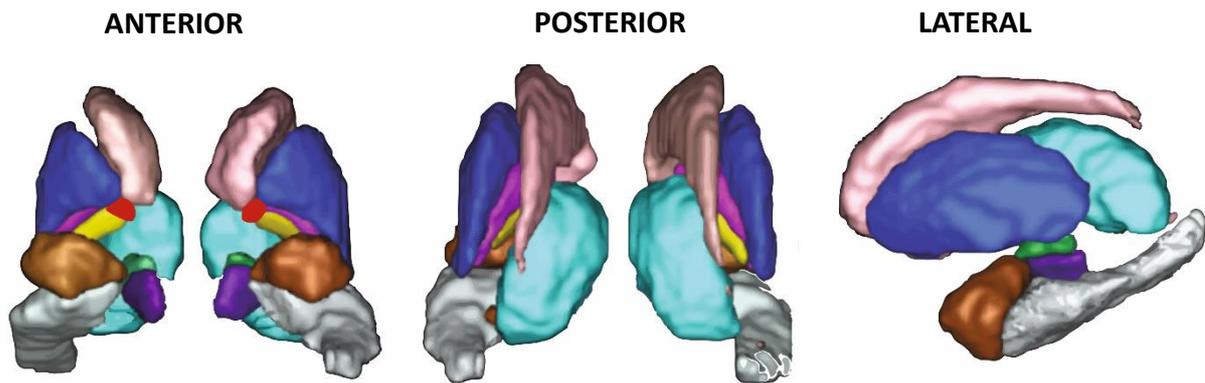
### 1.2.1 Estriado, controlo motor, comportamento, emoções, DA e drogas psicoestimulantes

O estriado é uma estrutura heterogénea dos núcleos da base que concentra a maior parte das projeções nervosas corticais e subcorticais (aférentes), coordenando as projeções eferentes para outros constituintes dos núcleos da base<sup>95</sup>.

Os núcleos da base referem-se a um grupo de núcleos subcorticais responsáveis, em primeiro lugar, pelo controlo motor e, também, pela aprendizagem motora, funções executivas e comportamento e emoções associados aos mecanismos de recompensa (*reward*)<sup>96</sup>.

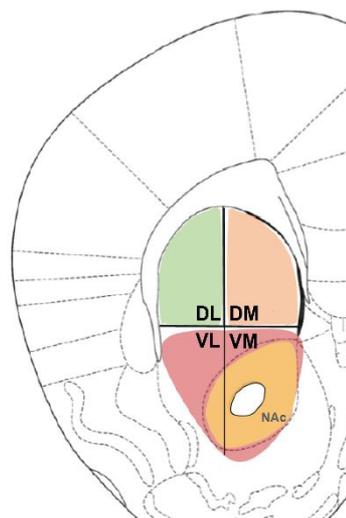
É constituído por 90-95% de neurónios espinhosos de tamanho médio (MSNs, *Medium-sized Spiny Neurons*), caracterizados por uma rede densa de espículas dendríticas, e 5-10% de interneurónios que estabelecem conexão entre as várias partes do estriado. Os MSNs são GABAérgicos e têm uma ação inibitória nos locais alvo; os interneurónios podem ser colinérgicos ou GABAérgicos<sup>96</sup>. O estriado divide-se ainda em dois compartimentos: a matriz, enriquecida em calbindina, e estriossomas, área pobre em calbindina<sup>96</sup>.

O estriado apresenta heterogeneidade funcional e é constituído pelo núcleo caudado, putâmen e núcleo accumbens (NAc). O caudado e o putâmen localizam-se numa posição mais dorsal (superior e prolongada no sentido posterior) do estriado, sendo separados pela cápsula interna; e o NAc é inferior a estas estruturas, sendo considerado numa posição ventral. O globo pálido (interno e externo) (GPi e GPe) e o putâmen constituem o núcleo lentiforme e, se considerarmos o GP e o estriado, este passa a ser denominado de corpo estriado. Na Figura 1.16 estão representadas as estruturas indicadas e outras áreas relevantes no sistema de recompensa, incluindo a amígdala. Em roedores, a cápsula interna não é tão proeminente e é mais inclinada para o caudado, originando uma estrutura aparentemente mais homogénea chamada de caudado-putâmen<sup>97</sup>.



**Figure 1.16 Perspetivas tridimensionais na posição Anterior, Posterior e Lateral do Sistema de recompensa.** As estruturas mais relevantes no sistema de recompensa estão representadas com as seguintes cores: Caudado (rosa claro); Putâmen (azul escuro); NAc (vermelho); Globo Pálido externo e interno (rosa escuro e amarelo); Tálamo (azul claro); Substância Negra (roxo); Núcleo Subtalâmico (verde); Amígdala (castanho); Hipocampo (cinza) (adaptado de Haegelen et al.<sup>305</sup>).

É recorrente representar-se o estriado tendo em conta um eixo dorso-lateral, considerando-se o estriado dividido em quatro quadrantes (Dorso-lateral/medial e Ventro-lateral/medial) com o NAc localizado na porção ventro-medial (figura 1.17). Não existe uma separação citoarquitetónica ou histoquímica que permita identificar claramente as diferentes regiões. Porém, existem algumas particularidades que valem a pena destacar.



**Figura 1.17 Divisão estrutural clássica do estriado em murganho numa posição mais anterior.** Região Dorso-Lateral (verde); região Dorso-Medial (laranja); regiões Vento-Medial/Vento-Lateral (vermelho) com o NAc destacado (amarelo) em torno da comissura anterior.

Por exemplo, saliente-se a maior densidade de DAT na região dorsal, relativamente à região ventral. Por outro lado, a região ventral apresenta uma rede mais densa e empacotada de

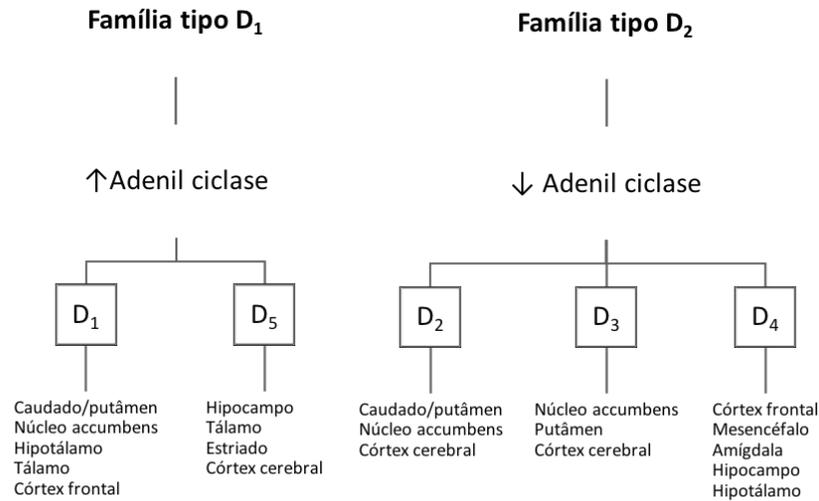
neurónios, havendo uma distribuição mais homogénea na região dorsal. Finalmente, sublinhe-se que existe uma distribuição heterogénea de projeções neuronais para as duas regiões<sup>95</sup>.

As principais projeções glutamatérgicas para o estriado surgem de diversas áreas corticais, do tálamo, da amígdala e do hipocampo, estabelecendo sinapses com as espículas dos MSNs. Os aferentes corticais provêm de áreas límbicas, associativas e motoro-sensoriais, sendo que cada tipo de informação se distribui preferencialmente por zonas específicas do estriado<sup>95,98,99</sup>. As projeções corticais límbicas (p.ex.: córtex pré-frontal ventro-medial) concentram-se maioritariamente na região ventral do estriado, especificamente no NAc, mas também nas regiões ventrais do caudado e putâmen; os aferentes associativos (p.ex.: córtex orbito-frontal, córtex cingulado anterior dorsal) projetam-se essencialmente para a região medial do estriado, acompanhando o caudado e a porção rostral do putâmen; os aferentes motoro-sensoriais (p.ex.: córtex pré-frontal dorsal, neocórtex) concentram-se na região dorsal do estriado, maioritariamente no putâmen. Fibras eferentes da amígdala e do hipocampo (estruturas que constituem também o sistema límbico) projetam-se para a região ventral (NAc) da estrutura e aferentes do tálamo enervam, principalmente, a região dorsal<sup>95,98,99</sup>. A diferente distribuição dos *inputs* nervosos, parece determinar o tipo de funções em que cada quadrante se envolve. Por exemplo, diversos estudos sugerem que o NAc (em particular o *Shell*) está envolvido nos parâmetros motivacionais e emocionais associados aos mecanismos de recompensa; o estriado dorso-lateral tem sido associado a comportamentos regulares, considerados como hábitos; o estriado dorso-medial parece influenciar o comportamento associado a um objetivo específico<sup>95,99-101</sup>. É também relevante destacar o envolvimento dos interneurónios na integração da informação proveniente das diferentes áreas estriatais<sup>95</sup>.

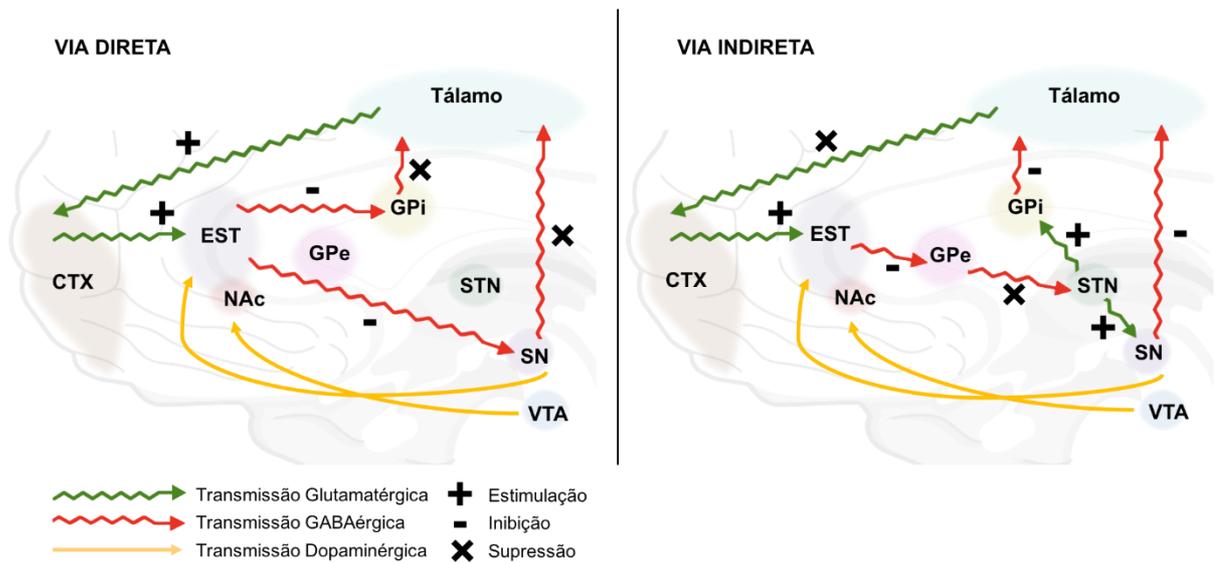
Outro tipo de aferentes que inervam densamente o estriado dorsal e o NAc são as projeções dopaminérgicas do mesencéfalo [substância negra compacta (SNc) e área ventral tegmental (VTA)]: o estriado ventral recebe aferentes especificamente da VTA enquanto que, a SNc projeta para a região ventral e, de forma mais predominantes, para a região dorso-lateral<sup>102</sup>.

Os MSNs estriatais estão organizados em duas vias: direta e indireta. Na via direta, os MSNs (que expressam recetores dopaminérgicos D<sub>1</sub>; figura 1.18) projetam-se para o GPi e para a substância negra reticulada (SNr). Como estas estruturas têm uma função inibitória sobre o tálamo, a inibição do GPi/SNr proporciona a desinibição do tálamo que projeta fibras excitatórias para o córtex motor.<sup>95,101,103,104</sup>

Por outro lado, a via indireta resulta da projeção de MSNs (que expressam recetores dopaminérgicos D<sub>2</sub>; figura 1.18) para o GPe, que tem o controlo inibitório do núcleo subtalâmico (STN). Visto que o STN exerce um controlo excitatório sobre os núcleos GPi/SNr, a via indireta promove a estimulação do STN e a diminuição da estimulação do córtex motor (figura 1.19)<sup>95,101,103,104</sup>.



**Figura 1.18 Subtipos de recetores de DA.** Os recetores de DA dividem-se segundo o tipo D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>) e o tipo D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>). Os primeiros ativam a enzima Adenil ciclase, enquanto que os segundos inibem esta enzima. O diagrama mostra a localização dos diferentes subtipos de recetores de DA por diferentes regiões cerebrais (adaptado de Ares-Santos et al.<sup>306</sup>).



**Figure 1.19 Via direta e indireta do circuito Cortico-Núcleos da base-Talâmico e dos inputs dopaminérgicos nos núcleos da base.** São apresentados os tipos de conexões que se estabelecem entre as diversas estruturas e o efeito produzido (CTX, córtex; EST, estriado; NAc, núcleo accumbens; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; STN, núcleo subtalâmico; SN, substância negra; VTA, área ventral tegmental).

A DA funciona como um regulador deste sistema de comunicação, exercendo um papel determinante no controlo do movimento. A DA ativa a via direta pela sua ligação aos recetores D<sub>1</sub> e inibe a via indireta pela ligação aos recetores D<sub>2</sub><sup>103,105</sup>. Assim, o controlo motor resulta de um equilíbrio entre estas duas vias. A disrupção do sistema dopaminérgico está associada a doenças do movimento, como por exemplo, a Doença de Parkinson<sup>96</sup>.

Por outro lado, o uso de drogas ATS (tais como a META) está associado a perturbações da atividade nos núcleos da base (incluindo o estriado), inerentes a uma estimulação aberrante da transmissão dopaminérgica<sup>89,106</sup>. Psicoestimulantes clássicos, como a META ou a cocaína estimulam processos de plasticidade sináptica que envolvem alterações ao nível das dendrites e das suas espículas no NAc e na região dorsal do estriado<sup>107,108</sup>. Em suma, o estriado parece ser uma região cerebral fortemente afetada por drogas de abuso psicoestimulantes<sup>109,110</sup>.

### 1.3 Sistema Imunitário Inato

O sistema imunitário (SI) é um mecanismo fundamental em qualquer organismo, com a função fisiológica de o defender da maioria das agressões exógenas, orquestrando uma resposta imunológica. Estas agressões podem consistir em microrganismos potencialmente patogénicos (vírus, bactérias, fungos, protozoários, vermes) ou substâncias estranhas, denominadas por agentes patogénicos<sup>111</sup>.

Delves e Roitt (2000)<sup>111</sup>, estabelecem três linhas de defesa contra agentes infecciosos. A primeira linha consiste nas barreiras físico/químicas que tentam impedir o agente agressor de entrar no organismo hospedeiro. Estas barreiras incluem a pele, os epitélios, secreções e enzimas com propriedade anti-microbianas. Quando os agentes infecciosos ultrapassam a primeira barreira, encontram dois outros níveis de defesa: o SI Inato e o SI Adaptativo.

Estas duas vertentes do SI diferenciam-se pelas suas entidades constituintes, pelo tempo e especificidade de reação ou até pela capacidade de estabelecer memória imunológica. No Esquema 1 pode observar-se algumas das principais características de ambos.



**Esquema 1** Características principais da Imunidade Inata e Adaptativa.

O SI, como tal o conhecemos, terá resultado de um processo evolutivo devido à pressão imposta pelos patógenos<sup>111</sup>. A imunidade inata definiu-se nos primeiros seres multicelulares. A

sua relevância é traduzida no facto de que a maioria dos organismos sobrevivem com este tipo de imunidade. Com o aumento da diversidade dos agentes patógenos e pelo aumento da complexidade dos organismos, o SI Adaptativo apenas surgiu posteriormente com os vertebrados mandibulares<sup>112</sup>. Este trabalho focar-se-á na imunidade inata.

O SI Inato providencia uma defesa imediata que previne, controla ou elimina uma infeção causada por um agente infeccioso<sup>113</sup>. A resposta inata é ativada quando os agressores conseguem superar as barreiras físico/químicas do organismo. Consequentemente, vários mecanismos e entidades são acionados, tipicamente dentro de minutos. Os agentes patógenos são detetados por células do sistema inato dotadas de recetores intra e extracelulares que reconhecem padrões moleculares exclusivos a microrganismos infecciosos. Esta capacidade aciona um amplo espectro de células e mecanismos que iniciam múltiplas vias de ação.

Nos seguintes tópicos, vão ser abordados os intervenientes e mecanismos que permitem ao SI Inato identificar os agentes patógenos.

### 1.3.1 Componentes celulares e moleculares da Imunidade Inata

A imunidade inata é responsável por orquestrar diversas entidades (células e moléculas) para montar uma resposta inflamatória contra um agressor.

As componentes celulares do SI inato identificam e eliminam os patógenos e promovem a amplificação do sinal, através de uma resposta coordenada e multidirecional. A maior parte destas células são leucócitos (monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos), mas também incluem as células dendríticas.

Os macrófagos e neutrófilos são as principais células fagocitárias do SI inato e reconhecem diferentes patógenos. Os neutrófilos são os leucócitos circulantes mais abundantes e os macrófagos (que resultam da diapedese dos monócitos) estão presentes em vários tecidos. Os macrófagos funcionam também como células secretoras de citocinas e quimiocinas e como células apresentadoras de antígenos (*Antigen-Presenting Cells*, APC's)<sup>114-116</sup>.

As células dendríticas estão localizadas nos tecidos periféricos na forma imatura. Nesta fase estas células apresentam grande capacidade fagocitária, no entanto, na presença de inflamação elas amadurecem e migram para os gânglios linfáticos, onde exercem a sua principal função de APC's<sup>115-117</sup>.

Paralelamente aos fagócitos, existem as células *Natural Killer* que identificam e eliminam células com o MHC-I (*Major Histocompatibility Complex class I*) alterado recorrendo a mecanismos alternativos à fagocitose<sup>116,118</sup>.

Adicionalmente aos neutrófilos, também contribuem para o sistema inato outros granulócitos como os eosinófilos, basófilos e os mastócitos. Estes estão envolvidos em respostas alérgicas ou contra agentes que não podem ser internalizados pelos fagócitos, libertando grânulos que criam um ambiente extracelular hostil aos agressores<sup>119,120</sup>.

Complementarmente às células anteriores, o SI inato compreende um conjunto de substâncias que funcionam como um complexo multiprotéico para facilitar a eliminação de agentes patogénicos, o sistema complemento.

Os vários tipos de células e o sistema complemento alicerçam a resposta imune inata na maioria dos tecidos, podendo por vezes os mecanismos adotados causarem danos ou disfunção no local de ação. O SNC é sensível e tem baixa capacidade de regeneração, possuindo um sistema imunitário exclusivo<sup>121</sup>.

As microglias constituem o sistema imune propriamente dito no SNC e partilham muitas características imunológicas com os macrófagos periféricos. Estas células focam-se na proteção do SNC através da identificação/eliminação de agentes agressores e da mediação da inflamação. Os neurónios e os astrócitos comunicam com a microglia, tendo também um papel ativo na defesa do SNC<sup>121</sup>.

Todo este arsenal de entidades, funcionam de forma coesa e organizada, permitindo o desenrolar de uma resposta inflamatória capaz de combater a agressão e conduzir, de novo, o sistema à homeostasia. Contudo, a eficiência deste sistema depende da sua capacidade de distinguir o que constitui, ou não, perigo para o organismo. Para tal, todos estes constituintes do SI expressam recetores que identificam a presença de microrganismos ou de agentes endógenos/exógenos que põem em causa a integridade do sistema.

### 1.3.2 Reconhecimento de patógenos pelo SI Inato

Como apresentado anteriormente, todos os elementos do Sistema Inato têm de conseguir reconhecer o que poderá constituir uma agressão ao organismo para que se origine o alerta. Este primeiro sinal é determinante para que se despolete a resposta inflamatória com o objetivo de retornar à homeostasia.

No caso de microrganismos (vírus, bactérias, fungos, protozoários), a estratégia de reconhecimento consiste na deteção de *Pathogen-associated Molecular Patterns*, PAMPs, padrões moleculares exclusivos a estes organismos, não presentes em células do organismo agredido. Estes padrões são os principais alvos do SI Inato por constituírem, muitas vezes, estruturas vitais aos microrganismos, não tendo sofrido alterações com a evolução destes. Para

além de substâncias exógenas como os PAMPs, o SI Inato também reage contra células em morte celular ou danificadas do próprio organismo, detetando produtos metabólicos anormais, os *Damage-associated Molecular Patterns*, DAMPs. Os xenobióticos (medicamentos, toxinas ou poluentes) também podem ativar indiretamente o SI inato pela libertação de DAMPs por células afetadas por estes agentes químicos<sup>122</sup>. Recentemente, foi proposto que metabolitos de drogas de abuso, como a morfina e o etanol, podem funcionar como *Xenobiotic-associated molecular patterns* (XAMPs).

O reconhecimento destes padrões é do encargo de recetores celulares designados por *Pattern Recognition Receptors* (PPR's) e por moléculas solúveis. Estes recetores podem ser expressos na membrana, no citoplasma ou armazenados em lisossomas/endossomas. Alguns recetores são libertados e são solúveis. Este facto permite que os PAMPs sejam detetados dentro e fora das células. Adicionalmente, os recetores solúveis possibilitem uma maior área de ação, estando presentes no espaço intersticial, no sangue e em secreções nas mucosas<sup>116,123</sup>. Genericamente, a estas moléculas está inerente diversidade estrutural e funcional, relacionada com as suas estruturas multiméricas e com a afinidade a diferentes ligandos. Estas características determinam a resposta rápida, eficiente e multidirecional da resposta imune inata.

O trabalho conjunto destas moléculas, PRRs e compostos solúveis, viabiliza o discernimento do próprio/não próprio pelo SI Inato, precavendo o ataque imunológico a células do próprio organismo. A maioria das células do SI Inato expressam PRRs, no entanto, estes podem também estar presentes em células frequentemente expostas a patógenos (pele, mucosas, endotélio, neurónios). Curiosamente, as células não expressam todos os PRRs individualmente, estando os variados subtipos de recetores presentes em diferentes populações celulares.<sup>123</sup>

Resumidamente, estes distinguem-se estruturalmente, na sua localização, no tipo de padrões moleculares que reconhecem e na sinalização celular que originam. Apresentam-se, de seguida, as 5 principais classes de PRRs (figura 1.20):

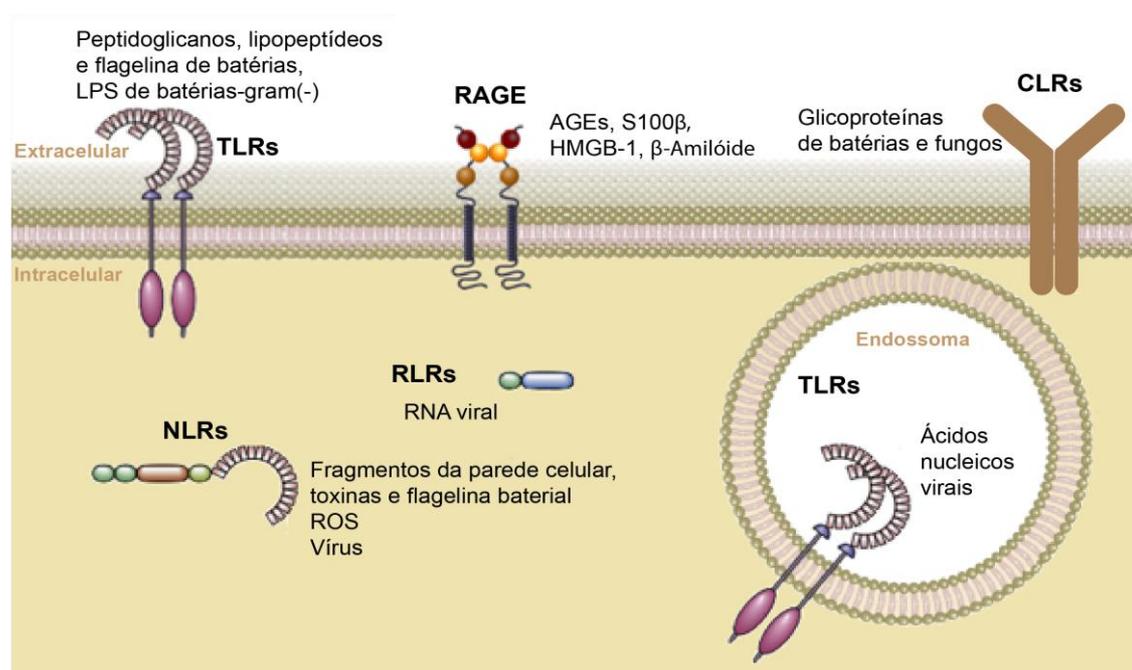
→ *Toll-like Receptors* (TLRs) São proteínas transmembranares localizadas nas membranas plasmáticas e endossomais de vários tipos de células (macrófagos, células dendríticas, células endoteliais). Os PAMPs que lhes estão associados são peptidoglicanos (parede celular) ou Lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram(-) e ácidos nucleicos virais.

→ RAGE (Recetores dos produtos de glicação avançada) Proteínas membranares ou solúveis, expressas em vários tipos de células e associadas ao reconhecimento de PAMPs e DAMPs.

→ *C-type Lectin-like Receptor* (CLRs) São recetores da membrana plasmática em fagócitos, células dendríticas e noutras células, que reagem na presença de hidratos de carbono, com terminações de manose ou frutose, da superfície microbiana e glucanos constituintes da parede celular de fungos.

→ *NOD-like Receptors* (NLRs) Proteínas presentes no citoplasma das células (fagocitárias, células dendríticas, células de Paneth no intestino). Detetam peptidoglicanos, ácido úrico.

→ *RIG-like Receptors* (RLRs) Proteínas citoplasmáticas, presentes em fagócitos e noutras células, que detetam a presença de RNA viral.



**Figura 1.20** Classes de PRRs e os respetivos PAMPs e DAMPs.

O presente estudo vai focar-se nos recetores RAGE, visto que, o Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental tem estudado este PRR no contexto de doenças do SNC que envolvem os núcleos da base (Doença de Parkinson)<sup>124</sup>.

### 1.3.3 Recetores dos produtos de glicação avançada (RAGE)

Os recetores RAGE foram inicialmente identificados pela sua interação com produtos resultantes da glicação e oxidação de proteínas e lípidos, os AGE's (*Advanced Glycation End products*). Estes produtos foram intensamente descritos nos anos 90 pelo seu aparente envolvimento aparente nas complicações da *Diabetes mellitus*<sup>125,126</sup>. Tendo sido estes os primeiros ligandos a serem associados ao recetor em questão, este foi denominado de RAGE,

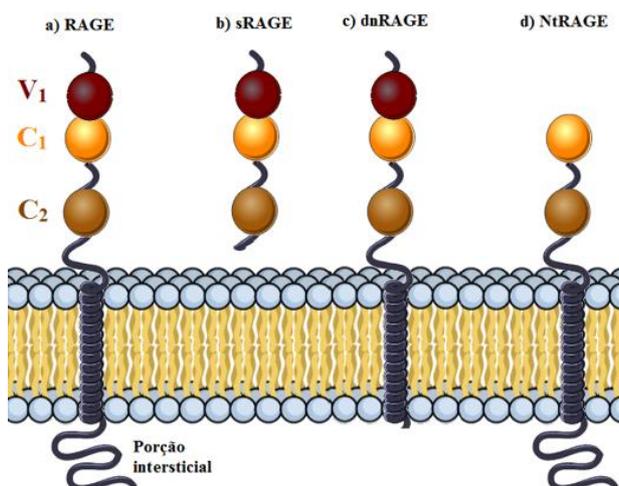
*Receptor for Advanced Glycation End products*<sup>127,128</sup>. Hoje, há uma intensa atividade científica sobre o papel do RAGE nos mecanismos neurodegenerativos e nas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, a polineuropatia amiloide familiar, a neuropatia diabética, a doença de Parkinson e a doença de Huntington<sup>129</sup>.

Para além desta classe de ligandos, o RAGE apresenta uma panóplia de ligandos onde se incluem: as proteínas da família S100 (S100 $\beta$ , S100A4/8/9/12) com duas estruturas mãos EF que ligam a Ca<sup>2+</sup><sup>130,131</sup>; HMGB-1, uma anfoterina que regula processos no DNA e que também se encontra no meio extracelular<sup>132</sup>; fibras amiloides com estrutura em folha- $\beta$ , como a  $\beta$ -amilóide<sup>133</sup>. O RAGE difere dos outros PPRs pela sua interação seletiva com moléculas que sugerem danos em células do organismo (DAMPs). No entanto, tal como outros PRRs, o RAGE localiza-se no locus MHC III (possui um papel importante na imunidade)<sup>134</sup>.

Estruturalmente, o recetor RAGE existe em várias isoformas. A sua estrutura principal, pela qual foi descoberto, denomina-se por *full-length* RAGE ou, simplesmente RAGE (figura 1.21 (a)), sendo constituído por três domínios. O domínio extracelular vincula o RAGE à superfamília das imunoglobulinas, pelas suas semelhanças estruturais: este domínio é constituído por um domínio variável (domínio-V) e dois domínios constantes (domínio-C1 e domínio C2), cada um com uma estrutura em sandwich de duas folhas- $\beta$  com cadeias anti-paralelas<sup>135,136</sup>. A porção transmembranar, uma simples hélice- $\alpha$ , conecta o domínio anterior com a região citoplasmática com uma sequência negativamente carregada (terminal-COOH)<sup>127</sup>.

As outras isoformas mais comuns, são as seguintes: sRAGE (RAGE solúvel ou secretado) (figura 1.21 (b)), apenas tem o domínio extracelular (V, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>)<sup>137</sup>; dnRAGE (*dominant-negative* RAGE) (figura 1.21 (c)), que não possui a cauda intracelular<sup>138,139</sup>; NtRAGE (*N-truncated* RAGE) (figura 1.21 (d)), não apresenta o domínio V e, por isso, não é capaz de se ligar a AGEs<sup>140,141</sup>. Adicionalmente, existem isoformas que resultam de polimorfismos ou variações das estruturas anteriores, o que aumenta a complexidade da fisiologia do RAGE<sup>141</sup>. O mecanismo pelo qual estas isoformas são geradas não está completamente esclarecido, sendo que o mecanismo mais descrito pela literatura resulta da seleção alternativa de exões e intrões no pré-mRNA do RAGE – *Splicing* Alternativo, gerando assim diferentes mRNAs a partir do mesmo gene. Contudo, também tem sido sugerida a formação do sRAGE por proteólise do ectodomínio do RAGE (cRAGE), tanto em ratinho, como em humano<sup>142-144</sup>.

A literatura sugere a importância da compreensão dos mecanismos de regulação e as funções específicas destas variantes, para se perceber melhor a sua importância nos mecanismos fisiopatológicos.



**Figura 1.21 Estrutura do recetor RAGE.** O RAGE é expresso em múltiplas isoformas como são exemplo o recetor membranar de *full-length* (a), o recetor solúvel (b), a forma dominante-negativa (c) e a forma truncada (d).

Similarmente a outros PRRs, existem evidências de que o RAGE depende da oligomerização (que pode incluir homodímeros e tetrâmeros de RAGE ou heterodímeros RAGE:sRAGE) para a sua ligação eficaz com os vários ligandos<sup>145-153</sup>. Esta diversidade de oligomerização do RAGE parece refletir-se na grande variedade estrutural que os seus ligandos apresentam.

As isoformas do RAGE foram identificadas em vários tecidos, incluindo no cérebro<sup>141,154</sup>, e em inúmeras células do SI: microglia, astrócitos, monócitos e macrófagos, células dendríticas, linfócitos T<sup>127,155-158</sup>.

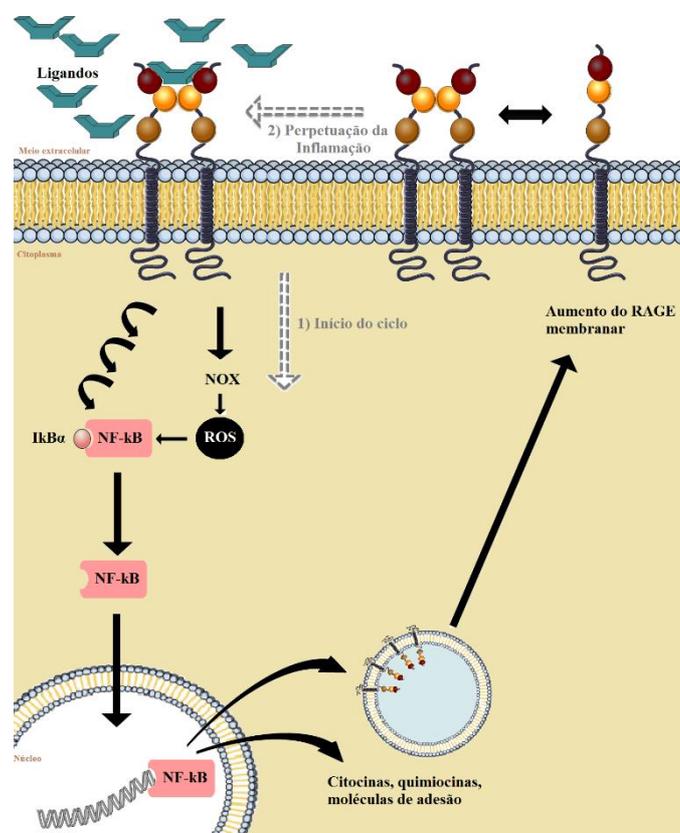
Tipicamente, o recetor é expresso em valores basais em diferentes tipos de células<sup>127,159</sup>. Em condições fisiológicas normais o RAGE revela-se neuroprotetor<sup>160</sup>, contribuindo para a ativação e migração da microglia<sup>161,162</sup> ou para o crescimento e diferenciação neuronal (figura 1.23)<sup>132,163-165</sup>. À periferia, RAGE é importante para a ativação, maturação e diferenciação de células dendríticas, linfócitos T e monócitos/macrófagos<sup>166-168</sup>.

No entanto, a sua sobre-expressão foi identificada em condições patológicas associadas a inflamação crónica como, por exemplo: Alzheimer<sup>169</sup>, Huntington<sup>170</sup>, Esclerose lateral amiotrófica<sup>171</sup>, doenças inflamatórias renais<sup>172</sup> Diabetes *mellitus*<sup>173,174</sup> ou Artrite reumatoide<sup>175</sup>.

A via de sinalização gatilhada pelo RAGE mais proeminente é a via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), sendo este o principal fator de transcrição de genes pró-inflamatórios (figura 1.22)<sup>151,176</sup>. A ativação do RAGE por qualquer um dos seus ligandos em praticamente todas as células (células endoteliais, macrófagos, células dendríticas, neurónios), desencadeia a fosforilação e degradação da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , seguida da translocação do fator de transcrição

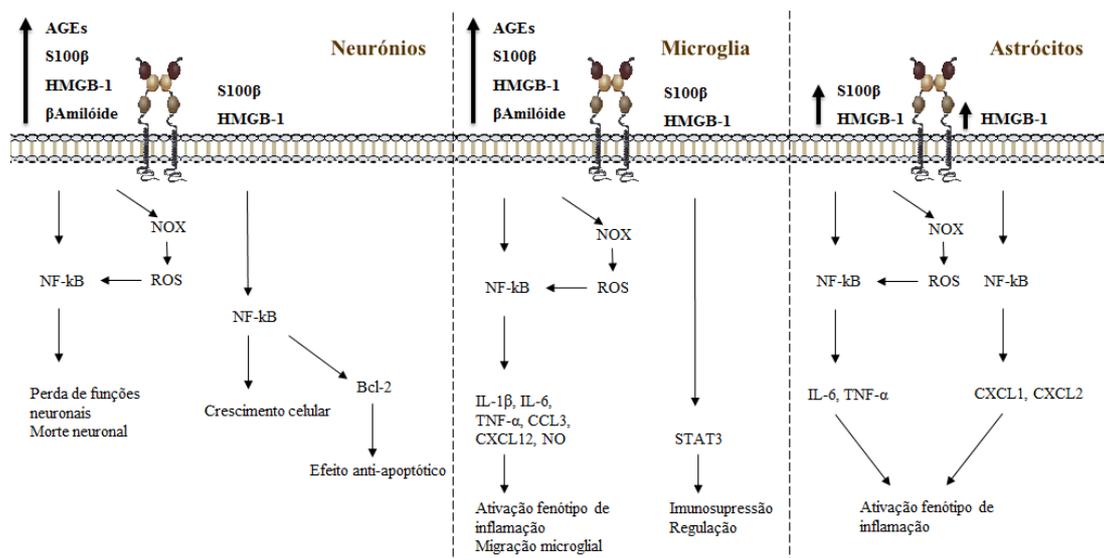
nuclear NF- $\kappa$ B para o núcleo<sup>167,177</sup>. Este fator está interligado com a transcrição de citocinas, moléculas de adesão, moléculas anti-apoptóticas. Esta cascata funciona como um feedback positivo ao estímulo inicial, favorecendo a transferência do recetor RAGE de vesículas intracelulares para a membrana extracelular. Esta situação favorece a formação de pré-oligómeros e, conseqüentemente, a maior ativação da via NF- $\kappa$ B com a interação RAGE-ligandos. Por outro lado, o fator de transcrição NF- $\kappa$ B também regula a transcrição do gene que codifica RAGE, contribuindo para o ciclo de perpetuação de transcrição/ativação do recetor<sup>178</sup>. Assim, os produtos pró-inflamatórios secretados incrementam a atividade inflamatória da microglia e dos astrócitos. Em conjunto, estes mecanismos manifestam um estado crónico de inflamação descrito em toda a bibliografia de patologias associadas ao recetor, como exposto anteriormente<sup>129,151,179,180</sup>.

O stress oxidativo também contribui para a perpetuação deste ciclo, tanto pela ativação direta da oxidase NADPH (NOX) através do RAGE, ou pela geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) com a elevada concentração de ligandos no meio (AGEs,  $\beta$ -amilóides, S100 $\beta$  e HMGB-1) (figura 1.22)<sup>181,182</sup>.



**Figura 1.22** Cascata de sinalização do RAGE por ativação do NF- $\kappa$ B. Este mecanismo é responsável pela perpetua sinalização do RAGE em patologias associadas a inflamação crónica.

A resposta celular associada à ativação do RAGE não segue um padrão específico, dependendo de muitos fatores, tipo e concentração do ligando, tipo de células, concentração do RAGE, presença de isoformas ou de moléculas adaptadoras. A Figura 1.23 ilustra algumas das funções/ações do RAGE em células do SNC: neurónios, microglia e astrócitos. Destaque-se a interação S100 $\beta$ -RAGE.



**Figura 1.23** Vias de sinalização mediadas pelo RAGE nos neurónios, microglia e astrócitos.

O S100 $\beta$  é um ligando que é constitutivamente expresso nos astrócitos e é um agente autócrino e parácrino. Esta molécula estimula a secreção de citocinas [factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-6]<sup>183,184</sup> via NF- $\kappa$ B, sendo um ativador da inflamação nos astrócitos<sup>185,186</sup>. Na microglia, elevadas concentrações de S100 $\beta$  também ativam a via NF- $\kappa$ B induzindo a migração e ativação microglial com o aumento da expressão de quimiocinas (CCL3, CXCL12), citocinas pró-inflamatórias (interleucinas e TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO)<sup>130,162,187-189</sup>. Por outro lado, o S100 $\beta$  pode exercer uma função de imunossupressão a baixas concentrações (através do RAGE), favorecendo um mecanismo de regulação da ativação da microglia<sup>190,191</sup>. Relativamente aos neurónios, a presença de S100 $\beta$  em concentrações fisiológicas promove a expressão do factor anti-apoptótico Bcl-2 e promove o crescimento axonal<sup>192,193</sup>. No entanto, em elevadas concentrações, o S100 $\beta$  induz stress oxidativo e disfunção neuronal<sup>194</sup>.

A sinalização do RAGE é dependente de moléculas adaptadoras, tais como a molécula Diaphanous-1, requerida para o desenrolar de cascatas de migração celular, e o conjunto

TYRAP-MYD88 que é partilhado com os TLRs<sup>195,196</sup>. Estas duas classes de PRRs, para além de partilharem moléculas adaptadoras, também partilham ligandos podendo operar de forma concertada, promovendo a amplificação de efeitos<sup>197,198</sup>.

Finalmente, é relevante referir que as diferentes isoformas do RAGE condicionam as suas respostas biológicas. As isoformas ntRAGE, dnRAGE e sRAGE funcionam como reguladores da atividade do RAGE, diminuindo a sua ativação. Os sRAGE e dnRAGE têm a mesma afinidade do que o RAGE para os seus ligandos e funcionam como recetores *decoy*, diminuindo a concentração de ligando disponível para ativar o RAGE<sup>140,164,199–202</sup>. Certos autores propõem ainda a oligomerização das isoformas truncadas com o RAGE, impedindo de forma direta o desenrolar das cascatas de sinalização<sup>149,203</sup>. Em suma, estas isoformas truncadas podem ser consideradas formas antagonistas do RAGE, prevenindo a sua sobre-expressão e conseqüente sinalização deletéria.

### 1.3.4 Neuroinflamação e Psicoestimulantes

O SNC possui duas barreiras que restringem a circulação livre de substâncias e células para o parênquima do cérebro. A BHE é constituída por uma camada de células endoteliais especializadas, sem fenestrações e interligadas com *tight-junctions*, sendo uma barreira extremamente seletiva. Por sua vez, a Barreira Sangue-Líquido cefalorraquidiano consiste num epitélio com microvilosidades no plexo coróide que produz o líquido cefalorraquidiano e o separa do sangue. Assim, em condições normais, o cérebro é protegido do conteúdo plasmático e das células imunitárias circulantes e dos seus mediadores, de forma a manter os equilíbrios químicos e iónicos deste microambiente<sup>204</sup>.

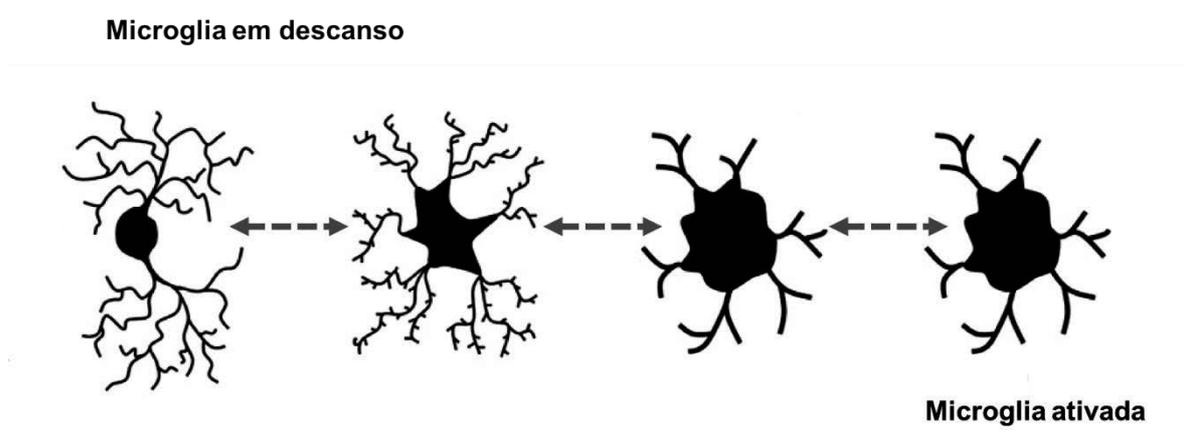
Apesar desta separação física, as células imunitárias periféricas desempenham um papel determinante na imunovigilância do SNC, permanecendo em locais ou compartimentos exteriores ao parênquima. Em condições fisiológicas normais, o fluído cefalorraquidiano contém em circulação leucócitos, que passam da corrente sanguínea para o ventrículo através do endotélio do plexo coróide, sendo depois possível a sua circulação pelo espaço subaracnóide<sup>205,206</sup>. Os linfócitos T constituem a maior parte destes leucócitos<sup>207,208</sup> e, adicionalmente, existem regiões cerebrais onde se podem encontrar subpopulações de macrófagos com diferentes fenótipos<sup>209</sup>. No entanto, alguns autores sugerem que são monócitos circulantes que se expressam de acordo com o microambiente do local<sup>210,211</sup>.

As microglias são as responsáveis pela patrulha do parênquima cerebral. Estas são as únicas células de origem mielóide presentes no cérebro, partilhando inúmeras características com os

macrófagos circulantes. Também, os astrócitos desempenham um papel determinante na modelação da inflamação com a produção de produtos pró- e anti-inflamatórios. Ambos os tipos de glias são dotados de heterogeneidade funcional e estrutural, e a resposta inflamatória induzida depende do tipo, severidade e duração da agressão<sup>212-214</sup>.

Assim, o SNC encontra-se num contínuo estado de vigilância para detetar e eliminar potenciais mediadores de inflamação, com o objetivo de manter a homeostasia e o normal funcionamento neuronal<sup>215,216</sup>. Este equilíbrio pode ser perturbado por diversos fatores, incluindo neurotoxinas, infeções, lesões cerebrais e morte neuronal, que podem ativar a microglia, uma das respostas iniciais às perturbações do SNC<sup>217</sup>.

A microgliose consiste em alterações morfológicas das microglias e na ativação do seu imunofenótipo. Morfológicamente, as microglias adquirem processos celulares mais intensos e diminuição dos prolongamentos. Caso desenvolvam a sua capacidade fagocitária, passam a ter uma forma esférica/ameboide, semelhante à dos macrófagos (figura 1.24)<sup>212,218</sup>. Por exemplo, a presença de interferão IFN- $\gamma$  no parênquima induz o fenótipo de fagocítico das microglias, sendo que estas e os astrócitos têm a capacidade de amplificar este mecanismo<sup>218,219</sup>. Genericamente, a microgliose pode ser desencadeada pela deteção de PAMPs [LPS, Tat (proteína nuclear do VIH (Vírus da Imunodeficiência humana)), DAMPs (S100 $\beta$ , placas amiloides, HMGB-1) ou citocinas e mediadores provenientes de células do SNC ou do exterior.<sup>220</sup> As microglias são induzidas a expressar mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-12), quimiocinas, proteases, ROS e marcadores superficiais específicos<sup>213,221,222</sup>.



**Figure 1.24** Evolução da morfologia da microglia desde o estado de repouso até ao estado ativado.

Posteriormente, também os astrócitos participam na reação imunitária, sofrendo alterações estruturais e funcionais (astrogliose). Tal como as microglias, os astrócitos libertam mediadores

pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6). Embora os astrócitos também expressem PRRs, a sua ativação decorre maioritariamente das citocinas presentes no meio (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ )<sup>223,224</sup>. Sendo que a microgliose precede a astrogliose, as microglias têm uma influência colossal na ativação dos astrócitos<sup>215</sup>. No entanto, também os astrócitos estão envolvidos em importantes processos fisiológicos da microglia<sup>225</sup>.

Em condições patológicas normais, este alvoroço de mediadores pró-inflamatórios pode atrair as células imunitárias circulantes, alterações estruturais da BHE e a sua consequente infiltração para o parênquima. A microglia, mas principalmente os astrócitos, são conhecidos pela sua íntima comunicação com a lâmina basal das células endoteliais, com um grande número de prolongamentos cobrindo estas células (astrócitos perivasculares)<sup>226</sup>. Assim, os astrócitos influenciam diretamente as propriedades de permeabilidade da BHE interferindo nas *tight junctions* do endotélio<sup>227,228</sup>, na expressão e polarização de transportadores, como a glicoproteína-P (P-gp)<sup>229</sup>, expressão de recetores de angiotensina (AT<sub>1</sub>)<sup>228</sup> ou na atividade de diversas enzimas<sup>227,230</sup>. A produção de mediadores como prostaglandinas, leucotrienos ou bradicinina por diversas células, também contribui para a modelação da permeabilidade da barreira.<sup>226,231</sup> Em situação de agressão ao cérebro, estes mecanismos são alterados e favorecem o enfraquecimento da BHE, diminuindo a seletividade do transporte através da barreira (paracelular ou transendotelial).<sup>232-234</sup> Paralelamente, citocinas pró- (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ) influenciam a expressão de quimiocinas (MIP-1/ $\beta$ , RANTES)<sup>235</sup> e de moléculas de adesão endotelial (VCAM-1, ICAM-1) pela barreira endotelial<sup>236-238</sup>. Por sua vez, a BHE exerce também influência no comportamento das células do SNC.<sup>239,240</sup>

Consecutivamente à perturbação das propriedades BHE, há a difusão destas moléculas pró-inflamatórias para a periferia, promovendo o recrutamento direcional de leucócitos circulantes<sup>205,241,242</sup>.

No parênquima, as células residentes, concertadas com as células infiltradas, orquestram um conjunto de eventos com o objetivo de eliminar a agressão. O ambiente enriquecido em IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , produzidos praticamente por todas as células, promovem a ativação clássica das células fagocitárias com o aumento da capacidade fagocitária, a produção de NO, ROS e de citocinas e mediadores pró-inflamatórias<sup>213,218</sup>. Todos estes agentes representam risco tóxico/citotóxico a diferentes níveis: desmielinização dos axónios<sup>221,243</sup> e morte de oligodendrócitos<sup>244</sup>, destruição da matriz extracelular pela ativação de metaloproteases da

matriz<sup>245</sup> ou a promoção de stress oxidativo. Este ambiente inflamatório é exacerbado pelo aumento de DAMPs<sup>231</sup>.

Apesar da neuroinflamação ser benéfica em diversas situações, promovendo a neuroprotecção e a homeostasia, por vezes ocorrem falhas nos mecanismos de resolução e/ou reparação o que torna este processo nefasto para o cérebro. Várias são as perturbações cerebrais que estão relacionadas com a inflamação e/ou a disrupção da BHE, podendo ser desencadeadas por estímulos externos, como no caso do abuso crónico de psicoestimulantes<sup>246</sup>, ou por um acidente vascular cerebral<sup>231</sup>. Processos inflamatório crónicos podem contribuir para a evolução de doenças neurodegenerativas, como a Esclerose Múltipla, a Esclerose Lateral Amiotrófica, a doença de Alzheimer ou Parkinson<sup>226,247-249</sup>.

A gliose é um processo que pode ser desencadeado quer pelo uso esporádico, como pelo uso crónico de uma substância, sendo um marcador de neurotoxicidade<sup>51</sup>. Estudos em modelos animais demonstram que doses únicas de META ou regimes de quatro administrações (2h/2h), produziram microgliose<sup>41,51</sup>. A astrogliose parece seguir-se à microgliose, permanecendo até 30 dias após o regime de doses repetidas<sup>250</sup>. Apesar disto, a microgliose parece exercer uma maior contribuição para a neurotoxicidade induzida pela META do que a astrogliose, uma vez que é dependente da dose utilizada e do tempo após a exposição. A microgliose parece coincidir com a evolução das alterações no sistema dopaminérgico<sup>51,250</sup>.

Alguns dos fatores que podem contribuir para a neuroinflamação induzida por psicoestimulantes, como a META e a cocaína, são os seguintes: o aumento da forma oxidada da DA (DAQs) que funciona como ativador da microglia<sup>251</sup>; desequilíbrio nos estímulos inibitórios e excitatórios também são responsáveis pela promoção da gliose<sup>252</sup>; nos astrócitos os processos metabólicos são comprometidos por alteração do sistema glutamatérgico<sup>253</sup>; ativação de recetores inflamatórios na microglia (SIGMA1R)<sup>254</sup>; META induz hipertermia<sup>51</sup> e a produção de produtos de glicação<sup>255</sup> que são desencadeadores de microgliose.

Todos estes mecanismos vão favorecer fenótipos inflamatórios na microglia e nos astrócitos, contribuindo para a ativação de vias de sinalização inflamatórias. O ambiente passa a caracterizar-se pela elevada presença de citocinas pró-inflamatórias e pela eliminação de produtos ou restos celulares pela microglia<sup>256</sup>.

Uma das consequências do consumo de drogas de abuso, é a disrupção da BHE: alteração de expressão de peptidases envolvidas na *tight junctions*, aumentando a expressão de moléculas de adesão endotelial ou pelo aumento de fatores inflamatórios<sup>257</sup>. Este mecanismo leva ao aumento da permeabilidade da barreira e da vulnerabilidade do cérebro a fatores tóxicos periféricos, favorecendo a entrada de bactérias e vírus no sistema central. Um exemplo que

retrata esta situação é o aumento da mortalidade da infecção por VIH em pacientes que consomem drogas, sendo que adicionalmente estes pacientes expõem-se a muitos fatores de risco (partilha de seringas, relações sexuais não protegidas)<sup>257,258</sup>.

A longo prazo, o uso crónico de substâncias promove a perpetuação da inflamação que passa a desempenhar uma ação deletéria, ao invés de uma ação compensatória gatilhada pelos estímulos neurotóxicos<sup>254</sup>. Esta condição promove o aparecimento de alterações neurodegenerativas de longa duração que contribuem para perturbações progressivas nas áreas motoras, cognitivas e comportamentos dos indivíduos.

Assim, o abuso de drogas está associado a processos neurotóxicos irreversíveis que contribuem para complicações neuropsiquiátricas presentes, durante e após, a exposição às drogas. No entanto, dependentes em abstinência mostraram a recuperação, pelo menos parcialmente, dos transportadores dopaminérgicos<sup>259</sup>.

Para finalizar, é importante referir algumas terapias anti-adicção que se encontram a ser exploradas com base em mecanismos imunológicos. Um dos exemplos é o desenvolvimento de vacinas que impedem a entrada da droga no SNC, pela ligação de anticorpos à molécula, e estratégias anti-inflamatórias que visem atuar a vários níveis dos processos neuroinflamatórios<sup>260</sup>.

## 1.4 Objetivos

A presente dissertação pretende elaborar uma caracterização comparativa, entre a META e o MDPV, relativamente aos seus impactos no comportamento, na neurotoxicidade e no eixo-S100 $\beta$ -RAGE, 24 horas após um regime de administração neurotóxico.

Para tal, foram traçados diferentes patamares de tarefas:

1º Tarefa → Avaliar a condição emocional dos murganhos, relativamente a comportamentos relacionados com a depressão e ansiedade;

2º Tarefa → Averiguar a condição locomotora e exploratória dos animais;

3º Tarefa → Caracterizar marcadores clássicos de toxicidade dopaminérgica e a integridade da mielina;

4º Tarefa → Caracterizar o estado de gliose induzido;

5º Tarefa → Avaliar o impacto destas toxinas nos RAGE e S100 $\beta$ .



# ***Capítulo II***

*Materiais e Métodos*



## **2 Materiais e Métodos**

Neste capítulo é apresentada toda a informação relativa à construção e execução deste trabalho. As informações relativamente ao modelo animal, às drogas e ao planeamento experimental encontram-se aqui descritas, seguidas dos procedimentos e protocolos adotados para cumprir os objetivos traçados.

## 2.1 Modelo Animal e Fármacos

Para a realização prática deste projeto, o modelo animal utilizado foi o murgancho C57BL/6J do sexo masculino, com 10 semanas de idade e peso situado entre 21–27g, tendo sido fornecidos pelos Laboratórios Charles River (Barcelona, Espanha).

Antes dos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos no biotério do Pólo III da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) sob condições controladas (temperatura  $22\pm 1^\circ\text{C}$ ; humidade  $50\pm 10\%$ ; ciclos de luz/obscuridade 12/12horas) e acesso *ad libitum* a água. Em todo o procedimento prático tentou-se diminuir ao máximo o sofrimento dos animais e o planeamento incluiu minimizar o número de animais necessários.

Relativamente aos fármacos testados, o (+)-Clorohidrato de Metanfetamina foi obtido através da Sigma-Aldrich e o clorohidrato de Metilenedioxipirovalerona (mistura racémica) foi gentilmente cedido pelo Professor Doutor Félix Carvalho ( Laboratório Associado UCIBIO-REQUIMTE - Laboratório de Toxicologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto).

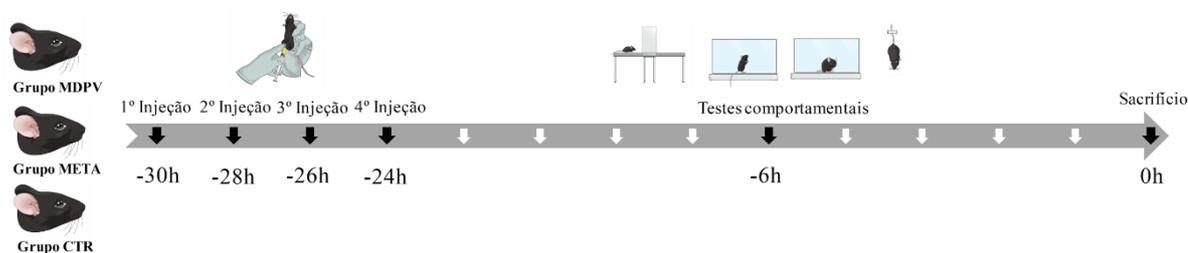
As duas substâncias foram administradas intraperitonealmente com doses de 10mg/Kg. Para ambas as substâncias foram obtidas as autorizações necessárias, nomeadamente à FMUC e ao INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.).

## 2.2 Planeamento experimental

A execução deste trabalho envolveu a utilização de 30 murganhos C57BL/6 que foram pesados logo após a sua chegada. Esta estirpe é recorrentemente usada em estudos de adicção de substâncias e terá sido utilizado em trabalhos anteriores neste laboratório<sup>57,124</sup>.

O desenho experimental incluiu três grupos experimentais: Grupo MDPV, n=10; Grupo META, n=10; Grupo Controlo (CTR), n=10. A distribuição teve em conta a homogeneidade de peso entre os grupos. Cada grupo ficou com 3 gaiolas associadas, duas com 3 animais e outra com 4 animais, tendo estes sido devidamente marcados na cauda para sua distinção. Foi cumprido um período de 7 dias para a habituação social e espacial dos animais ao biotério antes de qualquer procedimento.

Foram estipulados três dias para executar a administração dos fármacos e a realização dos ensaios comportamentais, sendo que em cada um desses dias nos concentramos no estudo de 3 gaiolas de animais (uma de cada grupo). O Esquema 2 representada a organização temporal das tarefas realizadas de igual forma nos três dias.



**Esquema 2** Planeamento das tarefas experimentais incluindo o protocolo de administrações até sacrifício.

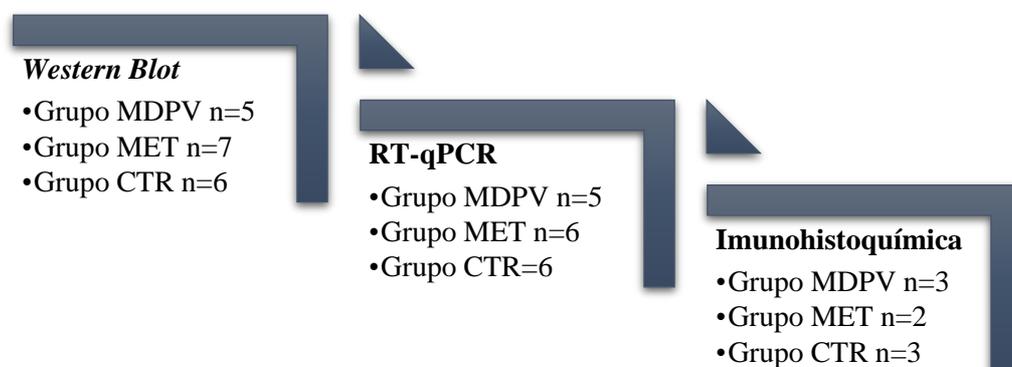
O regime de administrações incluiu 4 injeções intraperitoneais (ip.) intercaladas por 2h. Ao grupo CTR foi administrada uma solução salina a 0.9% (250µl) e aos grupos META e MDPV foram administradas doses de 10mg/Kg (META 1,68mg/ml; MDPV 1mg/ml). Este procedimento foi adotado por ser considerado um regime com uma dose neurotóxica, conseguindo-se maiores concentrações de droga no cérebro (mimetiza a via intravenosa em humano) e reproduzem-se os efeitos em indivíduos sem tolerância. Além destes fatores, esta dosagem está associada a níveis notórios de toxicidade induzida no estriado (depleções de DA e DAT), condições que se pretendem avaliar neste estudo<sup>261</sup>.

Os testes comportamentais seguiram-se 18h após da última injeção, seguindo sempre a mesma ordem: primeiro o *Elevated plus maze*, seguido do *Open field*, depois o *Splash test* e, por fim, o *Tail suspension*. Os testes foram antecidos de 1h de habituação dos animais ao ambiente da sala de comportamento.

O sacrifício foi realizado 24h depois a última administração (6h após os testes comportamentais), com o propósito de avaliar parâmetros de neurotoxicidade e impacto no recetor da imunidade inata RAGE numa fase aguda após a administração das toxinas.

Uma vez que durante o período de experiência alguns animais morreram, por circunstâncias alheias aos procedimentos ou terapêuticas, o número de animais de cada grupo sofreu alterações. De acordo com o número de animais disponíveis, as amostras foram divididas e armazenadas de acordo com cada uma das técnicas utilizadas para avaliação *post-mortem* dos marcadores identificados.

Duas das técnicas executadas foram *Western Blot* (WB) e *Polymerase Chain Reaction* com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR), sendo que para estas técnicas o sacrifício ocorreu por deslocamento cervical, seguido da decapitação e dissecação do estriado nos dois hemisférios do cérebro (procedimento sobre gelo). Relativamente aos estriados do hemisfério esquerdo, estes foram armazenados em condições específicas para ensaios de quantificação dos níveis proteicos por WB, tendo correspondido a um  $n_{\text{total}}=18$  (esquema 3). Os estriados do hemisfério direito foram aproveitados para análises de expressão genética por RT-qPCR com um  $n_{\text{total}}=17$  (esquema 3). Todas as amostras foram imediatamente colocadas em hidrogénio líquido e, posteriormente, armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Outra técnica realizada foi Imunohistoquímica (IHC, *Immunohistochemistry*), o que requereu o sacrifício por perfusão transcardíaca para a fixação dos tecidos. De igual forma, os cérebros destes animais foram dissecados sobre gelo e armazenados em condições específicas da técnica.



**Esquema 3** Esquemática da distribuição dos animais de cada tratamento para as diferentes técnicas de análise biológica.

## 2.3 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados 18 horas após a última injeção, com o intuito de preservar o intervalo de 24h entre a última injeção e o sacrifício. Adicionalmente, a ordem pela qual estes foram realizados (*Elevated Plus Maze* (EPM), *Open Field* (OF), *Splash test* (ST) e *Tail suspension* (TS)) teve o objetivo de evitar a transição de interferências comportamentais para o teste subsequente.

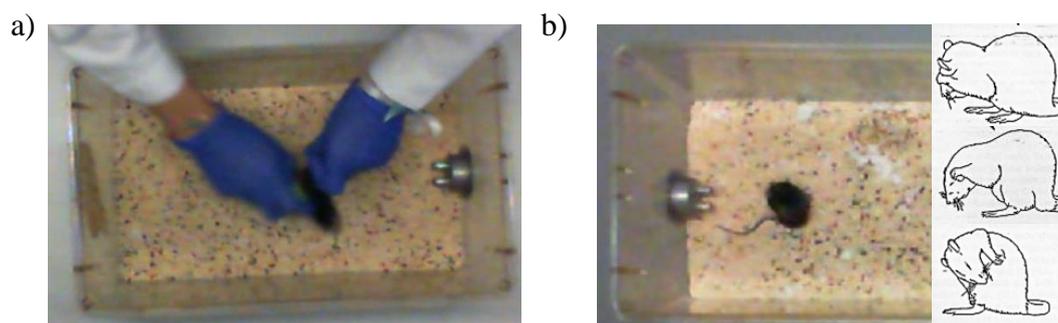
As condições adequadas à realização destes procedimentos foram acedidas na sala de comportamento deste laboratório (isolamento acústico, regulador de intensidade da luminosidade (12lx)), tendo sido concretizados entre as 9-13h. Os ratinhos foram previamente (1h) colocados no novo ambiente para um período de habituação.

Os testes de EPM, OF, e ST foram gravados por uma câmara de vídeo, enquanto que o TS foi monitorizado presencialmente (com a menor interferência possível). Alguns dos dados experimentais, no caso do EPM e OF, foram obtidos com o sistema de vídeo-análise ANY Maze<sup>®</sup> (Stoelting Co., EUA).

### 2.3.1 *Splash test* (ST)

O ST direciona-se para avaliar o comportamento motivacional e de cuidado-próprio dos animais. Este comportamento é traduzido pelo *grooming* que inclui múltiplas ações, como: friccionar o nariz ou a face com as patas; movimentos circulares com a cabeça; lambe o pelo do corpo ou os genitais (figura 1.25 (b))<sup>262</sup>. Estes comportamentos existem naturalmente, mas são fomentados em situações de stress ou moderados pela falta de interesse próprio, mimetizando os sintomas anedônicos em padrões depressivos<sup>263,264</sup>.

O teste foi realizado na caixa individual do animal durante 5min, após a pulverização de uma solução de sacarose a 10% no dorso do animal (figura 1.25). Com a viscosidade da solução, o ratinho era impulsionado a limpar a zona afetada. Foram registados os seguintes dados: latência, número e duração do *grooming*.



**Figura 1.25 Exemplificação do *Splash test*.** Caixa individual para a execução do ST com exemplos da aplicação da sacarose no dorso (a) e do comportamento *grooming* monitorizado (b).

### 2.3.2 Tail suspension (TS)

Um dos procedimentos indicados para o estudo do comportamento tipo depressivo é o TS. Genericamente, o ratinho adota uma postura imóvel quando exposto a um stress inevitável num curto espaço de tempo, como a suspensão no ar. Este comportamento é influenciado pelo estado emocional depressivo do animal que pode ser incrementado pela administração de drogas, como a META, ou atenuado por substâncias antidepressivas<sup>265,266</sup>.

Os ratinhos foram colocados individualmente com um tubo de borracha com 2cm na cauda e presos a 50cm do chão com fita-cola, a cerca de 1cm da ponta da cauda. A agilidade dos ratinhos em prender a pata na cauda, de forma a facilitar a subida/escapatória, foi relatada por outros autores como um problema persistente neste teste. O tubinho inserido na cauda elimina esta variável<sup>267</sup>.

Similarmente aos protocolos já existentes, o teste teve a duração de 6min e iniciou-se imediatamente após a suspensão do animal. Foram, presencialmente, registados o tempo de imobilização e a latência da imobilização. Esta postura foi considerada a partir do momento em que o animal ficava completamente sem movimento.

### 2.3.3 Elevated Plus Maze (EPM)

O EPM consiste num teste comportamental que avalia o comportamento espontâneo em ambientes condicionadas (abertos, potencialmente perigosos), provocando um conflito entre curiosidade/medo nos roedores. Desde o início da sua aplicação que se constatou que a aversão natural destes animais a espaços abertos ou altos era influenciada pela administração de ansiolíticos. Historicamente, a sua prática destinava-se ao estudo de comportamentos tipo ansiedade para *screening* de ansiolíticos, contudo, atualmente têm abrangido o estudo

emocional associada à memória e aprendizagem, à dor, ao abuso de drogas ou à síndrome de abstinência<sup>268,269</sup>.

Neste projeto recorreu-se a um aparelho (LE 848 PANLAB, Barcelona, Espanha) em acrílico com uma altura de 50cm. Este aparelho é constituído por 4 braços em forma de cruz com 30cm de comprimento e 5cm de largura, dos quais 2 braços opostos tinham uma aba opaca de 1cm (braços abertos) e os outros dois tinham paredes laterais cinzentas com 14cm de altura (braços fechados) (figura 1.26).

Todos os testes foram iniciados com os animais posicionados no centro da cruz, tendo-se contabilizado o número de entradas em cada tipo de braço durante 5min. A entrada num braço foi definida pela entrada das 4 patas do ratinho. No intervalo de cada teste, o aparelho era limpo com etanol a 10% para evitar interferências no comportamento do animal seguinte.

Relativamente aos parâmetros adotados: o comportamento ansiogénico foi avaliado pela diminuição da proporção entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas (percentagem de entradas nos braços abertos) e pela percentagem de tempo despendido nos braços abertos; o número de entradas nos braços fechados serviu como um parâmetro indicativo de atividade locomotora. Estes critérios estão em concordância com outros autores e com trabalhos anteriormente desenvolvidos neste laboratório<sup>263,270,271</sup>.



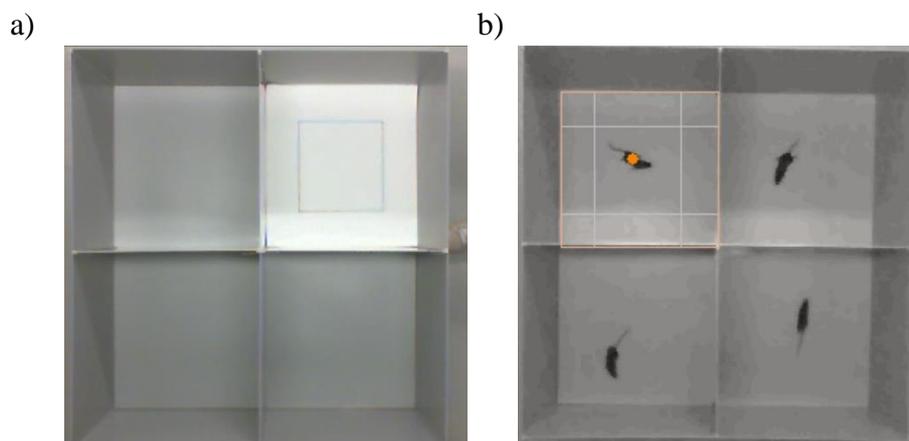
**Figura 1.26** Perspetivas do aparelho utilizado para o *Elevated Plus Maze*.

### 2.3.4 *Open Field* (OF)

Similarmente ao EPM, o teste de OF consiste na observação de respostas não condicionadas do animal quando exposto ao ambiente da arena (aparelho de teste). Neste caso, a aversão natural é constituída pelo espaço aberto e desprotegido da arena, sendo que a tendência do animal é manter-se junto às paredes (tigmotaxia). Este teste é aplicado maioritariamente ao estudo da atividade locomotora e exploratória dos animais, através da frequência do movimento. Contudo, parâmetros relacionados com a atividade no centro da arena são considerados válidos para concluir sobre o estado ansioso do animal, tendo em conta que a diminuição da ansiedade traduz-se numa maior à vontade para explorar o sempre da arena<sup>272</sup>.

O aparelho utilizado consiste numa arena quadrada (44,5x44,5cm) de chão branco com paredes cinzentas com 40cm de altura (figura 1.27). O teste foi gravado com uma câmara de vídeo, tendo-se iniciado o vídeo com a indicação dos limites da periferia e do centro para posterior tratamento de dados no sistema ANY Maze. De seguida, os animais foram posicionados no centro da arena e o seu comportamento foi monitorizado durante 5min, com luz amena. Entre cada teste a arena era higienizada com uma solução de etanol a 10%.

Através de uma posterior análise com o *software* ANY Maze, os parâmetros registados foram: atividade horizontal (distância total percorrida, número de entradas e tempo no centro) e a atividade vertical (frequência e duração de *rearings*)<sup>273</sup>.



**Figura 1.27** Aparelho de execução do *Open Field*. Representação dos limites de periferia e centro no início do teste (a) e exemplificação da monitorização com o programa ANY Maze (b).

## 2.4 Ensaio Biológicos

A caracterização biológica das amostras foi elaborada tendo em conta diferentes perspetivas: análise semi-quantitativa dos níveis de proteínas por WB; marcação imunohistológica em secções cerebrais por IHC; avaliação da expressão genética RT-qPCR.

### 2.4.1 Western Blot

A amostra proteica para análise por WB foi extraída dos estriados do hemisfério esquerdo, seguindo um protocolo experimental otimizado anteriormente neste laboratório<sup>274,275</sup>.

#### a) Extração proteica

Após a dissecação de cada cérebro, as amostras biológicas foram imediatamente colocadas em hidrogénio líquido, armazenadas em eppendorfs individuais contendo 200µl de tampão lise RIPA (NaCl 150mM; TrisHCl 50mM, pH 8; Triton X-100 1%; EGTA 5mM; Deoxicolato de sódio (DOC) 0.5%; Dodecil sulfato de sódio (SDS) 0.1%) com um cocktail de inibidores de proteases (cOmplete™ Mini EDTA-free, Sigma-Aldrich).

Para preparação da amostra proteica final, inicialmente o tecido foi homogeneizado com ultrassons (3pulsos, 10s) mergulhando as amostras em gelo entre cada pulso, para evitar o seu sobreaquecimento. Os lisados foram depois centrifugados (13000 rpm (15493 x g), 15min a 4°C), tendo-se armazenado separadamente o sobrenadante e o pellet a -80°C.

#### b) Quantificação e desnaturação proteica

A quantificação de proteína total em cada amostra foi realizada pelo método de quantificação do ácido bicinonínico (*bicinchoninic acid*, BCA) que permite fazer a detecção colorimétrica e a quantificação de proteínas. Neste método, um reagente de Cu<sup>2+</sup> é reduzido por resíduos das proteínas da amostra, originando iões Cu<sup>+</sup> que são estabilizados por duas moléculas de BCA, formando um complexo de cor roxa com uma absorvância ≈560nm. Uma vez que as absorvâncias de BCA são lineares às concentrações de proteína total das amostras, estas determinam-se através da comparação com uma curva padrão (absorvâncias/concentrações já definidas de uma proteína modelo) previamente construída.<sup>276</sup>

Para este método, recorreu-se ao kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoScientific™), a partir do qual se misturaram dois reagentes numa proporção de 50:1 (A:B). Cada amostra foi

diluída 16x em tampão RIPA, também 16x diluído (para não saturar a absorvância). Posteriormente, numa placa *multiwell* com 96 poços, foram distribuídas as amostras em duplicado. Para cada poço foi então adicionado 25µl da amostra diluída, 25µl de água Mili-Q e 200µl da solução do kit BCA. Para construir a curva padrão, prepararam-se 7 diluições de albumina de soro bovino 0,4% (*bovine serum albumin*, BSA) (25µl de cada diluição; 25µl tampão RIPA 16x diluído; 200µl solução do kit BCA), também dispostas em duplicado. Por fim, a placa foi a incubar a 37°C, 30min. Seguiu-se a medição das absorvâncias a 560 nm tendo, por construção da curva padrão, se obtido as concentrações de proteína total para cada amostra.

Por fim, prosseguiu-se a desnaturação da amostra, onde foram preparados eppendorfs com concentrações definidas de cada amostra. Ao volume final necessário para a concentração pretendida, foi adicionado 6% (v/v) de solução desnaturante (*sample buffer*, SB) (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; SDS 10% (m/v); Glicerol 30% (v/v); DTT 0,6M; azul de bromofenol 0,01% (m/v)) e o restante volume de tampão RIPA). A desnaturação ocorreu a 95°C durante 5 minutos e os extratos proteicos foram armazenados a -20°C, tendo sido utilizados para imunodeteção das proteínas ao longo das semanas que se seguiram.

### c) Técnica SDS-PAGE e Imunodeteção (*Western Blot*)

Pretendeu-se identificar e semi-quantificar determinadas proteínas nos extratos obtidos e, para tal, primeiro foi necessário promover à diferenciação por peso molecular das diferentes proteínas presentes nas amostras.

Procedeu-se então, à eletroforese das amostras em géis de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), técnica de eletroforese conhecida por SDS-PAGE. O gel é constituído por duas porções, o *stacking* gel (porção onde se carregam as amostras com 4% de acrilamida) e o *resolving* gel (porção onde ocorre a separação das proteínas). Para cada tipo de proteína que se testou, as seguintes condições da eletroforese foram ajustadas: percentagem de acrilamida do *resolving* gel (maior percentagem para proteínas com menor peso molecular), quantidade de proteína, condições de voltagem, amperagem e tempo (uma menor voltagem e maior tempo de corrida, permitem uma corrida mais eficiente de proteínas com maior peso molecular). Em todos os géis a eletroforese realizou-se na presença do tampão de corrida (Tris-base 500mM; Bicina 500mM; SDS 0,5 % (m/v)) 5x diluído, envolvendo uma primeira corrida com 80V durante 20min, para as amostras fluírem no *stacking* gel e, depois, outra corrida para o *resolving* gel onde as condições variaram consoante a proteína (≈50min). Como comparador de peso molecular usou-se o padrão Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD).

Após a separação por peso molecular, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Immobilon-P<sup>SQ</sup> Membrane PVDF 0.2 µm, Millipore), previamente ativada em metanol (10s) e mergulhada em tampão de transferência (Tris-base 62,5mM; Glicina 480mM) diluído 5x com 20 % (v/v) de metanol. A transferência ocorreu na presença do tampão de transferência, com a voltagem constante de 130-170V e a amperagem variável de 250-300 durante 90 minutos, com o sistema de transferência em gelo (evita o sobreaquecimento).

Depois da transferência, sucedeu-se o bloqueio das membranas durante 1h, sob agitação e à T<sub>amb</sub>, com uma solução de leite magro 5% (m/v) em tampão tris salino (TBS) (Tris-base 200mM; NaCl 1,37M; ph 7,6) diluído 10x com 0,1% (v/v) de Tween- 20 (TBS-T 0,1%). Posteriormente, as membranas foram incubadas, durante a noite a 4°C, com o anticorpo primário da proteína de interesse, numa solução com leite magro 5% (m/v) e TBS-T 0.1%.

No dia seguinte à primeira incubação e após a realização de um protocolo de lavagens (3 lavagens de 10min em TBS-T 0.1% sob agitação), as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários, durante 1h à T<sub>amb</sub>, numa solução com leite magro 5% (m/v) e TBS-T 0.1%. Procedeu-se novamente a lavagens nas mesmas condições anteriores. Na Tabela 5 estão apresentados os anticorpos, primários e secundários, utilizados e as respectivas condições de blot.

As membranas foram reveladas no detetor Fluorescent Image Analyzer Typhoon FLA 900 (GE Healthcare Bio-Sciences), através da utilização de um reagente quimioluminescente que reage com os anticorpos secundários acoplados a fosfatase alcalina (AP, *alkaline phosphatase*) (Enhanced chemifluorescence (ECF), GE Healthcare).

Adicionalmente, as membranas foram reincubadas com anticorpos específicos para proteínas cuja expressão não é alterada pelos tratamentos ( $\beta$ -Actina, GAPDH), com o objetivo de confirmar a igual carga de proteína transferida.

A análise densitométrica foi realizada recorrendo ao *software* Image Studio<sup>TM</sup> Lite, onde a intensidade relativa das bandas foi normalizada em relação às bandas da proteína referência ( $\beta$ -Actina ou GAPDH). Os resultados são expressos como percentagens relativas ao controlo e representados como média $\pm$ SEM (*standard error of the mean*).

**Tabela 5** Lista de anticorpos primários e secundários no Western Blot com as respectivas condições e referências.

Anticorpos primários	Peso Molecular (KDa)	Quantidade proteína (µg)	Diluição (µl)	% Acrilamida no gel <i>resolving</i>	Eletroforese no <i>resolving</i> gel	Referência
Anti-GFAP mouse	50	10	1:2000	10%	140V	Merk Millipore IF03L
Anti-TH mouse	60	10	1:2000	10%	140V	Merk Millipore mab318
Anti-C-RAGE rabbit	50-25	30	1:500	12%	120V	Abcam ab3611
Anti-N-RAGE goat	50-40	30	1:200	12%	120V	Santa Cruz sc-8231
Anti-MBP rabbit	21-17	15	1/500	15%		Abcam ab40390
Anti-βActina mouse	42	-	1:5000	-	-	Sigma Aldrich 95316
Anti- GAPDH mouse	39	-	1:2000	-	-	MerckMillipore mab374
Anticorpos secundários			Diluição (µl)	Referência		
Goat anti-mouse - AP			1/5000	Sigma Aldrich A3562		
Goat anti-rabbit - AP			1/5000	GE Healthcare NIF1317		
Donkey anti-goat - AP			1/5000	Santa Cruz sc-2022		

### 2.4.2 Imunohistoquímica – Free-Floating

O tecido biológico para IHC foi obtido por perfusão transcardíaca com uma solução salina de tampão fosfato (PBS) (NaCl 0,14M; KCl 2,7mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 10mM; ph 7,4), seguida de uma solução de paraformaldeído 4% em PBS (±10ml/animal), proporcionando uma rápida e uniforme fixação dos tecidos. Previamente, os animais foram anestesiados com uma injeção ip. de uma solução de pentobarbital (100mg/kg). Após a dissecação do cérebro, este foi mantido 24h em paraformaldeído 4% e colocado posteriormente em sacarose 30% a 4°C.

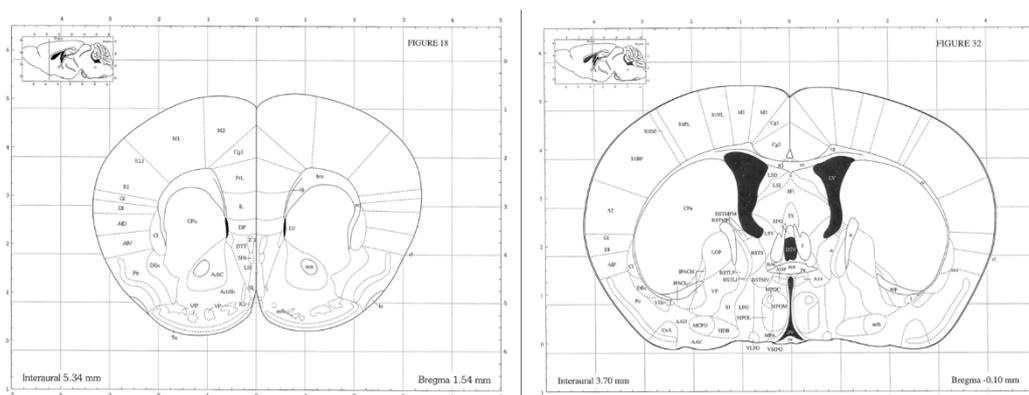
No crióstato (Leica CM3050S, Nussloch, Germany), os cérebros foram fixados nos apoios com a cola de fixação Cryomatrix (Sigma-Aldrich) e os cortes histológicos em secções coronais de 40 µm de espessura foram armazenados numa solução anti-freezing (Glicerol 30%(v/v); Polietilenoglicol 30%(v/v); TBS 40% (v/v)) a -20°C. Os limites anatômicos foram

estabelecidos segundo o atlas do cérebro de rato<sup>277</sup> entre as coordenadas +1,54 a -0,10mm na direção Anterior-Posterior do bregma (figura 1.28).

As secções cerebrais foram posteriormente utilizadas para IHC em free-floating, técnica mais adequada a espessuras maiores de tecido. Foi seguido um protocolo otimizado anteriormente no laboratório em questão<sup>274,275</sup>.

O protocolo iniciava-se então com um conjunto de lavagens (2x 5min) em tampão fosfato salino (PBS) (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM; pH 7,4), seguido de bloqueio com 0,2/0,5% de Triton X-100 e 3% BSA em PBS durante 1hora a T<sub>amb</sub>. Posteriormente, as fatias eram incubadas com os anticorpos primários durante 24horas a 4°C.

No dia seguinte, o excesso de anticorpo primário era retirado com lavagens em PBS (3x 10min) e as fatias eram incubadas durante 1h30min à T<sub>amb</sub> numa solução com os respetivos anticorpos secundários (anticorpo secundário com diluição específica; 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1/200 (Invitrogen™); Triton X-100 0,2/0,5%; PBS). Acabando a incubação, as fatias eram de novo lavadas (3x 10min) em PBS. Por último, as secções eram montadas nas



**Figura 1.28** Secções coronais com as coordenadas estereotáxicas entre os limites +1,54 e -0.10 mm do bregma na direção Antero-Posterior (retirado de *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*<sup>277</sup>).

lâminas gelatinizadas com meio de montagem Glicergel (Dako, CO563) e armazenadas a -20°C.

As montagens foram então visualizadas no microscópio confocal LSM 710 Meta (Carl Zeiss Gottingen, Alemanha) utilizando uma ampliação 10/40×. As imagens obtidas foram posteriormente tratadas com o programa ImajeJ/FIJI. Adicionalmente, com o mesmo programa foi determinada a intensidade de fluorescência obtida para cada anticorpo, por cada tratamento. Esta medida é expressa em unidades arbitrárias e os dados são apresentadas como médias percentuais relativo ao grupo controlo ± SEM. As características dos anticorpos utilizados para as incubações podem ser consultadas na Tabela 6.

**Tabela 6** Lista de anticorpos primários e secundários com as respectivas diluições e referência.

Anticorpos primários	Diluição (µl)	Referência
Anti-GFAP mouse	1/100	Merck Millipore IF03L
Anti-TH rabbit	1/250	Merck Millipore ab152
Anti-Iba-1 rabbit	1/250	Wako 019-19741
Anti-C-RAGE rabbit	1/500	Abcam ab3611
Anti-N-RAGE goat	1/100	Santa Cruz sc-8231
Anti-S100β rabbit	1/500	Merck Millipore ABN59
Anti-MBP rabbit	1/1000	Abcam ab40390
Anticorpos secundários	Diluição (µl)	Referência
Alexa 488, Donkey anti-mouse	1/1000	ThermoFisher™ A21202
Alexa 488, Goat anti-rabbit	1/1000	Life Technologies 1124089
Alexa 594, Donkey anti-rabbit	1/1000	ThermoFisher™ A21207
Alexa 488, Donkey anti-goat	1/1000	Life Technologies A11055

### 2.4.3 Expressão Genética por RT-qPCR

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) é uma técnica relativamente recente que permite quantificar RNA numa amostra, pela sua conversão em cDNA, por meio de enzimas de transcriptase reversa, seguida de uma reação normal de PCR com *primers* específicos para o gene em estudo, em que o produto formado é quantificado em tempo real pela introdução de sondas fluorescentes.

Neste projeto as amostras utilizadas resultaram da dissecação do estriado do hemisfério direito do cérebro dos animais em estudo. Estas amostras foram imediatamente colocadas em RNA later™ (QUIAGEN) e armazenadas a -80°C. O protocolo adotado consiste na preparação e quantificação da amostra, na síntese de DNA complementar (cDNA) e numa reação de PCR.

Para preparar a amostra, inicialmente esta tem de passar por uma fase de extração e purificação do RNA, seguida de uma fase de quantificação. A extração do RNA executou-se de acordo com o protocolo do kit usado (RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit, Invitrogen™), incluindo este reagentes e material para: primeiro, promover a digestão das proteases presentes no meio, recorrendo à lise mecânica (MagNA Lyser Green Beads, Roche) e enzimática da amostra; segundo, isolar os ácidos nucleicos da amostra com um filtro e soluções de lavagem; terceiro, separar RNA do DNA através da digestão enzimática deste. As concentrações de RNA das amostras foram determinadas no espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000, ThermoScientific™) e a integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN) foi acedida com o kit RNA Nano Chip® no Bioanalyzer Agilent 2100 (*software 2100 expert*, Agilent Technologies).

Após a obtenção do RNA puro e da sua quantificação, seguiu-se a síntese do cDNA para cada amostra recorrendo-se ao kit Transcriptor Universal cDNA Master (Roche). O volume de amostra correspondente a 1µg de RNA foi misturado com 1µl da reverse transcriptase Transcriptor Universal Reverse Transcriptase 20x concentrado, 4µl de Transcriptor Universal Reaction Buffer 5x concentrado, perfazendo o restante volume ( $V_T = 20\mu\text{l}$ ) com água. A reação de síntese ocorreu no termociclador Mastercycler pro vapo.protect™ (Eppendorf) com os seguintes ciclos: 5min a 25°C, 10min a 55°C e 5min a 85°C (segundo o protocolo do kit da Roche).

Com o cDNA sintetizado, prosseguiu-se para a avaliação da expressão genética através da PCR quantificada a tempo real usando o LightCycler® 480 II (Roche). Os genes de interesse correspondiam às proteínas S100β, RAGE e 18SrRNA (*housekeeping*) e os seus primers foram otimizados no RealTime ready catalog assays (Roche) com as seguintes seqüências:

RAGE, 5'- GTCAGCATCAGGGTCACAGA-3' (5'→3') e 5'-  
AGGCCAGGGCTAGCGTA-3' (3'→5') (Cat. nº 311489);  
S100β, 5'-AACAACGAGCTCTCTCACTTCC-3' (5'→3') e 5'-  
CTCCATCACTTTGTCCACCA-3' (3'→5') (Cat. nº 315571);  
18SrRNA, 5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3' (5'→3') e 5'-  
GGGACTTAATCAACGCAAGC-3' (3'→5') (Cat. nº 300236).

Para a reação de amplificação é necessário adicionar à amostra uma solução com o primer pretendido, uma mix reacional (LightCycler® 480 Probes Master 2x concentrado, Roche) e água. Diferentes combinações das entidades anteriores foram combinadas de forma a otimizar os resultados, sendo que as condições de reação utilizadas podem ser consultadas na Tabela 7.

Adicionalmente, foi realizado um controlo negativo *no-template control* (NTC) para assegurar a especificidade da amplificação.

Por último, os resultados foram analisados com o *software* qbase+ (Biogazelle) e estabeleceu-se um número máximo de ciclos relevantes (40ciclos). Os dados foram obtidos em *calibrated normalized relative quantities* (CNRQ) e apresentados como médias percentuais relativamente aos controlos  $\pm$  SEM.

**Tabela 7** Proporções adotadas para os diferentes reagentes da reação de amplificação para casa gene.

	Mix reacional	Vamostra	Amostra/Mix
<b>Rage</b>	Primer 1 $\mu$ l Prob Master 10 $\mu$ l Água 4 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5/15
	Primer 1 $\mu$ l Prob Master 10 $\mu$ l Água 4 $\mu$ l	2 $\mu$ l	5/15
<b>S100<math>\beta</math></b>	Primer 1 $\mu$ l Prob Master 10 $\mu$ l Água 7 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2/18
<b>18SrRNA</b>	Primer 2 $\mu$ l Green Master 10 $\mu$ l Água 3 $\mu$ l	2 $\mu$ l	5/15

## 2.5 Análise Estatística

Os dados apresentados foram estatisticamente analisados recorrendo ao *software* GraphPad Prism 6.0. Em todos os gráficos os dados são apresentados como médias com o respetivo SEM.

Os dados das avaliações comportamentais foram primeiro sujeitos ao teste D'Agostino e Pearson para avaliar a normalidade. Os grupos de dados enquadrados na distribuição Gaussiana, foram, de seguida, sujeitos à análise das variâncias pelo teste paramétrico *one-way* ANOVA seguido do teste *post-hoc* Tukey de múltiplas comparações, permitindo localizar as diferenças estatísticas entre os três grupos de tratamentos. No caso de um ou mais grupos não seguirem uma distribuição normal, recorreu-se ao teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* Dunn de múltiplas comparações.

Os dados resultantes dos ensaios biológicos, quando  $n \geq 5$  foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade. Caso, os dados seguissem a distribuição normal foi utilizado o teste *one-way* ANOVA seguido do teste *post-hoc* Tukey de múltiplas comparações. Alguns dados com  $n < 5$  não foram comparados estatisticamente, sendo apenas indicado a média e o SEM para cada grupo.

Em todos os métodos foi considerado um intervalo de confiança de 95%, considerando-se diferentes os dados quando  $p < 0.05$ . Foram adotados símbolos para representar as diferenças estatísticas entre os grupos META/MDPV e o grupo CTR - \* - e entre o grupo META e MDPV - #. Nos gráficos, quando existem diferentes o valor p é apresentado segundo valores padrões com as seguintes correspondências: \* / #  $p < 0.05$ , \*\* / ##  $p < 0.01$ , \*\*\* / ###  $p < 0.001$ , \*\*\*\* / ####  $p < 0.0001$ .



# ***Capítulo III***

*Resultados*



### **3 Resultados**

Os resultados dos procedimentos elaborados no percurso deste trabalho são apresentados neste capítulo, segundo a lógica dos parâmetros avaliados. Em primeiro lugar encontram-se os resultados relativamente ao comportamento, à locomoção e ao estado emocional dos murganhos, após a administrações das toxinas; em segundo, são apresentados os efeitos das drogas em marcadores de neuroinflamação e toxicidade dopaminérgica; por último, o impacto do efeito das drogas nos RAGE, recetores do SI Inato.

### 3.1 Análise comportamental em murganhos expostos a META e a MDPV: efeitos locomotores e emocionais

#### 3.1.1 Alterações comportamentais nos murganhos registadas durante e imediatamente após as administrações das toxinas

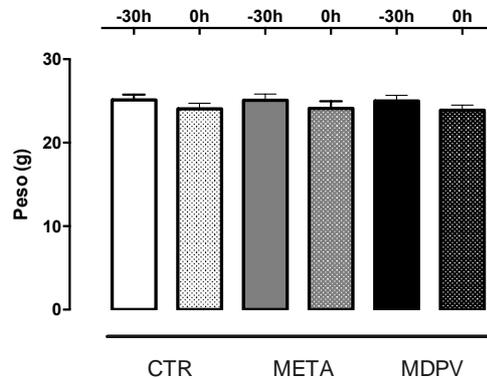
O regime de administrações (10mg/Kg  $\times$  4, 2/2h) foi executado em ambiente calmo, para minimizar eventuais fatores de stress. O comportamento foi monitorizado durante e após as injeções para se identificarem possíveis diferenças entre as drogas.

Imediatamente após as primeiras e segundas administrações foi evidente o estado de vigília intenso com elevada atividade e exploração (corridas circulares constantes na caixa e *rearings*) para as duas drogas. Durante as terceiras administrações os animais injetados com META adotaram uma elevada estereotipia (lamber, roer as patas) com pouca exploração e piloereção, enquanto os animais sob o efeito de MDPV permanecerem ativos (menos ativos do que anteriormente) e exploradores, e também exibiram alguma estereotipia. Após a última injeção os animais permaneceram ativos, sendo que sob efeito de META permaneceram menos exploradores do que os animais injetados com MDPV. Durante todas as injeções, os animais injetados com MDPV exibiram comportamentos violentos, como roer a cauda ou morder o pêlo de outros murganhos, e movimentos repentinos, como saltos ou rodopios bruscos. Relativamente ao grupo controlo, foram observados períodos de agitação normal (não tão elevada como nos outros grupos), imediatamente após as administrações de uma solução salina, e foram observados períodos de repouso ao longo de todo o procedimento.

A maior parte dos murganhos injetados com META acalmaram ao fim de 3 horas após a última injeção, ao invés dos murganhos injetados com MDPV que permaneceram mais ativos. Ao fim de 18 horas os animais injetados com MDPV aparentaram ter um comportamento normal, contrariamente aos animais de META que permaneceram imóveis. Os murganhos do grupo controlo estavam ativos e com um comportamento normal, ao fim de 18 horas.

Durante a execução dos testes comportamentais, os animais administrados com MDPV estavam exploradores e ativos. O grupo injetado com META permaneceu com pouca atividade e com um comportamento apático e respondeu de forma deficiente aos estímulos externos.

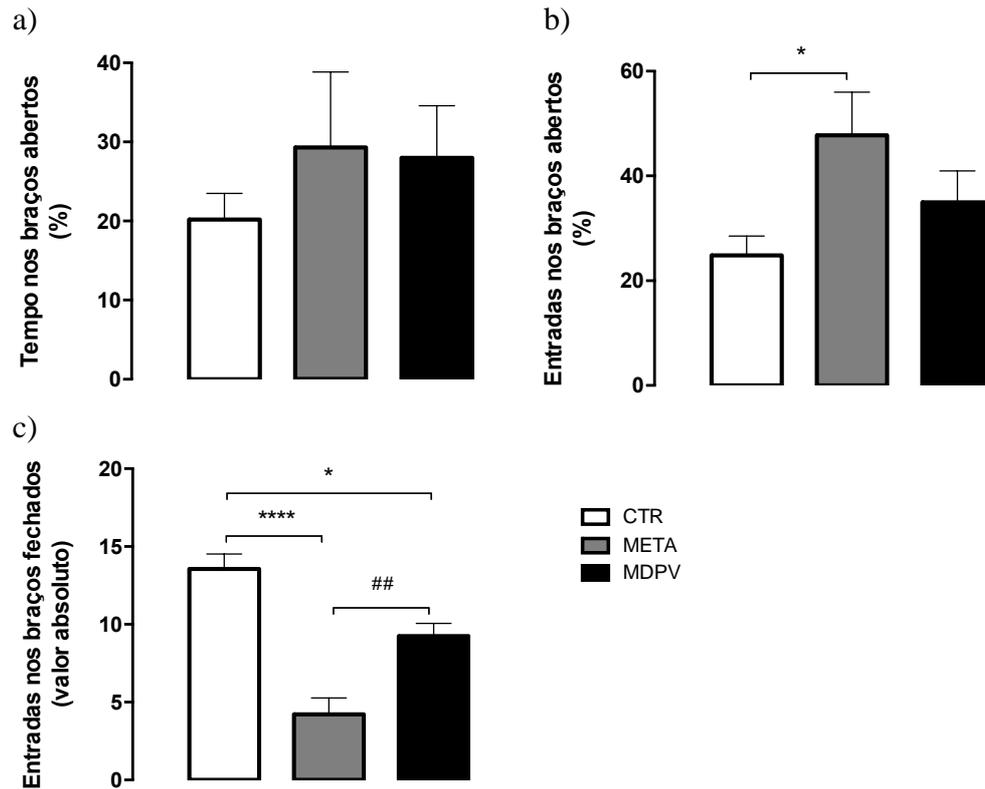
O peso dos murganhos foi medido antes do regime das administrações (-30h) e imediatamente antes do sacrifício (0h) (figura 1.29). Não foram registadas quaisquer variações significativas do peso em nenhum dos grupos ( $p > 0.05$ ).



**Figure 1.29 Registo do peso dos murganhos antes das administrações e do sacrifício.** Valores médios do peso de cada grupo experimental antes das administrações (-30h) e do sacrifício (0h) de cada grupo experimental. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM ( $n=8/9$ ) e são estatisticamente tratados pelo teste *one-way* ANOVA. ( $p>0.05$ ) (CTR -30h ( $25.13\pm 0.6$ ), CTR 0h ( $24.0\pm 0.6$ ), META -30h ( $25.9\pm 0.7$ ), META 0h ( $24.1\pm 0.8$ ), MDPV -30h ( $24.9\pm 0.6$ ), MDPV 0h ( $23.9\pm 0.6$ ))

### 3.1.2 Efeitos da META e da MDPV no comportamento tipo ansioso e depressivo em murganhos

O teste EPM foi efetuado com o intuito de avaliar os efeitos das toxinas no fenótipo emocional do tipo ansioso nos animais, aproximadamente 18 horas após a última administração. Neste teste os comportamentos do tipo ansioso são avaliados pelo nº de entradas e pelo tempo que os animais passam nos braços abertos do EPM. Apesar de os animais injetados com META terem entrado mais vezes nos braços abertos do que os animais controlo, o tempo que aí permaneceram não foi significativamente diferente do tempo registado para os animais controlo (figuras 1.30 (a)  $p<0.05$ , (b)  $p<0.05$ ). A MDPV não alterou de forma estatisticamente significativa o nº de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (Figuras 1.30 (a), (b) ( $p>0,05$ )). O nº de entradas nos braços fechados (sítio não aversivo) foi outro critério analisado, que serviu como *índice* da atividade locomotora. Os animais do grupo META e MDPV entraram menos vezes nos braços fechados do que os animais controlo (figura 1.30 (c), respetivamente  $p<0.0001$  e  $p<0.05$ ). Adicionalmente, a perturbação da atividade locomotora parece ser maior nos animais do grupo META relativamente aos animais do grupo MDPV ( $##p<0.01$ ). Esta perturbação da atividade locomotora mascara o resultado obtido relativamente à maior percentagem de entradas nos braços abertos pelos animais do grupo META.

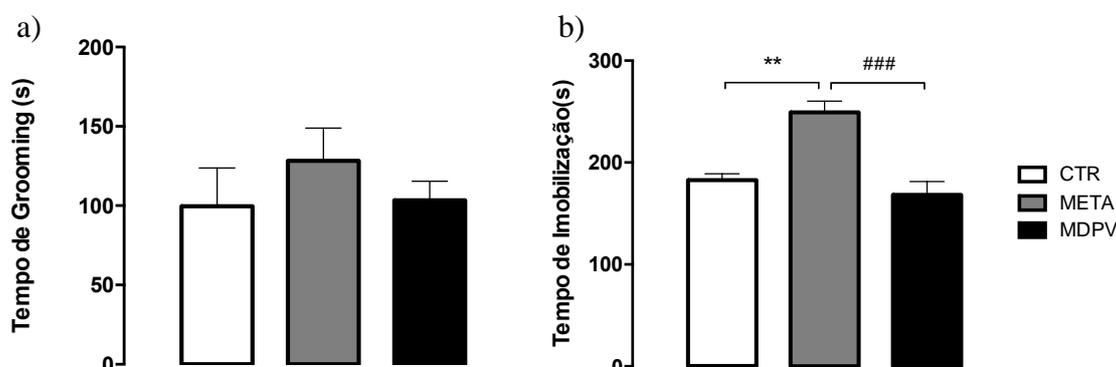


**Figure 1.30 Efeitos da META e MDPV no comportamento ansiogénico em murganhos.** A figura apresenta parâmetros que avaliam o comportamento relacionado com a ansiedade e a atividade locomotora 18h após a última injeção ( $4 \times 10 \text{mg/Kg}$ ) de META e MDPV, durante uma sessão de 5 minutos do teste EPM. As percentagens de (a) Tempo e (b) Entradas nos braços abertos para os grupos META e MDPV revelam uma tendência para menores níveis de ansiedade e o número de (c) Entradas nos braços fechados refletem uma menor atividade locomotora para os mesmos grupos. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM ( $n=8/9$ ) e são estatisticamente analisados pelo teste (a) Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ ) ((CTR ( $20.2 \pm 3.3$ ), META ( $29.2 \pm 9.5$ ), MDPV ( $28.0 \pm 6.6$ )); teste *one-way* ANOVA seguido do *post-hoc* Tukey (b) (CTR ( $24.8 \pm 3.6$ ), META ( $47.7 \pm 8.2$ ), MDPV ( $34.95 \pm 6.0$ )), (c) (CTR ( $13.5 \pm 0.9$ ), META ( $4.2 \pm 1.0$ ), MDPV ( $9.2 \pm 0.8$ )). (\*  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ )

Os testes ST e TS foram realizados para avaliar o comportamento emocional do tipo depressivo dos murganhos injetados com as duas toxinas, 18-24 horas após a injeção de META e de MDPV. Nenhuma das toxinas alterou o tempo que os murganhos passaram a fazer grooming (friccionar o nariz ou a face com as patas; lamber o pelo do corpo ou os genitais) relativamente aos animais controlo (figura 1.31 (a),  $p > 0.05$ ). Isto sugere que as toxinas não alteraram nem o auto-cuidado, nem o comportamento motivacional dos animais. No teste TST foi possível observar que a META, mas não a MDPV, aumentou significativamente o tempo de imobilização dos murganhos (figura 1.31 (b), \*\* $p < 0.01$  vs CTR, ###  $p < 0.001$  vs MDPV).

Apesar destes resultados obtidos no TST poderem sugerir um comportamento do tipo depressivo nos animais do grupo META, esta observação não foi acompanhada pelo teste de

*grooming*. Além disso, o aumento da imobilização no TS pode ser justificado com a possível existência de problemas locomotores previamente observados no EPM (figura 1.30 (c)).

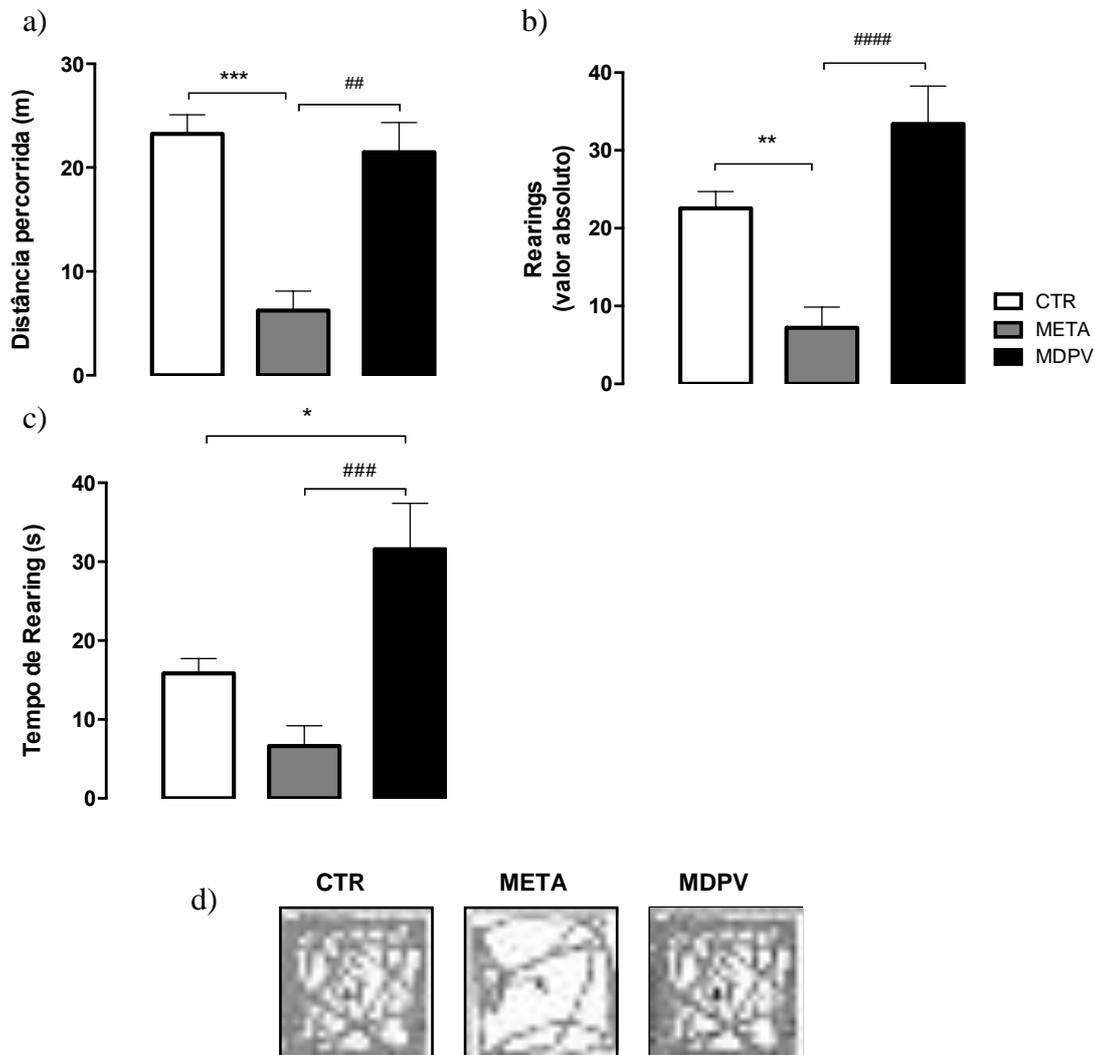


**Figure 1.31 Efeitos da META e MDPV no comportamento tipo depressivo em murganhos.** A figura apresenta os dados de (a) Tempo de *grooming* (s) obtidos no ST (5min) e (b) Tempo de imobilização (s) no teste de TS (6min) que atestam a existência de comportamento depressivo promovido pelas substâncias 18h após a última injeção (4×10mg/Kg). O comportamento tipo depressivo pareceu afetar o desempenho nos testes, com uma diferença significativa do tempo de imobilização para o grupo META. Os resultados estão expressos como médias ± SEM (n=7-9) e são estatisticamente analisados pelo teste (a) *one-way* ANOVA ( $p > 0.05$ ) (CTR (99.5±24.2), META (128.3±20.6), MDPV (103.4±11.9)); (b) Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* Dunn (CTR (182.4±6.3), META (249.3±10.9), MDPV (168.3±13.2)). (\*\* $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ )

### 3.1.3 Efeitos da META e da MDPV na atividade locomotora e exploratória em murganhos

O teste OF (5 minutos) foi realizado após o teste EPM para avaliar a possibilidade de existirem complicações na função locomotora e exploratória dos murganhos na sequência da administração das duas substâncias (4×10 mg/Kg, com intervalos de 2 horas). O teste OF permitiu observar que os animais do grupo META exibiram menor atividade locomotora espontânea exploratória relativamente aos animais controlo: foi medida uma diminuição superior a 50% na distância percorrida e no nº de *rearings* (figura 1.32 (a)  $p < 0.001$ , (b)  $p < 0.01$ , respetivamente). Saliente-se também que a atividade locomotora dos animais META é significativamente inferior aquela dos murganhos do grupo MDPV (figura 1.32 (a)  $p < 0.01$  vs MDPV). A redução do tempo que os murganhos do grupo META passaram a fazer *rearings* não foi estatisticamente significativa relativamente ao grupo controlo (figura 1.32 (c),  $p > 0.05$ ). A MDPV não alterou a distância percorrida comparativamente aos animais controlo (figura 1.32 (a),  $p > 0.05$ ). No entanto, esta toxina aumentou o tempo de *rearings* em comparação com

o controlo e com o grupo META (figura 1.32 (c),  $p < 0.05$  vs CTR,  $p < 0,001$  vs META). O painel d) ilustra o trajeto (figura 1.32 (d)).

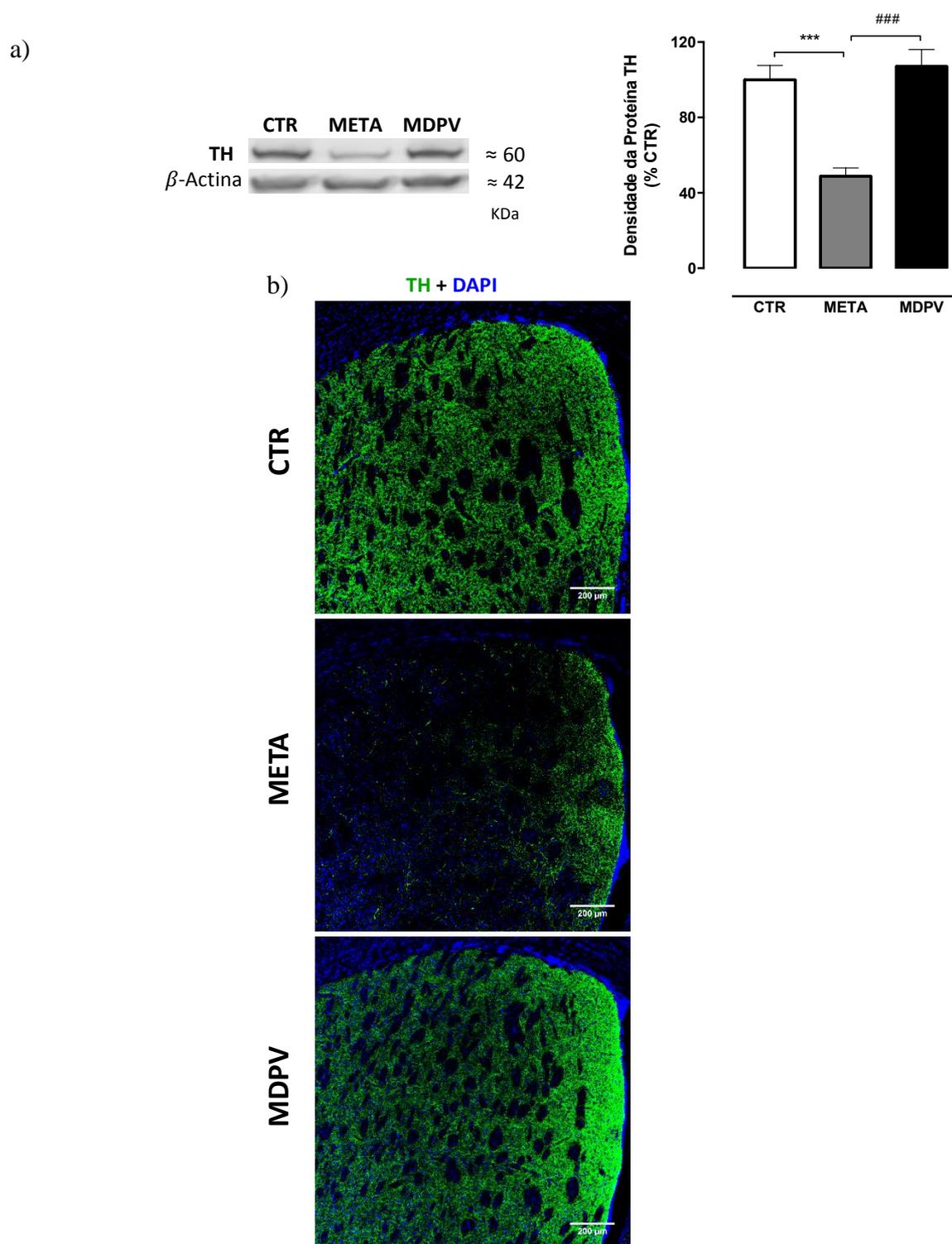


**Figure 1.32 Efeitos da META e MDPV na função locomotora e exploratória dos murganhos.** A figura apresenta parâmetros correspondentes à atividade locomotora/exploratória 18h após a última injeção ( $4 \times 10 \text{ mg/Kg}$ ) de META e MDPV, durante uma sessão de 5 minutos do teste OF. (a) Distância percorrida (m); (b) Número de *Rearings*; (c) Tempo de Rearing (s); (d) Trajeto representativo de cada grupo durante a sessão. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM ( $n=8/9$ ) e são estatisticamente analisados pelo teste (a) Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* Dunn (CTR,  $23.2 \pm 1.8$ ), META ( $6.2 \pm 1.9$ ), MDPV ( $21.5 \pm 2.9$ )); pelo teste *one-way* ANOVA seguido do *post-hoc* Tukey (b) (CTR,  $22.6 \pm 2.2$ ), META ( $7.2 \pm 2.7$ ), MDPV ( $33.4 \pm 4.9$ ), (c) (CTR,  $15.8 \pm 1.9$ ), META ( $6.6 \pm 2.6$ ), MDPV ( $31.6 \pm 5.7$ )). (#  $p < 0.05$ , \*\*/##  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ####  $p < 0.0001$ )

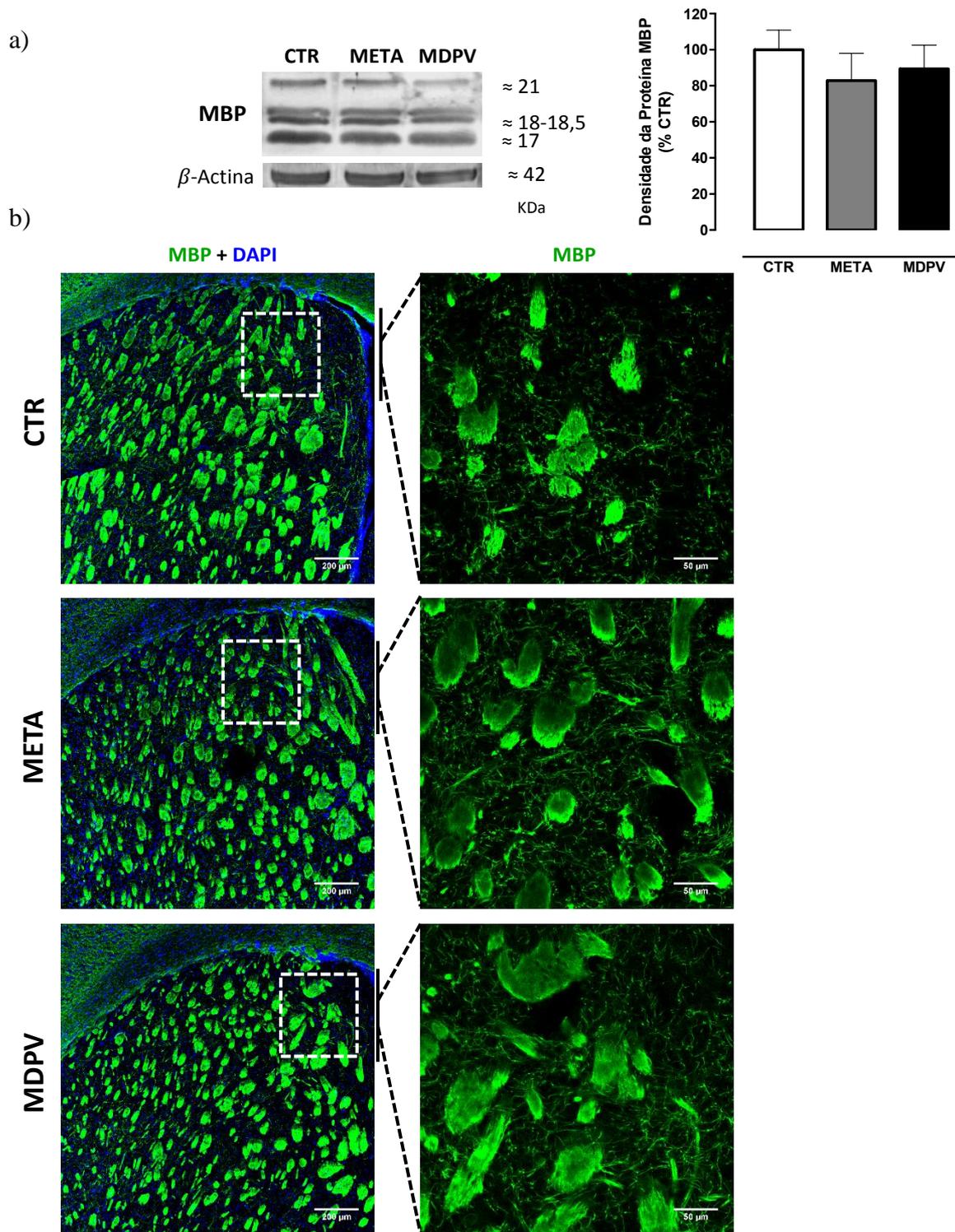
### 3.2 Efeitos da META e da MDPV em marcadores de neurotoxicidade estriatal – TH, mielina e gliose – em murganhos

A disfunção do sistema estriatal dopaminérgico representa uma das fases iniciais da neurotoxicidade provocada pela META<sup>41,42</sup>. Este parâmetro está mal caracterizado relativamente à MDPV. Com efeito, a META diminuiu significativamente a densidade de TH no estriado de murganhos (efeito superior a 50 %), 24 horas após a sua administração, tal como foi avaliado por WB e confirmado por IHC (figura 1.33 (a)  $p < 0.001$ , (b)). Isto confirma que a META perturbou as fibras dopaminérgicas estriatais. A MDPV não modificou significativamente a densidade de TH em comparação com o grupo controlo, de acordo com as análises por WB e IHC (figura 1.33 (a)  $p < 0.05$ , (b)). Importa referir que as avaliações por WB e IHC permitiram ainda observar que a densidade de TH no grupo da META é também significativamente menor do que aquela observada no grupo MDPV (figura 1.33 (a),  $p < 0.001$  vs MDPV).

A desmielinização é um processo que compromete a integridade neuronal e que está associada aos processos neurotóxicos provocados pelo consumo de META em humanos e animais<sup>55,278</sup>. Neste trabalho comparou-se a integridade da mielina nos grupos MDPV e META, medindo-se a densidade de MBP (*myelin basic protein*) por WB (em homogeneizados totais de estriado) e por IHC (em secções coronais de estriado). A Figura 1.34 (a) revela que nenhuma das toxinas alterou a densidade da MBP relativamente ao grupo controlo. A análise por IHC permitiu ainda verificar que não houve reorganização da mielina nas fibras marcadas por MBP em nenhum dos grupos experimentais em comparação com o grupo controlo (figura 1.34(b)).



**Figure 1.33 Efeitos da META e MDPV nos terminais dopaminérgicos estriatais em murganhos.** A figura reúne os resultados de WB e IHC para o indicador de toxicidade dopaminérgica (TH) 24h após o regime de administrações. (a) Densidade de TH (60KDa) por WB normalizada para  $\beta$ -actina (*loading*), com as bandas representativas de cada tratamento (*one-way* ANOVA seguido do *post-hoc* Tukey (\*\*\*/### $p < 0.001$ ) ( $n = 5-7$ )) (CTR ( $100.0 \pm 7.6$ ), META ( $48.7 \pm 4.45$ ), MDPV ( $107.1 \pm 8.9$ )). (b) IHC por microscopia confocal, mostram a marcação de TH em secções coronais estriatais representativas para cada grupo experimental. O DAPI marca DNA nuclear. Os resultados estão expressos como médias percentuais relativas ao CTR  $\pm$  SEM.



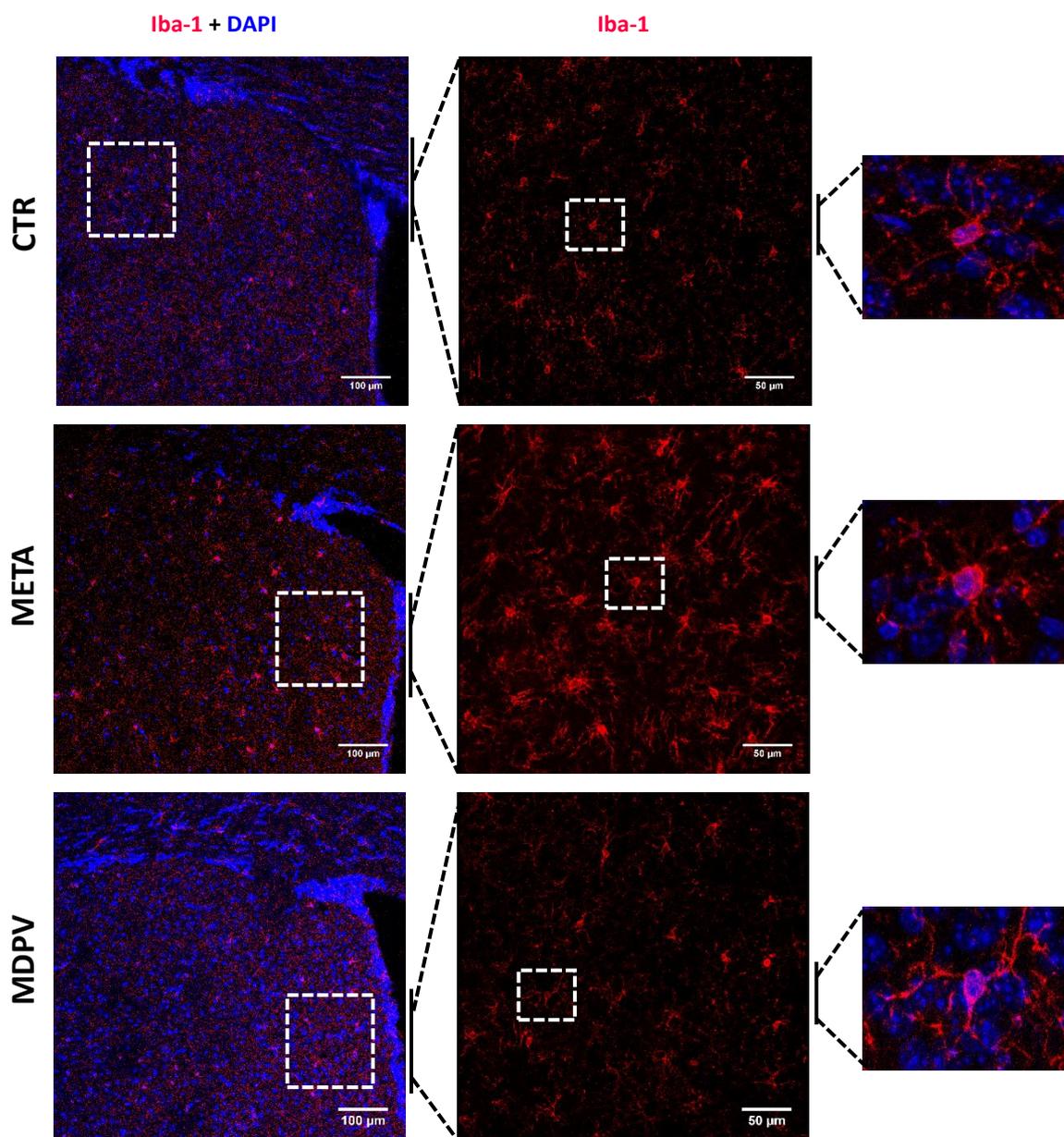
**Figure 1.34 Efeitos do tratamento com META e MDPV na MBP.** A figura reúne os resultados de WB e IHC para o marcador de desmielinização (MBP) 24h após o regime de administrações. (a) Densidade de MBP (21-17KDa) por WB normalizada para  $\beta$ - actina (*loading*), com as bandas em bloco representativas de cada tratamento (*one-way ANOVA* ( $p > 0.05$ ) ( $n = 5-7$ ) (quantificação individual de cada peso (21-17KDa) sem diferenças) (CTR ( $100.0 \pm 10.8$ ), META ( $82.9 \pm 15.1$ ), MDPV ( $89.3 \pm 13.1$ )). (b) IHC por microscopia confocal para cada tratamento com marcação de MBP em secções coronais estriatais, numa perspetiva geral e outra com maior ampliação. Os resultados estão expressos como médias percentuais relativas ao CTR  $\pm$  SEM.

A perturbação dos terminais dopaminérgicos induzida pela META é geralmente acompanhada por gliose que contribui para a neurotoxicidade desta droga<sup>41,279</sup>. O impacto da MDPV nas células da glia é pouco conhecido. Comparou-se, assim, o perfil de reatividade das microglias (Iba-1) e dos astrócitos (GFAP) induzido pelas drogas META e MDPV, 24h após a última injeção num regime de 4×10mg/Kg (2 horas de intervalo).

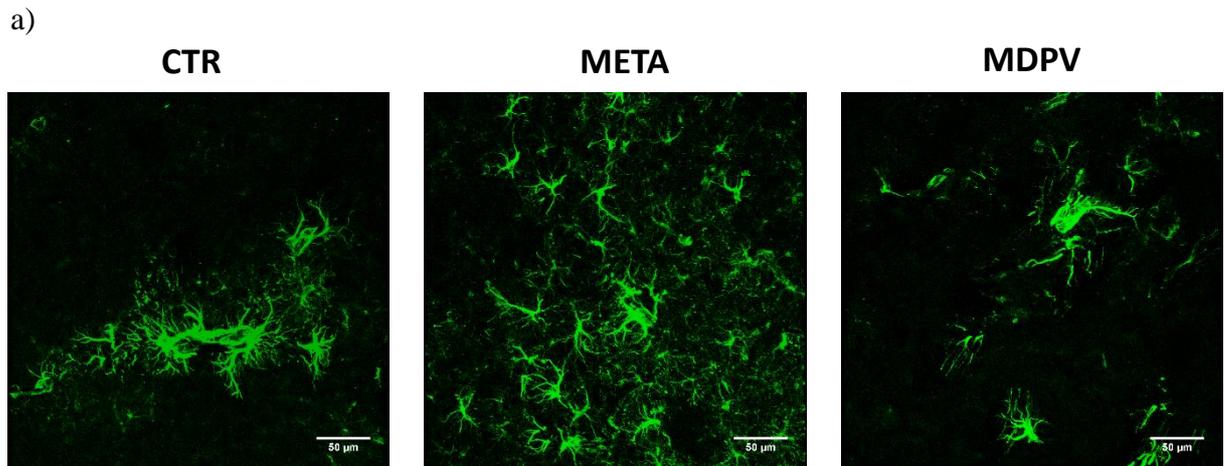
As imagens que permitem visualizar as microglias (por microscopia confocal) parecem sugerir uma maior imunorreatividade para Iba-1 nos seus corpos celulares no grupo da META relativamente ao grupo controlo (figura 1.35). As microglias parecem assim exibir um estado de ativação. Por outro lado, as imagens sugerem que a MDPV não alterou a imunorreatividade para Iba-1 em comparação com o grupo controlo. Os planos aproximados de células individuais para cada tratamento sugerem uma morfologia mais arredondada para o grupo META.

Relativamente aos astrócitos, a Figura 1.36 sugere que META aumentou a densidade de GFAP no grupo da META, relativamente ao grupo controlo. Por outro lado, a MDPV não alterou a imunorreatividade para GFAP em comparação com o grupo controlo (Figura 1.36). Isto sugere que a META, mas não a MDPV, induziu astrogliose.

Assim, a análise das microglias e dos astrócitos sugere que a MDPV, ao contrário da META, não produziu gliose, no tempo avaliado.



**Figure 1.35** Efeitos da META e MDPV na microglia estriatal em murganhos. A figura mostra a avaliação da densidade de Iba-1 por IHC, 24 horas após a última injeção de META e de MDPV ( $4 \times 10 \text{ mg/Kg}$ , com intervalos de 2 horas), em secções coronais estriatais representativas para cada grupo experimental. Os painéis da direita representam uma ampliação da área contida no quadrado desenhado nos painéis do centro e estes, por sua vez, resultam do quadrado nos painéis da esquerda. O DAPI marca DNA nuclear.



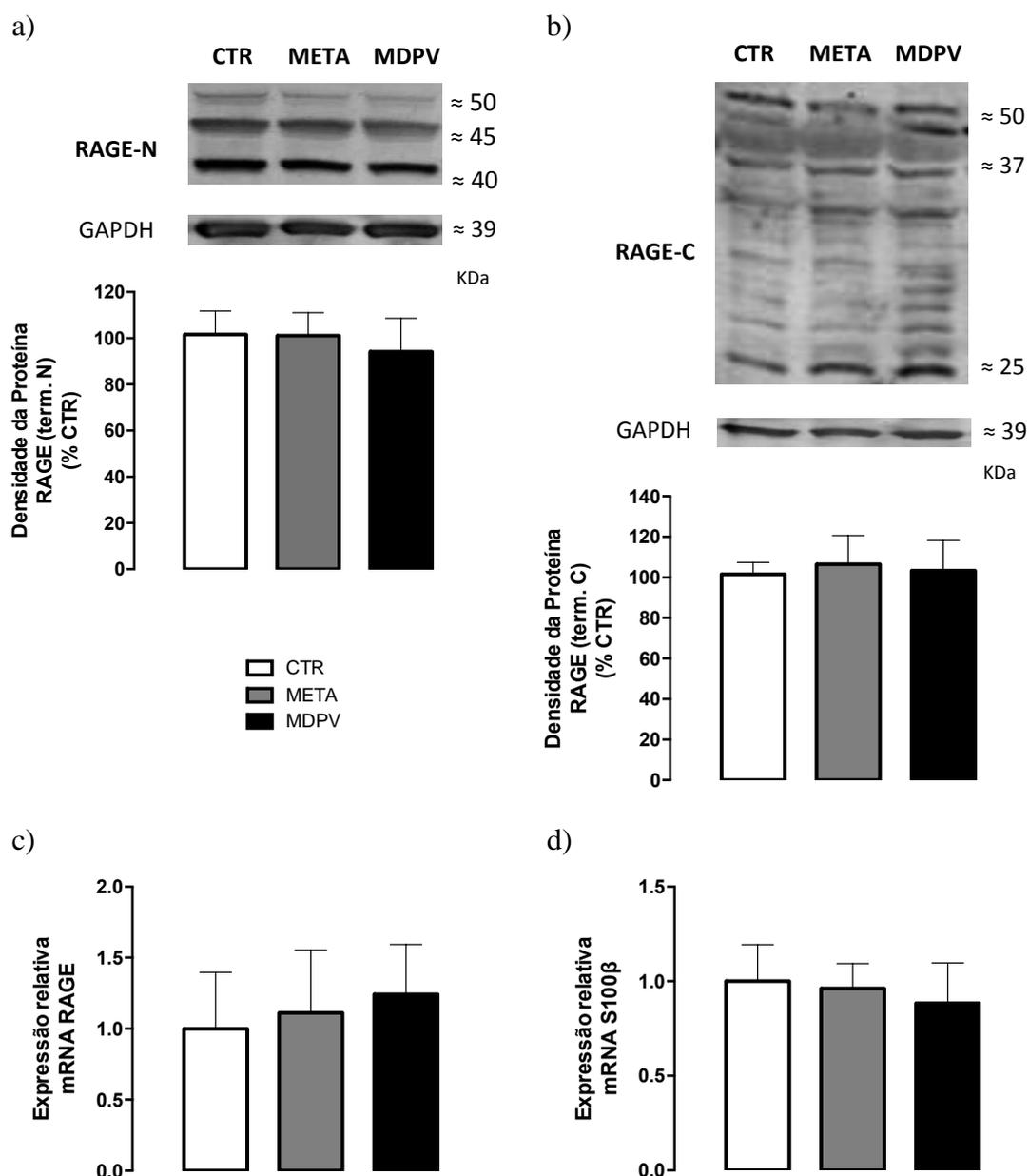
**Figure 1.36 Efeitos da META e MDPV nos astrócitos estriatais em murganho.** A figura mostra a avaliação da densidade de GFAP por IHC, 24 horas após a última injeção de META e de MDPV ( $4 \times 10 \text{ mg/Kg}$ , com intervalos de 2 horas), em secções coronais estriatais representativas para cada grupo experimental.

### 3.3 Efeitos da META e da MDPV no eixo S100 $\beta$ -RAGE em estriado de murganho

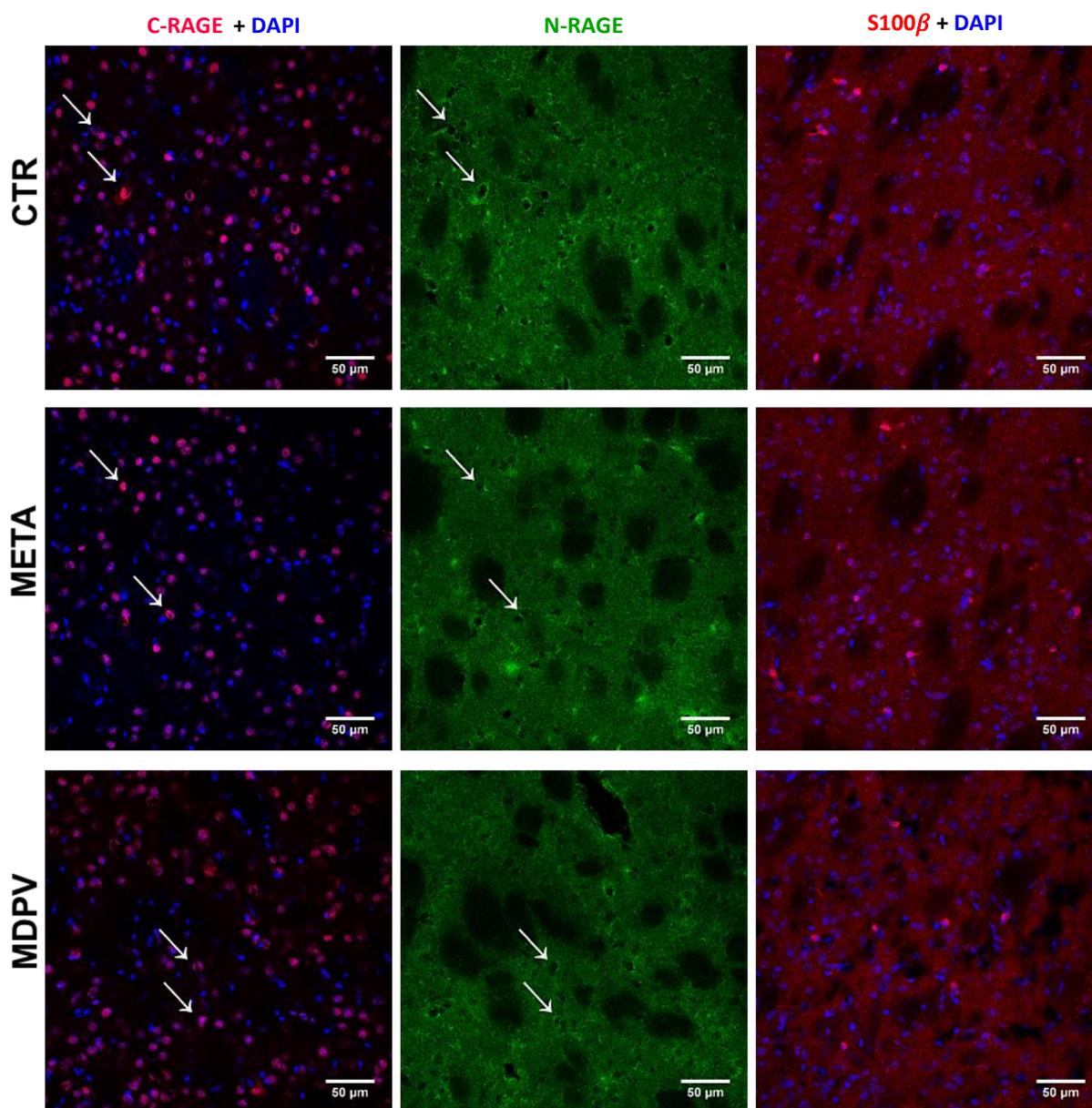
RAGE é um recetor associado ao SI Inato, sendo expresso por microglia e astrócitos. A proteína astrocítica S100 $\beta$  é agonista deste PRR e está envolvida em processos inflamatórios<sup>184,280</sup>. No entanto, o eixo S100 $\beta$ -RAGE é virtualmente desconhecido no contexto das drogas de abuso, incluindo os psicoestimulantes META e MDPV. Neste trabalho avaliou-se a expressão e a densidade do RAGE e do S100 $\beta$ .

Ao nível da expressão génica, os níveis de mRNA do RAGE não foram significativamente alterados por nenhuma das toxinas estudadas, em comparação com o grupo CTR (figura 1.37 (c) ( $p > 0.05$ )). Para avaliar a densidade proteica de RAGE, foram utilizados dois anticorpos que marcam duas porções distintas de RAGE (terminal N- e terminal C-). Ambos reconhecem a isoforma fRAGE. No entanto, o anticorpo anti-terminal C discrimina as isoformas N-truncadas, enquanto que, o anticorpo anti-terminal N reconhece as isoformas C-truncadas. Esta estratégia permite, assim, uma abordagem mais integrada da complexidade deste receptor<sup>275,281</sup>.

As Figuras 1.37 (a), (b) sugerem que nenhuma das toxinas utilizadas alterou de forma estatisticamente significativa a densidade das isoformas de RAGE com terminação C- (50-25KDa) e N- (50-40KDa) ( $p > 0.05$ ). Estas bandas foram quantificadas em conjunto. A quantificação de cada banda individualmente não alterou este cenário. Estes resultados foram confirmados por IHC em secções coronais de estriado (Figura 1.38). Com efeito, nenhuma das toxinas utilizadas alterou a imunorreatividade para RAGE. O anticorpo anti-terminal C exibiu marcação nuclear, enquanto que, o outro anticorpo permitiu ver marcação citosólica e, possivelmente no neurónio, nos animais do grupo controlo. Esta marcação é consistente com observações anteriores<sup>124</sup>. Nenhuma das toxinas utilizadas parece alterar a localização subcelular do RAGE. Finalmente, a marcação imunohistológica de S100 $\beta$  em secções coronais estriatais não sugere que haja diferenças entre os grupos estudados (figura 1.38). Isto é consistente com a não alteração da expressão do gene S100 $\beta$  pelas toxinas utilizadas (figura 1.37 (d) ( $p > 0.05$ )). Em conclusão, nenhuma das toxinas parece alterar a expressão e densidade do eixo S100 $\beta$ -RAGE no estriado 24 horas após a sua administração.



**Figure 1.37 Efeito da META e MDPV na expressão e densidade de RAGE e do seu ligando S100 $\beta$  no estriado de murganho.** A figura reúne os resultados de WB para as porções intra e extracelulares do RAGE e os dados de expressão genética para o recetor e para o S100 $\beta$  24h após o regime de administrações. (a) Densidade do RAGE com terminação N (50-40 KDa) por WB normalizada para GAPDH (*loading*), com as bandas representativas de cada tratamento (*one-way ANOVA* ( $p > 0.05$ ) ( $n = 6-8$ )). (b) Densidade do RAGE com terminação C (50-25 KDa) por WB normalizada para GAPDH (*loading*), com as bandas representativas de cada tratamento (*one-way ANOVA* ( $p > 0.05$ ) ( $n = 6-8$ )). (c)(d) Expressão genética avaliada por RT-qPCR do RAGE (CTR ( $1.00 \pm 0.39$ ), META ( $1.11 \pm 0.44$ ), MDPV ( $1.24 \pm 0.35$ ), ( $n = 4$ )) e do S100 $\beta$  (CTR ( $1.00 \pm 0.19$ ), META ( $0.96 \pm 0.13$ ), MDPV ( $0.88 \pm 0.21$ ), ( $n = 4-5$ )), respetivamente. Os resultados estão expressos como médias percentuais relativas ao CTR  $\pm$  SEM. (quantificação individual às bandas dos Blots do RAGE-N/C sem alterações)



**Figure 1.38** Efeitos da META e MDPV na marcação imunohistoquímica de RAGE (terminação N- e C-) e de S100 $\beta$  no estriado de murganho. A figura reúne imagens de IHC por microscopia confocal com marcação em secções coronais estriatais para as isoformas do RAGE com terminações N- e C- e para o seu ligando S100 $\beta$ . No mesmo plano de aquisição, está destacado o padrão de marcação das duas porções de RAGE, com a porção C- a marcar nos núcleos e a porção N- em torno.



# ***Capítulo IV***

*Discussão*



## 4 Discussão

As catinonas sintéticas são *Designer drugs* que pretendem mimetizar os efeitos produzidos pelos psicoestimulantes clássicos, sendo disponibilizadas em qualquer mercado clandestino, a custos inferiores e com promessas de euforia extrema.<sup>3</sup> O uso destas drogas tem sido associado a comportamentos violentos, ansiedade extrema, alucinações, paranoia, casos de psicose, intoxicação e problemas cognitivos<sup>3,4,282</sup>, consequências que despertaram a atenção para este tipo de moléculas.

A MDPV é a catinona que recorrentemente se destaca em análises qualitativas e quantitativas de várias marcas de *Bath salts*<sup>1</sup>, tendo-se revelado um composto extremamente aditivo e potente quando comparado com psicoestimulantes clássicos, como a cocaína ou a META<sup>72,83</sup>. Os efeitos estimulantes produzidos por esta substância parecem ser justificados pelo seu impacto no sistema dopaminérgico, mimetizando os efeitos da META, mesmo que exibindo um mecanismo de ação equivalente ao da cocaína<sup>83</sup>. Apesar dos vários estudos mecanísticos e farmacológicos relativamente à MDPV, existe uma lacuna de informação em vários aspetos. Neste sentido, este projeto pretendeu contribuir para a compreensão da farmacodinamia/toxicodinamia desta droga, recorrendo a uma análise comparativa de aspetos ainda não documentados, utilizando a META como controlo positivo - o ATS mais comum e mais neurotóxico<sup>15</sup>.

A presente dissertação teve os seguintes objetivos: a caracterização das alterações emocionais e locomotoras, caracterização de marcadores neurotóxicos e do eixo S100 $\beta$ -RAGE no estriado em murganhos (C57BL/6), 24h após um regime de 4 administrações ip. de MDPV e META (10mg/Kg) intercaladas por 2h. Este protocolo experimental pretende mimetizar um regime de *binging* por administração intravenosa que é comum em consumidores de drogas de abuso. Adicionalmente, este protocolo é frequentemente utilizado em estudos com META, visto que causa perturbações robustas no sistema dopaminérgico estriatal (um dos parâmetros de neurotoxicidade que se pretendeu avaliar)<sup>261</sup>. A janela temporal escolhida (24 horas) pretendeu olhar para a fase inicial da putativa neurotoxicidade imposta pelas drogas testadas

### **MDPV e META: perfil comportamental**

O primeiro objetivo deste trabalho foi averiguar o comportamento emocional e locomotor dos murganhos nas 24 h após administração dos dois psicoestimulantes. Estudos clínicos relatam que o abuso crónico de META está associado a distúrbios psiquiátricos como a

depressão e ansiedade durante a fase aguda da abstinência (segunda semana)<sup>59</sup>. A depressão parece prolongar-se pelos anos seguintes, com menor severidade<sup>283,284</sup>. No entanto, não há nenhuma informação sobre o estado emocional dos murganhos na fase inicial da neurotoxicidade induzida pela META. Adicionalmente, a impressão digital emocional da MDPV é virtualmente desconhecida.

No teste EPM, que visou caracterizar o comportamento do tipo-ansioso, o parâmetro do número de entradas nos braços fechados (indicativo de possíveis perturbações locomotoras) sugeriu que os animais do grupo META apresentavam uma acentuada disfunção locomotora ( $p < 0.0001$ ) em comparação com os animais controlo. Esta informação foi confirmada pelo teste OF que revelou que os animais do grupo da META exibiram menor atividade locomotora espontânea do que os animais controlo ( $p < 0.001$ ). Assim, as alterações locomotoras impostas pela META mascararam a avaliação emocional dos murganhos e não permitiram a valorização do aumento da percentagem de entrada nos braços abertos significativamente nestes murganhos em comparação com os controlos ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente, este parâmetro não foi acompanhado por um aumento estatisticamente significativo do tempo passado nos braços abertos pelos murganhos do grupo da META ( $p > 0.05$  vs CTR). Por outro lado, a MDPV não parece ter alterado os parâmetros associados a um comportamento do tipo-ansioso em comparação com os murganhos controlo (percentagem e tempo passado nos braços abertos,  $p > 0.05$ ). O teste EPM também parece sugerir alterações locomotoras no grupo da MDPV. No entanto, estas são menos robustas das que foram observadas para a META ( $p < 0.05$  VS CTR e  $p < 0.01$  VS META) e não foram confirmadas pelo teste OF que analisa especificamente a atividade locomotora. O teste EPM parece assim sugerir que a MDPV não alterou o perfil emocional do tipo ansioso nos murganhos. Para além do perfil do tipo-ansioso, quisemos caracterizar o perfil emocional do tipo-depressivo associado ao consumo destes fármacos, utilizando-se os testes ST e TS, já previamente utilizados no nosso laboratório<sup>263,266</sup>. No presente trabalho, os resultados obtidos por estes testes foram discordantes: o TS mostrou um tempo de imobilização significativamente superior para o grupo META em comparação com o controlo ( $p < 0.001$ ); por outro lado, o ST não revelou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos da META e controlo ( $p > 0.05$ ). Os resultados obtidos no teste TS são consistentes com observações prévias do nosso grupo que mostraram que os murganhos exibiram um aumento do tempo de imobilização 3 e 49 dias após a administração de uma dose neurotóxica de META (30mg/Kg,ip.)<sup>266</sup>. Por outro lado, a ausência de alterações no tempo de *grooming* nos animais do grupo da META são inconsistentes com resultados prévios do nosso grupo: 3 dias após a administração de uma dose neurotóxica de META (30mg/Kg,ip.), os

animais exibiram menor tempo de grooming relativamente aos animais controle<sup>57</sup>. De novo, as perturbações locomotoras podem também perturbar a avaliação do perfil emocional do tipo depressivo nos animais injetados com META. Além disso, estas perturbações locomotoras podem contribuir para o aumento de tempo de imobilidade medido no teste TS, para o grupo da META.

Relativamente à MDPV, os testes ST e TS parecem sugerir ausência de um perfil de tipo depressivo associado a esta toxina ( $p > 0.05$  VS CTR).

Não há literatura científica que descreva os fenótipos do tipo depressivo e ansioso em modelos animais tratados com MDPV. No entanto, sendo um psicoestimulante com elevado potencial de abuso, já foram descritos em humanos quadros clínicos de sintomas profundos de ansiedade, durante/após o efeito e na fase de desejo de consumo incontrolável (*craving*), acompanhados por uma sensação de enorme “vazio” (sintoma depressivo) durante a abstinência<sup>3,4,285</sup>.

A menor distância percorrida pelos animais do grupo da META cerca 18 horas após a administração desta toxina é consistente com a hipolocomoção observada 24 horas após a administração de dois protocolos com META (30mg/Kg ip. e 4×10mg/Kg, com intervalos de 2 horas, i.p)<sup>57,286</sup> em murganhos C57BL/6. Esta hipolocomoção pode ter contribuído para a menor atividade exploratória observada nos animais do grupo da META tal como sugerido pelo menor número de *rearings* medido para este grupo ( $p < 0.01$  VS CTR e  $p < 0.0001$  VS MDPV).

Relativamente à MDPV, apenas estão descritos os efeitos de hiperlocomoção, de atividade exploratória e de estereotipia em murganhos e ratos, que foram observados durante o efeito psicoativo agudo da droga e que parecem assemelhar-se aos efeitos da META (protocolos incluindo a dose única de 10mg/Kg)<sup>92,93,287,288</sup>. Porém, não há qualquer informação sobre o efeito do MDPV na locomoção ao fim de 18-24 horas após a administração de MDPV. No presente trabalho mostrou-se que o grupo administrado com MDPV não exibiu qualquer alteração na atividade locomotora no OF, no entanto, apresentou um maior tempo de *rearings* ( $p < 0.05$ ) do que o grupo CTR. Estes resultados sugerem que a hiperlocomoção observada inicialmente na fase aguda da intoxicação com MDPV se desvanece, mantendo-se a atividade exploratória. Este incremento na atividade exploratória pode sugerir um estado de agitação frequentemente descrito por consumidores de *Bath salts*.<sup>289</sup> Por outro lado, a intensa hipolocomoção e perda de atividade exploratória observada nos animais do grupo da META pode ser a impressão digital comportamental da neurotoxicidade dopaminérgica observada para a META. De forma distinta, o *binging* com a MDPV não está associado a toxicidade dopaminérgica (ver secção **MDPV e META: perfil neurotóxico**).

Em suma, os testes comportamentais revelaram uma acentuada disfunção motora nos animais administrados com a META e um aumento da exploração nos animais injetados com a MDPV. Este perfil exploratório não está associado a nenhuma perturbação emocional do tipo depressivo ou ansioso. Finalmente, é plausível assumir que o MDPV e a META afetam de formas distintas os circuitos neuronais no estriado, córtex frontal e na amígdala que regulam a atividade locomotora e exploratória.

#### **MDPV e META: perfil neurotóxico**

Neste trabalho comparou-se também o perfil neurotóxico da META e da MDPV, olhando-se para o TH (marcador dopaminérgico), para as microglias (Iba-1), astrócitos (GFAP), e mielina (MBP). O perfil comportamental associado à META sugeriu que este psicoestimulante seja mais neurotóxico do que a MDPV. Com efeito, neste trabalho ficou claro que a META produziu uma disrupção dos terminais dopaminérgicos estriatais que foi acompanhada por microgliose e astrogliose, 24 horas após a administração desta toxina. Ao contrário, a MDPV não impôs quaisquer alterações nem nos terminais dopaminérgicos nem nas glias.

A respeito dos terminais dopaminérgicos, uma análise por WB revelou, como esperado, um decréscimo da densidade da TH no estriado no grupo META às 24h, tendo sido este superior a 50% relativamente ao grupo CTR ( $p < 0.001$ ) e ao MDPV ( $p < 0.001$ ) ( $n = 5-7$ ); não houve nenhuma alteração de TH no grupo MDPV quando comparado com o CTR. Estas evidências foram corroboradas pela análise à imunorreatividade para TH por IHC em secções coronais do estriado. No caso da MBP, não observámos quaisquer diferenças (WB/IHC) entre os grupos experimentais.

A toxicidade dopaminérgica observada neste trabalho está de acordo com a literatura (depleção de  $\approx 60\%$  obtida em O'Callaghan et al. (1994)<sup>290</sup>), servindo como controlo positivo validado para os efeitos da MDPV. Apesar da META ter imposto neurotoxicidade às fibras dopaminérgicas, não parece ter promovido desmielinização das fibras estriatais, visto que a densidade de MBP não foi estatisticamente diferente dos valores obtidos para o grupo controlo (WB/IHC). Esta observação não é consistente com a desmielinização observada por Bowyer et al. (2008)<sup>41</sup> na fase inicial da neurotoxicidade estriatal associada à META. No entanto, estes autores recorreram a um corante (Black-Gold-II) que cora diferentes componentes da mielina, incluindo fosfolípidos e lipoproteínas<sup>291</sup>, permitindo identificar alterações com uma elevada resolução e contraste mesmo nas fibras mais pequenas, ao contrário da marcação específica imunohistoquímica da MBP. Não podemos, assim, excluir a hipótese segundo a qual a marcação da MBP com o seu anticorpo específico pode não ser suficiente para avaliar alterações finas na mielina nesta fase inicial do processo neurotóxico. Assim, o impacto da

META na mielina requer uma reavaliação no futuro, recorrendo a anticorpos que reconhecem outras proteínas constituintes da mielina: MAG, *myelin-associated glycoprotein*; CNPase, nucleotídeo fosfodiesterase; PMP22, *peripheral myelin protein 22*<sup>292</sup>.

No caso do MDPV, não foram detetados sinais de lesão nas fibras estriatais na mesma janela temporal; este parâmetro nunca fora explorado anteriormente. Na verdade, existem apenas dois estudos sobre a avaliação da toxicidade dopaminérgica 48 horas após a exposição de 1mg/Kg×4 (2/2h) de MDPV em murganhos C57BL/6 machos<sup>293</sup> e 10mg/Kg×4 (2/2h) de MDPV em murganhos C57BL/6 fêmeas<sup>86</sup>, que concluíram não haver alterações ao nível da TH, da DA e do DAT. Quanto ao efeito do MDPV na mielina, também não foram detetadas quaisquer alterações para este período, sendo um parâmetro nunca antes avaliado. Sugerem-se assim estudos futuros que avaliem adicionalmente a função dos oligodendrócitos e estado da mielinização das fibras para os dos psicoestimulantes<sup>294</sup>.

Em conclusão, o perfil de toxicidade nas fibras dopaminérgicas do MDPV, 24h após a exposição *in vivo* de 4×10mg/Kg, parece não ser tão severo (comparado com a META) quer na densidade da TH nas fibras dopaminérgicas, como ao nível da densidade de MBP nas fibras nervosas. Quanto ao primeiro ponto, podem salientar-se algumas propriedades intrínsecas à molécula que tendem para este resultado. Primeiro, pelo próprio mecanismo de ação, sendo um bloqueador do DAT à partida não tem oportunidade para interagir com os alvos intracelulares de forma tão rápida quanto a META (substrato), não produzindo efeitos de toxicidade dopaminérgica tão precocemente. Segundo, a elevada lipofilicidade do MDPV, com um presumível transporte ativo transendotelial<sup>6</sup>, contribui para um reduzido tempo de semi-vida ( $\approx 2h$ )<sup>80</sup> comparativamente à META ( $\approx 10h$ )<sup>32</sup>, diminuindo o tempo provável de exposição dos alvos à droga. Por último, a molécula não tem afinidade para o recetor VM2A ao contrário da META, o que apoia a hipótese do MDPV não atuar diretamente em alvos intracelulares<sup>84</sup>.

Relativamente à microgliose, a marcação imunohistológica mostra uma marcação da Iba-1 mais intensa em torno de corpos celulares de microglias para o grupo META. No caso da MDPV, não foi sugerida qualquer alteração nas secções coronais estriatais. Estes resultados sugerem microgliose para a META, sendo que estudos anteriores confirmam esta observação utilizando um protocolo idêntico<sup>41</sup>. Futuramente, analisar-se-á o comprimento e densidade do esqueleto das microglias e utilizaremos marcadores específicos da reatividade microglial para melhor caracterizar o seu estado de ativação para ambas as toxinas.

Avançando para a caracterização dos astrócitos, este estudo sugere que a META produziu astrogliose, tal como descrito anteriormente. Por exemplo, O'Callaghan et al.<sup>290</sup> mostrou que um protocolo idêntico de administração de META aumentou os níveis de GFAP (150% do

controle, ELISA) 24 horas após exposição a META. Outros autores já descreveram que o máximo de sobre-expressão de GFAP acontece 2 dias após dosagens neurotóxicas de META<sup>42</sup>. De novo, o MDPV não parece ativar os astrócitos. Isto é consistente com a não ativação das microglias para esta toxina. Outros marcadores de astrócitos devem ser usados para melhor caracterizar o impacto da MDPV neste tipo celular.

#### **MDPV e META: eixo S100 $\beta$ -RAGE**

Os recetores RAGE têm um papel importante nos mecanismos de neuroinflamação, incluindo a ativação glial<sup>295</sup>. Os mecanismos que garilham a gliose pela META não são conhecidos, embora se saiba que estes contribuem para a desregulação de múltiplos genes pró-inflamatórios, incluindo genes da família S100 $\beta$ <sup>296</sup>. O último objetivo foi a caracterização da densidade proteica estriatal do RAGE, através de dois anticorpos que distinguem isoformas do recetor truncadas na terminação N- ou na terminação C-, e a identificação de possíveis alterações na expressão génica do recetor e do seu ligando, S100 $\beta$ . Não foram detetadas quaisquer variações na expressão génica ou densidade proteica destas estruturas, confirmadas também pela marcação imunohistoquímica destas proteínas. O nosso grupo, já havia demonstrado a inexistência de alterações ao nível da densidade de RAGE no estriado 3 dias após um regime de intoxicação de META (30mg/Kg)<sup>57</sup>. Assim, não é surpreendente que nem o MDPV, nem a META, induzam alterações na expressão génica e na densidade proteica do RAGE e do seu ligando S100 $\beta$ , dentro de um período de 24 horas após um regime neurotóxico.

Refletindo sobre toda a informação produzida neste projeto, primeiramente importa destacar a coerência dos nossos dados com a informação já disponível para os efeitos neurotóxicos da META, no período de 24 horas. Com este regime neurotóxico foi possível observar reatividade das células gliais que acompanha a acentuada depleção de TH. Alguns estudos chegam a afirmar que o fenótipo pró-inflamatório nos astrócitos é induzido principalmente por esta toxicidade dopaminérgica inicial, com aumentos significativos de GFAP localizados apenas no estriado<sup>290</sup>. Adicionalmente, ao longo do tempo a disrupção do sistema dopaminérgico tem sido sugerida como um dos efeitos neurotóxicos que mais contribuem para os défices nas funções executivas motoras associadas ao consumo crónico de META, quer em humanos como em animais<sup>297-299</sup>.

Relativamente ao propósito principal desta dissertação, os dados científicos obtidos resultam numa caracterização nunca antes construída em torno da *Designer drug* – MDPV. Através da abordagem comparativa entre as duas drogas, conseguimos traçar um perfil de toxicidade para o SNC nas primeiras 24 horas. Primeiramente, os testes locomotores não identificam alterações nos vários parâmetros avaliados, acompanhados pelo aparente estado normal das fibras,

incluindo as dopaminérgicas e das células gliais. Os resultados parecem sugerir que o MDPV não parece ser tão neurotóxico como a META, nas primeiras 24 horas após um regime de *binging*.

No entanto, devemos destacar algumas evidências que podem criar um cenário mais dramático a longo prazo. Estudos quantitativos da relação estrutura-atividade (SAR) definiram a lipofilicidade e o volume do MDPV, proporcionados pela cadeia  $\alpha$ -alquílica e pelo anel da pirrolidina<sup>300</sup>, como as condições ideais para uma forte interação com o DAT<sup>301</sup>. Isto pode traduzir-se por uma constante de ligação ao DAT maior do que a da META<sup>6</sup>. Esta forte interação provavelmente contribui para uma cinética mais lenta do MDPV, com uma maior acumulação no meio extracelular disponível para iniciar ciclos de oxidação-redução, que contribuem para a formação de espécies reativas. Esta situação é facilitada também pela maior polarizabilidade do MDPV em relação à META ( $\approx 30 \times 10^{-24} \text{ \AA}^{23}$  e  $\approx 19 \times 10^{-24} \text{ \AA}^{23}$ , respetivamente).<sup>23</sup> Por outro lado, há estudos *in vitro* que mostram a capacidade da molécula produzir RNS e ROS mesmo a pequenas concentrações, com potencial de destabilizar a BHE<sup>302</sup>, o sistema glutamatérgico e os processos de respiração celular<sup>87</sup>. A interação do MDPV com outros sítios de ligação, para além do transportador de DA, podem contribuir para uma maior aglomeração do neuromodelador na fenda sináptica<sup>83</sup>, contribuindo para os efeitos nefastos do stress oxidativo.

No futuro, caracterizar-se-á os mesmos parâmetros de neurotoxicidade utilizando diferentes concentrações de MDPV e outras janelas temporais. Olharemos também para marcadores seletivos de neuroinflamação e de stress oxidativo para oferecermos uma caracterização mais global do impacto do MDPV no estriado.



# ***Capítulo V***

*Conclusão*



## 5 Conclusão

A presente dissertação apresenta um estudo inovador de caracterização comportamental e neurotóxica da ação, nas primeiras 24h, de uma dose total de 40mg/Kg de MDPV. Para tal, adotou-se uma abordagem comparativa, utilizando a mais comum e agressiva droga dopaminérgica, a META.

Os objetivos traçados foram cumpridos e resultaram na percepção de um perfil comportamental/neurotóxico ligeiro relativamente aos efeitos da MDPV, nas condições estudadas. Esta droga não produz défices motores e neuronais tão profundos como a droga de referência. Adicionalmente, também parece não interferir na expressão do recetor da imunidade inata, RAGE.

Apesar desta conclusão, parâmetros anteriormente estudados denunciam o perigo que esta droga representa e que devem ser contemplados num projeto futuro para o mesmo protocolo adotado na dissertação.



## Referências

1. Spiller HA., Ryan ML., Weston RG. and Jansen J.; *Clin Toxicol* **2011**;49 (6):499-505. doi:10.3109/15563650.2011.590812.
2. Nelson ME., Bryant SM. and Aks SE.; *Emerg Med Clin North Am* **2014**;32 (1):1-28. doi:10.1016/j.emc.2013.09.001.
3. Karila L., Megarbane B., Cottencin O. and Lejoyeux M.; *Curr Neuropharmacol* **2015**;13 (1):12-20. doi:10.2174/1570159X13666141210224137.
4. Kesha K., Boggs CL., Ripple MG., et al.; *J Forensic Sci* **2013**;58 (6):1654-9. doi:10.1111/1556-4029.12202.
5. Prakash MD., Tangalakis K., Antonipillai J., Stojanovska L., Nurgali K. and Apostolopoulos V.; *Pharmacol Res* **2017**;120 :60-7. doi:10.1016/j.phrs.2017.03.009.
6. Simmler L., Buser T., Donzelli M., et al.; *Br J Pharmacol* **2013**;168 (2):458-70. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02145.x.
7. De Pasquale A.; *J Ethnopharmacol* **1984**;11 (1):1-16. doi:10.1016/0378-8741(84)90092-8.
8. Sneader WE.; In: *Van Nostrand's Scientific Encyclopedia*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2007:1-15. doi:10.1002/9780471743989.vse9887.
9. UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime.; **2008**:1-101. [https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/Studies/100\\_Years\\_of\\_Drug\\_Control.pdf](https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/Studies/100_Years_of_Drug_Control.pdf).
10. Anglin MD., Burke C., Perrochet B., Stamper E. and Dawud-Noursi S.; *J Psychoactive Drugs* **2000**;32 (2):137-41. doi:10.1080/02791072.2000.10400221.
11. Heal DJ., Smith SL., Gosden J. and Nutt DJ.; *J Psychopharmacol* **2013**;27 (6):479-96. doi:10.1177/0269881113482532.
12. Henderson G.; *J Forensic Sci* **1988**;33 (2):569-75. <https://erowid.org/archive/rhodium/chemistry/designer.drugs.history.html>.
13. Teixeira-Gomes A., Costa VM., Feio-Azevedo R., Bastos M de L., Carvalho F. and Capela JP.; *Int J Dev Neurosci* **2015**;41 :44-62. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.12.001.
14. UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime.; *World Drug Report 2011*. **2011**. <https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2011/WDR2011-ExSum.pdf>.
15. UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime.; **2016**:52-61.
16. UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime.; *The Challenge of New Psychoactive Substances (A Report from the Global SMART Programme)*. **2013**. [http://www.unodc.org/documents/scientific/NPS\\_2013\\_SMART.pdf](http://www.unodc.org/documents/scientific/NPS_2013_SMART.pdf).
17. Miliano C., Serpelloni G., Rimondo C., Mereu M., Marti M. and De Luca MA.; *Front Neurosci* **2016**;10 . doi:10.3389/fnins.2016.00153.
18. SICAD - Serviço de intervenção aos comportamentos Aditivos e nas Dependências.; **2015**:1-186.
19. EMCDDA - European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.; **2015**:24. doi:10.2810/932574.
20. *Global Drug Survey*. <https://www.globaldrugsurvey.com/>. Accessed 25/25/2017.
21. EMCDDA - European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.; *European Drug Report 2016: Trends and Developments*. **2016**. doi:10.2810/88175.
22. EMCDDA - European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.;

- Methamphetamine Drug Profile*. <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/methamphetamine>. Accessed 15/15/2017.
23. Royal Society of Chemistry.; *ChemSpider*. <http://www.chemspider.com/>. Accessed 5/5/2017.
  24. Jirovský D., Lemr K., Sevcík J., Smysl B. and Stránský Z.; *Forensic Sci Int* **1998**;96 (1):61-70. doi:10.1016/S0379-0738(98)00104-2.
  25. McAvoy BR.; *J Prim Health Care* **2009**;1 (3):170-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20690379>.
  26. Cook CE., Jeffcoat AR., Hill JM., et al.; *Drug Metab Dispos* **1993**;21 (4):717-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8104133>.
  27. Harris D.; *Clin Pharmacol Ther* **2003**;74 (5):475-86. doi:10.1016/j.clpt.2003.08.002.
  28. Cook CE., Jeffcoat AR., Sadler BM., et al.; *Drug Metab Dispos* **1992**;20 (6):856-62. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328215003014>.
  29. Kim I., Oyler JM., Moolchan ET., Cone EJ. and Huestis M a.; *Ther Drug Monit* **2004**;26 (6):664-72. doi:10.1097/00007691-200412000-00013.
  30. Huestis MA., and Cone EJ.; *Ann N Y Acad Sci* **2007**;1098 (1):104-21. doi:10.1196/annals.1384.038.
  31. Volkow ND., Fowler JS., Wang G-J., et al.; Hashimoto K, ed. *PLoS One* **2010**;5 (12):e15269. doi:10.1371/journal.pone.0015269.
  32. Cruickshank CC., and Dyer KR.; *Addiction* **2009**;104 (7):1085-99. doi:10.1111/j.1360-0443.2009.02564.x.
  33. Liechti M.; *Swiss Med Wkly* **2015**;(January):1-12. doi:10.4414/smw.2015.14043.
  34. Fowler JS., Volkow ND., Logan J., et al.; *Neuroimage* **2008**;43 (4):756-63. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.07.020.
  35. Sulzer D.; *Neuron* **2011**;69 (4):628-49. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.010.
  36. Sulzer D., Sonders MS., Poulsen NW. and Galli A.; *Prog Neurobiol* **2005**;75 (6):406-33. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.04.003.
  37. Sitte HH., and Freissmuth M.; *J Neurochem* **2010**;112 (2):340-55. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06474.x.
  38. Cameron KN., Solis E., Ruchala I., De Felice LJ. and Eltit JM.; *Cell Calcium* **2015**;58 (5):457-66. doi:10.1016/j.ceca.2015.06.013.
  39. Gibb JW., and Kogan FJ.; *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1979**;310 (2):185-7. doi:10.1007/BF00500283.
  40. Haughey HM., Fleckenstein AE. and Hanson GR.; *J Neurochem* **1999**;72 (2):661-8. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0720661.x.
  41. Bowyer JF., Robinson B., Ali S. and Schmued LC.; *Synapse* **2008**;62 (3):193-204. doi:10.1002/syn.20478.
  42. Zhu JPQ., Xu W. and Angulo JA.; *Brain Res* **2005**;1049 (2):171-81. doi:10.1016/j.brainres.2005.04.089.
  43. Eisch AJ., Gaffney M., Weihmuller FB., O'Dell SJ. and Marshall JF.; *Brain Res* **1992**;598 (1-2):321-6. doi:10.1016/0006-8993(92)90201-J.
  44. Volz TJ., Fleckenstein AE. and Hanson GR.; *Addiction* **2007**;102 (SUPPL. 1):44-8. doi:10.1111/j.1360-0443.2007.01771.x.
  45. Cass WA.; *J Pharmacol Exp Ther* **1997**;280 (1):105-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8996187>.
  46. Kitamura O., Takeichi T., Wang EL., Tokunaga I., Ishigami A. and Kubo S.; *Leg Med* **2010**;12 (2):57-62. doi:10.1016/j.legalmed.2009.11.001.
  47. Yu S., Zhu L., Shen Q., Bai X. and Di X.; *Behav Neurol* **2015**;2015 . doi:10.1155/2015/103969.
  48. Marshall JF., and O'Dell SJ.; *Trends Neurosci* **2012**;35 (9):536-45.

- doi:10.1016/j.tins.2012.05.006.
49. Brown JM., Quinton MS. and Yamamoto BK.; *J Neurochem* **2005**;95 (2):429-36. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03379.x.
  50. Riddle E., Fleckenstein A. and Hanson G.; *AAPS J* **2006**;8 (2):E413. doi:10.1208/aapsj080248.
  51. Thomas DM.; *J Pharmacol Exp Ther* **2004**;311 (1):1-7. doi:10.1124/jpet.104.070961.
  52. Cadet JL., Jayanthi S. and Deng X.; *Neurotox Res* **2005**;8 (3-4):199-206. doi:10.1007/BF03033973.
  53. Lin M., Chandramani-Shivalingappa P., Jin H., et al.; *Neuroscience* **2012**;210 (4):308-32. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.03.004.
  54. Turowski P., and Kenny B.; *Front Neurosci* **2015**;9 (May):1-7. doi:10.3389/fnins.2015.00156.
  55. Alicata D., Chang L., Cloak C., Abe K. and Ernst T.; *Psychiatry Res Neuroimaging* **2009**;174 (1):1-8. doi:10.1016/j.psychresns.2009.03.011.
  56. Mark KA.; *J Neurosci* **2004**;24 (50):11449-56. doi:10.1523/JNEUROSCI.3597-04.2004.
  57. Pereira FC., Cunha-Oliveira T., Viana SD., et al.; *Neurotoxicol Teratol* **2012**;34 (5):522-9. doi:10.1016/j.ntt.2012.07.005.
  58. Kalechstein AD., Newton TF. and Green M.; *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **2003**;15 (2):215-20. doi:10.1176/jnp.15.2.215.
  59. McGregor C., Srisurapanont M., Jittiwutikarn J., Laobhripatr S., Wongtan T. and White JM.; *Addiction* **2005**;100 (9):1320-9. doi:10.1111/j.1360-0443.2005.01160.x.
  60. McCrady BS., and Epstein EE.; In: *Addictions : A Comprehensive Guidebook*. OUP USA; 2013:912. [https://books.google.com/books?id=vQwRK\\_sBa1UC&pgis=1](https://books.google.com/books?id=vQwRK_sBa1UC&pgis=1).
  61. Darke S., Kaye S., McKetin R. and Duflou J.; *Drug Alcohol Rev* **2008**;27 (3):253-62. doi:10.1080/09595230801923702.
  62. Griffiths P., Lopez D., Sedefov R., et al.; *J Ethnopharmacol* **2010**;132 (3):578-83. doi:10.1016/j.jep.2010.04.046.
  63. Gibbons S., and Zloh M.; *Bioorg Med Chem Lett* **2010**;20 (14):4135-9. doi:10.1016/j.bmcl.2010.05.065.
  64. Brenneisen R., Fisch H., Koelbing U., Geissshusler S. and Kalix P.; *Br J Clin Pharmacol* **1990**;30 (6):825-8.
  65. Iversen L., White M. and Treble R.; *Neuropharmacology* **2014**;87 :59-65. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.015.
  66. Fratantonio J.; *J Reward Defic Syndr* **2015**;1 (2):82-6. doi:10.17756/jrds.2015-014.
  67. De Felice LJ., Glennon RA. and Negus SS.; *Life Sci* **2014**;97 (1):20-6. doi:10.1016/j.lfs.2013.10.029.
  68. NIDA - National Institute on Drug Abuse.; *DrugFacts: Synthetic Cathinones "Bath Salts."* <http://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/synthetic-cathinones-bath-salts>. Accessed 29/29/2017.
  69. Schneir A., Ly BT., Casagrande K., et al.; *Clin Toxicol* **2014**;52 (7):651-8. doi:10.3109/15563650.2014.933231.
  70. Shanks KG., Dahn T., Behonick G. and Terrell A.; *J Anal Toxicol* **2012**;36 (6):360-71. doi:10.1093/jat/bks047.
  71. 112th Congress in the Senate of the United States.; **2012**.
  72. Glennon RA.; In: *Advances in Pharmacology*. Vol 69. ; 2014:581-620. doi:10.1016/B978-0-12-420118-7.00015-9.
  73. *American Association of Poison Control Centers*. <http://www.aapcc.org/>. Accessed 29/29/2017.
  74. DAWN - Drug Abuse Warning Network.; *"Bath Salts" were Involved in over 20,000*

- Drug-Related Emergency Department Visits in 2011.* **2013.**
75. World Health Organization.; **2014.**
  76. EMCDDA - European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.; *EMCDDA–Europol Joint Report on a New Psychoactive Substance: MDPV (3,4-Methylenedioxypropylvalerone).* **2013.**
  77. Boehringer Ingelheim.; **1967.**  
[https://catbull.com/alamut/Bibliothek/Boehringer\\_MDPV\\_Patent.htm](https://catbull.com/alamut/Bibliothek/Boehringer_MDPV_Patent.htm).
  78. Coppola M., and Mondola R.; *Toxicol Lett* **2012**;208 (1):12-5. doi:10.1016/j.toxlet.2011.10.002.
  79. Baumann MH., Solis E., Watterson LR., Marusich JA., Fantegrossi WE. and Wiley JL.; *J Neurosci* **2014**;34 (46):15150-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.3223-14.2014.
  80. Ross EA., Reisfield GM., Watson MC., Chronister CW. and Goldberger BA.; *Am J Med* **2012**;125 (9):854-8. doi:10.1016/j.amjmed.2012.02.019.
  81. Strano-Rossi S., Cadwallader AB., de la Torre X. and Botrè F.; *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010**;24 (18):2706-14. doi:10.1002/rcm.4692.
  82. Meyer MR., Du P., Schuster F. and Maurer HH.; *J Mass Spectrom* **2010**;45 (12):1426-42. doi:10.1002/jms.1859.
  83. Baumann MH., Partilla JS., Lehner KR., et al.; *Neuropsychopharmacology* **2013**;38 (4):552-62. doi:10.1038/npp.2012.204.
  84. Eshleman AJ., Wolfrum KM., Hatfield MG., Johnson RA., Murphy K V. and Janowsky A.; *Biochem Pharmacol* **2013**;85 (12):1803-15. doi:10.1016/j.bcp.2013.04.004.
  85. Kolanos R., Partilla JS., Baumann MH., et al.; *ACS Chem Neurosci* **2015**;6 (5):771-7. doi:10.1021/acschemneuro.5b00006.
  86. Anneken JH., Angoa-Perez M. and Kuhn DM.; *J Neurochem* **2015**;133 (2):211-22. doi:10.1111/jnc.13048.
  87. Valente MJ., Bastos M de L., Fernandes E., Carvalho F., Guedes de Pinho P. and Carvalho M.; *ACS Chem Neurosci* **2017**;8 (4):850-9. doi:10.1021/acschemneuro.6b00421.
  88. Capriola M.; *Clin Pharmacol Adv Appl* **July 2013**:109. doi:10.2147/CPAA.S42832.
  89. Volkow ND., Wang G-J., Fowler JS., Tomasi D. and Telang F.; *Proc Natl Acad Sci* **2011**;108 (37):15037-42. doi:10.1073/pnas.1010654108.
  90. Anizan S., Concheiro M., Lehner KR., et al.; *Addict Biol* **2016**;21 (2):339-47. doi:10.1111/adb.12201.
  91. Aarde SM., Huang PK., Creehan KM., Dickerson TJ. and Taffe MA.; *Neuropharmacology* **2013**;71 :130-40. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.003.
  92. Marusich JA., Grant KR., Blough BE. and Wiley JL.; *Neurotoxicology* **2012**;33 (5):1305-13. doi:10.1016/j.neuro.2012.08.003.
  93. Fantegrossi WE., Gannon BM., Zimmerman SM. and Rice KC.; *Neuropsychopharmacology* **2013**;38 (4):563-73. doi:10.1038/npp.2012.233.
  94. NIDA - National Institute on Drug Abuse.; *DrugFacts: Understanding Drug Use and Addiction.* <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/understanding-drug-use-addiction>. Accessed 17/17/2017.
  95. Haber SN., and Knutson B.; *Neuropsychopharmacology* **2010**;35 (1):4-26. doi:10.1038/npp.2009.129.
  96. Lanciego JL., Luquin N. and Obeso JA.; *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**;2 (12):a009621-a009621. doi:10.1101/cshperspect.a009621.
  97. Zeiss CJ.; *Vet Pathol* **2005**;42 (6):753-73. doi:10.1354/vp.42-6-753.
  98. Tisch S., Silberstein P., Limousin-Dowsey P. and Jahanshahi M.; *Psychiatr Clin North Am* **2004**;27 (4):757-99. doi:10.1016/j.psc.2004.06.004.
  99. Yager LM., Garcia AF., Wunsch AM. and Ferguson SM.; *Neuroscience* **2015**;301 :529-

41. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.033.
100. Burton AC., Nakamura K. and Roesch MR.; *Neurobiol Learn Mem* **2015**;117 (9):51-9. doi:10.1016/j.nlm.2014.05.003.
  101. Calabresi P., Picconi B., Tozzi A., Ghiglieri V. and Di Filippo M.; *Nat Neurosci* **2014**;17 (8):1022-30. doi:10.1038/nm.3743.
  102. Joel D., and Weiner I.; *Neuroscience* **2000**;96 (3):451-74. doi:10.1016/S0306-4522(99)00575-8.
  103. Berke JD., and Hyman SE.; *Neuron* **2000**;25 (3):515-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774721>.
  104. Macpherson T., Morita M. and Hikida T.; *Front Psychol* **2014**;5 (NOV):1-7. doi:10.3389/fpsyg.2014.01301.
  105. Nicola SM., Surmeier DJ. and Malenka RC.; *Annu Rev Neurosci* **2000**;23 (1):185-215. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.185.
  106. Kalivas PW., and O'Brien C.; *Neuropsychopharmacology* **2008**;33 (1):166-80. doi:10.1038/sj.npp.1301564.
  107. Robinson TE., and Kolb B.; *Neuropharmacology* **2004**;47 :33-46. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.025.
  108. Jedynak JP., Uslaner JM., Esteban JA. and Robinson TE.; *Eur J Neurosci* **2007**;25 (3):847-53. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05316.x.
  109. Kalivas PW.; *Dialogues Clin Neurosci* **2007**;9 (4):389-97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286799>.
  110. Krasnova IN., and Cadet JL.; *Brain Res Rev* **2009**;60 (2):379-407. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.03.002.
  111. Mackay IR., Rosen FS., Delves PJ. and Roitt IM.; *N Engl J Med* **2000**;343 (1):37-49. doi:10.1056/NEJM200007063430107.
  112. Beck G., and Habicht GS.; *Sci Am* **1996**;275 (5):60-6. doi:10.1038/scientificamerican1196-60.
  113. Błach-Olszewska Z.; *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2005**;53 (3):245-53. <http://europepmc.org/abstract/MED/15995585>.
  114. Basset C., Holton J., O'Mahony R. and Roitt I.; *Vaccine* **2003**;21 :S12-23. doi:10.1016/S0264-410X(03)00195-6.
  115. Dale DC., Boxer L. and Liles WC.; *Blood* **2008**;112 (4):935-45. doi:10.1182/blood-2007-12-077917.
  116. Abbas AK., Lichtman AH. and Pillai S.; *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed. (Revised, ed.). Canada: Elsevier Saunders; **2015**.
  117. Nobes C., and Marsh M.; *Curr Biol* **2000**;10 (20):R739-41. doi:10.1016/S0960-9822(00)00736-3.
  118. Hamerman JA., Ogasawara K. and Lanier LL.; *Curr Opin Immunol* **2005**;17 (1):29-35. doi:10.1016/j.coi.2004.11.001.
  119. Stone KD., Prussin C. and Metcalfe DD.; *J Allergy Clin Immunol* **2010**;125 :S73-80. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017.
  120. Paul WE.; *Fundamental Immunology*. 7th ed. (William E. Paul, ed.). United States: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; **2013**.
  121. Galea I., Bechmann I. and Perry VH.; *Trends Immunol* **2007**;28 (1):12-8. doi:10.1016/j.it.2006.11.004.
  122. Hutchinson MR., and Watkins LR.; *Neuropharmacology* **2014**;76 (9):218-27. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.05.039.
  123. Owen JA., Punt J. and Stranford SA.; *Kuby Immunology*. 7th ed. United States: Susan Winslow; **2013**.
  124. Viana SD., Valero J., Rodrigues-Santos P., et al.; *J Neurochem* **2016**.

- doi:10.1111/jnc.13682.
125. Hollan I., Saatvedt K., Almdahl SM., et al.; *Scand J Rheumatol* **2008**;37 (1):18-22. doi:10.1080/03009740701716868.
  126. Makita Z., Radoff S., Rayfield EJ., Yang Z. and Skolnik E.; *New Engl J Med* **1991**;325 (12):836-42.
  127. Neeper M., Schmidt a M., Brett J., et al.; *J Biol Chem* **1992**;267 (21):14998-5004. <http://www.jbc.org/content/267/21/14998.abstract>.
  128. Schmidt AM., Vianna M., Gerlach M., et al.; *J Biol Chem* **1992**;267 (21):14987-97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321822>.
  129. Juranek JK., Daffu GK., Wojtkiewicz J., Lacomis D., Kofler J. and Schmidt AM.; *Front Cell Neurosci* **2015**;9 (485). doi:10.3389/fncel.2015.00485.
  130. Hofmann MA., Drury S., Fu C., et al.; *Cell* **1999**;97 :889-901.
  131. Heizmann CW., Fritz G. and Schäfer BW.; *Front Biosci* **2002**;7 :d1356-68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991838>.
  132. Hori O., Brett J., Slattery T., et al.; *J Biol Chem* **1995**;270 (43):25752-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592757>.
  133. Du Yan S., Zhu H., Fu J., et al.; *Proc Natl Acad Sci* **1997**;94 (10):5296-301. doi:10.1073/pnas.94.10.5296.
  134. Sugaya K., Fukagawa T., Matsumoto K-I., et al.; *Genomics* **1994**;23 (2):408-19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7835890>.
  135. Barclay AN.; *Semin Immunol* **2003**;15 (4):215-23. doi:10.1016/S1044-5323(03)00047-2.
  136. Poljak RJ., Amzel LM., Avey HP., Chen BL., Phizackerley RP. and Saul F.; *Proc Natl Acad Sci* **1973**;70 (12):3305-10.
  137. Malherbe P., Richards JG., Gaillard H., et al.; *Mol Brain Res* **1999**;71 (2):159-70. doi:10.1016/S0169-328X(99)00174-6.
  138. Schmidt AM., Yan S Du., Yan SF. and Stern DM.; *Biochim Biophys Acta* **2000**;1498 (2-3):99-111. doi:10.1016/S0167-4889(00)00087-2.
  139. Ding Q., and Keller JN.; *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **2005**;1746 (1):18-27. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.08.006.
  140. YONEKURA H., YAMAMOTO Y., SAKURAI S., et al.; *Biochem J* **2003**;370 (3):1097-109. doi:10.1042/bj20021371.
  141. Ding Q., and Keller JN.; *Neurosci Lett* **2004**;373 (1):67-72. doi:10.1016/j.neulet.2004.09.059.
  142. Hanford LE., Enghild JJ., Valnickova Z., et al.; *J Biol Chem* **2004**;279 (48):50019-24. doi:10.1074/jbc.M409782200.
  143. Raucci A., Cugusi S., Antonelli A., et al.; *FASEB J* **2008**;22 (10):3716-27. doi:10.1096/fj.08-109033.
  144. Galichet A., Weibel M. and Heizmann CW.; *Biochem Biophys Res Commun* **2008**;370 (1):1-5. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.163.
  145. Dattilo BM., Fritz G., Leclerc E., Vander Kooi CW., Heizmann CW. and Chazin WJ.; *Biochemistry* **2007**. doi:10.1021/bi7003735.
  146. Xie J., Burz DS., He W., Bronstein IB., Lednev I. and Shekhtman A.; *J Biol Chem* **2006**;282 (6):4218-31. doi:10.1074/jbc.M608888200.
  147. Ostendorp T., Leclerc E., Galichet A., et al.; *EMBO J* **2007**;26 (16):3868-78. doi:10.1038/sj.emboj.7601805.
  148. Xie J., Reverdatto S., Frolov A., Hoffmann R., Burz DS. and Shekhtman A.; *J Biol Chem* **2008**;283 (40):27255-69. doi:10.1074/jbc.M801622200.
  149. Koch M., Chitayat S., Dattilo BM., et al.; *Structure* **2010**;18 (10):1342-52. doi:10.1016/j.str.2010.05.017.

150. Leclerc E., Fritz G., Weibel M., Heizmann CW. and Galichet A.; *J Biol Chem* **2007**. doi:10.1074/jbc.M703951200.
151. Bierhaus A., Humpert PM., Morcos M., et al.; *J Mol Med* **2005**;83 (11):876-86. doi:10.1007/s00109-005-0688-7.
152. Haupt C., Bereza M., Kumar ST., et al.; *J Mol Biol* **2011**;408 (3):529-40. doi:10.1016/j.jmb.2011.02.032.
153. Rauvala H., and Rouhiainen A.; *Curr Mol Med* **2007**. doi:10.2174/156652407783220750.
154. Hudson BI., Carter AM., Harja E., et al.; *FASEB J* **2007**;22 (5):1572-80. doi:10.1096/fj.07-9909com.
155. Adami C., Sorci G., Blasi E., Agneletti AL., Bistoni F. and Donato R.; *Glia* **2001**;33 (2):131-42. doi:10.1002/1098-1136(200102)33:2<131::AID-GLIA1012>3.0.CO;2-D.
156. Park IH., Yeon SI., Youn JH., et al.; *Mol Immunol* **2004**;40 (16):1203-11. doi:10.1016/j.molimm.2003.11.027.
157. Dumitriu IE., Bianchi ME., Bacci M., Manfredi A a. and Rovere-Querini P.; *J Leukoc Biol* **2007**;81 (1):84-91. doi:10.1189/jlb.0306171.
158. Chen Y., Yan SS., Colgan J., et al.; *J Immunol* **2004**;173 (2):1399-405. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1399.
159. Brett J., Schmidt AM., Yan SD., et al.; *Am J Pathol* **1993**;143 (6):1699-712. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
160. Huttunen HJ., Kuja-Panula J., Sorci G., Agneletti AL., Donato R. and Rauvala H.; *J Biol Chem* **2000**;275 (51):40096-105. doi:10.1074/jbc.M006993200.
161. Zhang L., Liu W., Alizadeh D., et al.; *Glia* **2011**;59 (3):486-98. doi:10.1002/glia.21118.
162. Bianchi R., Kastrisianaki E., Giambanco I. and Donato R.; *J Biol Chem* **2011**;286 (9):7214-26. doi:10.1074/jbc.M110.169342.
163. Rai V., Touré F., Chitayat S., et al.; *J Exp Med* **2012**;209 (13):2339-50. doi:10.1084/jem.20120873.
164. Schmidt AM., Taguchi A., Blood DC., et al.; *Nature* **2000**;405 (6784):354-60. doi:10.1038/35012626.
165. Huttunen HJ.; *J Biol Chem* **2002**;277 (41):38635-46. doi:10.1074/jbc.M202515200.
166. Manfredi A., Capobianco A., Esposito A., et al.; *J Immunol* **2008**;180 (4):2270-5. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2270.
167. Dumitriu IE., Baruah P., Valentinis B., et al.; *J Immunol* **2005**;174 (12):7506-15. doi:10.4049/jimmunol.174.12.7506.
168. Xu Y., Toure F., Qu W., et al.; *J Biol Chem* **2010**;285 (30):23233-40. doi:10.1074/jbc.M110.117457.
169. Deane R., Du Yan S., Subramaryan RK., et al.; *Nat Med* **2003**;9 (7):907-13. doi:10.1038/nm890.
170. Anzilotti S., Giampà C., Laurenti D., et al.; *Brain Res Bull* **2012**;87 (2-3):350-8. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.01.009.
171. Ray R., Juranek JK. and Rai V.; *Neurosci Biobehav Rev* **2016**;62 :48-55. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.12.006.
172. Bierhaus A., Ritz E. and Nawroth PP.; *Nephrol Dial Transplant* **1996**;11 (supp5):87-90. doi:10.1093/ndt/11.supp5.87.
173. Bierhaus A., Humpert PM., Morcos M., et al.; *J Mol Med* **2005**;83 (11):876-86. doi:10.1007/s00109-005-0688-7.
174. Yan SF.; *Circ Res* **2003**;93 (12):1159-69. doi:10.1161/01.RES.0000103862.26506.3D.
175. Sunahori K., Yamamura M., Yamana J., Takasugi K., Kawashima M. and Makino H.; *Arthritis Rheum* **2006**;54 (1):97-104. doi:10.1002/art.21524.

176. Xie J., Méndez JD., Méndez-Valenzuela V. and Aguilar-Hernández MM.; *Cell Signal* **2013**;25 (11):2185-97. doi:10.1016/j.cellsig.2013.06.013.
177. Epstein FH., Barnes PJ. and Karin M.; *N Engl J Med* **1997**;336 (15):1066-71. doi:10.1056/NEJM199704103361506.
178. Bierhaus A., Humpert PM., Morcos M., et al.; **2005**. doi:10.1007/s00109-005-0688-7.
179. Kierdorf K., and Fritz G.; *J Leukoc Biol* **2013**;94 (1):55-68. doi:10.1189/jlb.1012519.
180. Sorci G., Riuzzi F., Giambanco I. and Donato R.; *Biochim Biophys Acta* **2013**;1833 (1):101-9. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.021.
181. Sorce S., and Krause K-H.; *Antioxid Redox Signal* **2009**;11 (10):2481-504. doi:10.1089/ars.2009.2578.
182. Piras S., Furfaro AL., Domenicotti C., et al.; *Oxid Med Cell Longev* **2016**;2016 (9348651). doi:10.1155/2016/9348651.
183. PONATH G., SCHETTLER C., KAESTNER F., et al.; *J Neuroimmunol* **2007**;184 (1-2):214-22. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.12.011.
184. Villarreal A., Seoane R., González Torres A., et al.; *J Neurochem* **2014**;131 (2):190-205. doi:10.1111/jnc.12790.
185. Kim J-B., Sig Choi J., Yu Y-M., et al.; *J Neurosci* **2006**. doi:10.1523/JNEUROSCI.3815-05.2006.
186. Pedrazzi M., Patrone M., Passalacqua M., et al.; *J Immunol* **2007**;179 (12):8525-32. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8525.
187. Dukic-Stefanovic S., Gasic-Milenkovic J., Deuther-Conrad W. and Münch G.; *J Neurochem* **2003**;87 (1):44-55. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01988.x.
188. Bianchi R., Giambanco I. and Donato R.; *Neurobiol Aging* **2010**. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.017.
189. Adami C., Bianchi R., Pula G. and Donato R.; In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. ; 2004. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.008.
190. Zhang L., Liu W., Alizadeh D., et al.; *Glia* **2011**. doi:10.1002/glia.21118.
191. Reali C., Scintu F., Pillai R., Donato R., Michetti F. and Sogos V.; *J Neurosci Res* **2005**. doi:10.1002/jnr.20584.
192. Huttunen HJ., Fages C. and Rauvala H.; *J Biol Chem* **1999**;274 (28):19919-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391939>.
193. Businaro R., Leone S., Fabrizi C., et al.; *J Neurosci Res* **2006**;83 (5):897-906. doi:10.1002/jnr.20785.
194. Villarreal A., Aviles Reyes RX., Angelo MF., Reines AG. and Ramos AJ.; *J Neurochem* **2011**;117 (2):321-32. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07207.x.
195. Hudson BI., Kalea AZ., Del Mar Arriero M., et al.; *J Biol Chem* **2008**;283 (49):34457-68. doi:10.1074/jbc.M801465200.
196. Sakaguchi M., Murata H., Yamamoto K., et al.; Chandra D, ed. *PLoS One* **2011**;6 (8):e23132. doi:10.1371/journal.pone.0023132.
197. Ibrahim ZA., Armour CL., Phipps S. and Sukkar MB.; *Mol Immunol* **2013**;56 (4):739-44. doi:10.1016/j.molimm.2013.07.008.
198. Gąsiorowski K., Brokos B., Echeverria V., Barreto GE. and Leszek J.; *Mol Neurobiol* **February 2017**. doi:10.1007/s12035-017-0419-4.
199. Liliensiek B., Weigand M., Bierhaus A., et al.; *J Clin Invest* **2004**;113 (11):1641-50. doi:10.1172/JCI18704.
200. Chaney MO., Stine WB., Kokjohn TA., et al.; *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **2005**;1741 (1-2):199-205. doi:10.1016/j.bbadis.2005.03.014.
201. Santilli F., Vazzana N., Bucciarelli L. and Davi G.; *Curr Med Chem* **2009**;16 (8):940-52. doi:10.2174/092986709787581888.
202. Park M-J., Lee SH., Moon S-J., et al.; *Sci Rep* **2016**;6 (1):35933. doi:10.1038/srep35933.

203. Sárkány Z., Ikonen TP., Ferreira-da-Silva F., Saraiva MJ., Svergun D. and Damas AM.; *J Biol Chem* **2011**;286 (43):37525-34. doi:10.1074/jbc.M111.223438.
204. Engelhardt B., and Sorokin L.; *Semin Immunopathol* **2009**;31 (4):497-511. doi:10.1007/s00281-009-0177-0.
205. Wilson EH., Weninger W. and Hunter CA.; *J Clin Invest* **2010**;120 (5):1368-79. doi:10.1172/JCI41911.
206. Ousman SS., and Kubes P.; *Nat Neurosci* **2012**;15 (8):1096-101. doi:10.1038/nm.3161.
207. Svenningsson A., Andersen O., Edsbacke M. and Stemme S.; *J Neuroimmunol* **1995**;63 :39-46.
208. Kivisakk P., Mahad DJ., Callahan MK., et al.; **2003**;100 (14):4-9.
209. Ransohoff RM., and Cardona AE.; *Nature* **2010**;468 (7321):253-62. doi:10.1038/nature09615.
210. Guillemin GJ.; *J Leukoc Biol* **2003**;75 (3):388-97. doi:10.1189/jlb.0303114.
211. Kigerl KA., Gensel JC., Ankeny DP., Alexander JK., Donnelly DJ. and Popovich PG.; *J Neurosci* **2009**;29 (43):13435-44. doi:10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009.
212. Streit WJ., Walter SA. and Pennell NA.; *Prog Neurobiol* **1999**;57 (6):563-81.
213. Colton CA.; *J Neuroimmune Pharmacol* **2009**;4 (4):399-418. doi:10.1007/s11481-009-9164-4.
214. Allaman I., Bélanger M. and Magistretti PJ.; *Trends Neurosci* **2011**;34 (2):76-87. doi:10.1016/j.tins.2010.12.001.
215. Zhang D., Hu X., Qian L., O'Callaghan JP. and Hong J-S.; *Mol Neurobiol* **2010**;41 (2-3):232-41. doi:10.1007/s12035-010-8098-4.
216. Liddel SA., Guttenplan KA., Clarke LE., et al.; *Nature* **2017**;541 (7638):481-7. doi:10.1038/nature21029.
217. Carson MJ., Cameron Thrash J. and Walter B.; *Clin Neurosci Res* **2006**;6 (5):237-45. doi:10.1016/j.cnr.2006.09.004.
218. Boche D., Perry VH. and Nicoll JAR.; *Neuropathol Appl Neurobiol* **2013**;39 (1):3-18. doi:10.1111/nan.12011.
219. Suzuki Y., Clafflin J., Wang X., Lengi A. and Kikuchi T.; *Int J Parasitol* **2005**;35 (1):83-90. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.020.
220. Nakamura Y.; *Biol Pharm Bull* **2002**;25 (8):945-53.
221. Ransohoff RM., and Brown M a.; *J Clin Invest* **2012**;122 (4):1164-71. doi:10.1172/JCI58644.
222. Wang W., Tan M., Yu J. and Tan L.; *Annu Transl Med* **2015**;3 (10):1-15. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49.
223. John GR., Lee SC. and Brosnan CF.; *Neurosci* **2003**;9 (1):10-22. doi:10.1177/1073858402239587.
224. Sofroniew M V.; *Trends Neurosci* **2009**;32 (12):638-47. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002.
225. Kloss CUA., Kreutzberg GW. and Raivich G.; *J Neurosci Res* **1997**;49 (2):248-54. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19970715)49:2<248::AID-JNR13>3.0.CO;2-X.
226. Abbott NJ., Rönnbäck L. and Hansson E.; *Nat Rev Neurosci* **2006**;7 (1):41-53. doi:10.1038/nrn1824.
227. Haseloff RF., Blasig IE., Bauer H-C. and Bauer H.; *Cell Mol Neurobiol* **2005**;25 (1):25-39. doi:10.1007/s10571-004-1375-x.
228. Wosik K., Cayrol R., Dodelet-Devillers A., et al.; *J Neurosci* **2007**;27 (34):9032-42. doi:10.1523/JNEUROSCI.2088-07.2007.
229. Schinkel AH.; *Adv Drug Deliv* **1999**;36 (2-3):179-94.
230. Sobue K., Yamamoto N., Yoneda K. and Hodgson ME.; *Neurosci Res* **1999**;35 (3):155-64.
231. Iadecola C., and Anrather J.; *Nat Med* **2011**;17 (7):796-808. doi:10.1038/nm.2399.

232. Abbott NJ., Patabendige AAK., Dolman DEM., Yusof SR. and Begley DJ.; *Neurobiol Dis* **2010**;37 (1):13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
233. Alvarez JL., Katayama T. and Prat A.; *Glia* **2013**;61 (12):1939-58. doi:10.1002/glia.22575.
234. Wilhelm I., Nyúl-Tóth Á., Suciú M., Hermenean A. and Krizbai IA.; *Tissue Barriers* **2016**;4 (1):e1143544. doi:10.1080/21688370.2016.1143544.
235. Schukaliak JA., and Dorovini-Zis K.; *J Neuropathol Exp Neurol* **2000**;59 (5):339-52.
236. Brett F., Powell H. and Campbell I.; *J Neuropathol Exp Neurol* **1995**;54 (6):766-75.
237. Prat A., Biernacki K., Wosik K. and Antel JP.; *Glia* **2001**;36 (2):145-55. doi:10.1002/glia.1104.
238. Andjelkovic A V., and Pachter JS.; *J Neurochem* **2000**;75 (5):1898-906.
239. Schachtrup C., Ryu JK., Helmrick MJ., et al.; *J Neurosci* **2010**;30 (17):5843-54. doi:10.1523/JNEUROSCI.0137-10.2010.
240. Davalos D., and Akassoglou K.; *Semin Immunopathol* **2012**;34 (1):43-62. doi:10.1007/s00281-011-0290-8.
241. Laschinger M., Vajkoczy P. and Engelhardt B.; *Eur J Immunol* **2002**;32 (12):3598-606. doi:10.1002/1521-4141(200212)32:12<3598::AID-IMMU3598>3.0.CO;2-6.
242. Greenwood J., Heasman SJ., Greenwood J., et al.; **2011**:24-39. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01140.x.
243. Mead RJ., Singhrao SK., Neal JW., Lassmann H. and Morgan BP.; *J Immunol* **2002**;168 (1):458-65. doi:10.4049/jimmunol.168.1.458.
244. Louis J-C., Magal E., Takayama S. and Varon S.; *Science (80- )* **1993**;259 (5095):689-92.
245. Morwood SR., and Nicholson LB.; *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2006**;54 (6):367-74. doi:10.1007/s00005-006-0043-x.
246. Rusyniak DE.; *Neurol Clin* **2011**;29 (3):641-55. doi:10.1016/j.ncl.2011.05.004.
247. Rivest S.; *Nat Rev Immunol* **2009**;9 (6):429-39. doi:10.1038/nri2565.
248. Lehnardt S.; *Glia* **2009**;58 (3):NA-NA. doi:10.1002/glia.20928.
249. Rawji KS., and Yong VW.; *Clin Dev Immunol* **2013**;2013 :948976. doi:10.1155/2013/948976.
250. Friend DM., and Keefe KA.; *J Neurochem* **2013**;125 (4):566-74. doi:10.1111/jnc.12201.
251. Kuhn DM., Francescutti-Verbeem DM. and Thomas DM.; *Ann N Y Acad Sci* **2006**;1074 (1):31-41. doi:10.1196/annals.1369.003.
252. Gao H., and Hong J.; *Trends Immunol* **2008**;29 (8):357-65. doi:10.1016/j.it.2008.05.002.
253. Abdul Muneer PM., Alikunju S., Szlachetka AM., Murrin LC. and Haorah J.; *Mol Neurodegener* **2011**;6 (1):23. doi:10.1186/1750-1326-6-23.
254. Beardsley PM., and Hauser KF.; In: *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*. Vol 69. ; 2014:1-69. doi:10.1016/B978-0-12-420118-7.00001-9.
255. Treweek JB., Dickerson TJ. and Janda KD.; *Acc Chem Res* **2009**;42 (5):659-69. doi:10.1021/ar800247d.
256. Loftis JM., Choi D., Hoffman W. and Huckans MS.; *Neurotox Res* **2011**;20 (1):59-68. doi:10.1007/s12640-010-9223-x.
257. Kousik SM., Napier TC. and Carvey PM.; *Front Pharmacol* **2012**;3 JUN (June):1-12. doi:10.3389/fphar.2012.00121.
258. Buch S., Yao H., Guo M., et al.; *Curr HIV Res* **2012**;10 (5):425-8. doi:CHIVR-EPUB-20120511-4.
259. Volkow ND., Chang L., Wang GJ., et al.; *J Neurosci* **2001**;21 (23):9414-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717374>.
260. Loftis JM., and Janowsky A.; In: *International Review of Neurobiology*. Vol 118. ; 2014:165-97. doi:10.1016/B978-0-12-801284-0.00007-5.

261. Davidson C., Gow AJ., Lee TH. and Ellinwood EH.; *Brain Res Rev* **2001**;36 (1):1-22. doi:10.1016/S0165-0173(01)00054-6.
262. Kalueff A V., and Tuohimaa P.; *Brain Res Protoc* **2004**;13 (3):151-8. doi:10.1016/j.brainresprot.2004.04.002.
263. Fonseca R., Carvalho RA., Lemos C., et al.; *CNS Neurosci Ther* **2017**;23 (2):119-26. doi:10.1111/cns.12649.
264. Viana SD., Pita IR., Lemos C., et al.; *J Appl Physiol* **April 2017**;jap.01120.2016. doi:10.1152/japplphysiol.01120.2016.
265. Cryan JF., Mombereau C. and Vassout A.; *Neurosci Biobehav Rev* **2005**;29 (4-5):571-625. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.
266. Silva CD., Neves AF., Dias AI., et al.; *Neurotox Res* **2014**;25 (3):295-304. doi:10.1007/s12640-013-9423-2.
267. Can A., Dao DT., Terrillion CE., Piantadosi SC., Bhat S. and Gould TD.; *J Vis Exp* **2011**;(58):3-7. doi:10.3791/3769.
268. Carobrez AP., and Bertoglio LJ.; *Neurosci Biobehav Rev* **2005**;29 (8):1193-205. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.04.017.
269. Walf AA., and Frye CA.; *Nat Protoc* **2007**;2 (2):322-8. doi:10.1038/nprot.2007.44.
270. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M. and Bernatova I.; *Interdiscip Toxicol* **2013**;6 (3):126-35. doi:10.2478/intox-2013-0020.
271. Rial D., Castro AA., Machado N., et al.; Tort ABL, ed. *PLoS One* **2014**;9 (12):e114216. doi:10.1371/journal.pone.0114216.
272. Seibenhener ML., and Wooten MC.; *J Vis Exp* **2015**;(96):1-6. doi:10.3791/52434.
273. Prut L., and Belzung C.; *Eur J Pharmacol* **2003**;463 (1-3):3-33. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X.
274. Viana SD., Fernandes RC., Canas PM., et al.; *CNS Neurosci Ther* **2016**. doi:10.1111/cns.12508.
275. Viana SD., Valero J., Rodrigues-Santos P., et al.; *J Neurochem* **2016**;138 (4):598-609. doi:10.1111/jnc.13682.
276. Olson BJSC., and Markwell J.; In: *Current Protocols in Protein Science*. Vol Chapter 3. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2007:3.4.1-3.4.29. doi:10.1002/0471140864.ps0304s48.
277. Franklin, K.B., Paxinos G.; *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. United States: Elsevier Academic Press; **1997**.
278. Kiyatkin EA., and Sharma HS.; In: *International Review of Neurobiology*. Vol 88. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009:65-100. doi:10.1016/S0074-7742(09)88004-5.
279. Fantegrossi WE., Ciullo JR., Wakabayashi KT., De La Garza R., Traynor JR. and Woods JH.; *Neuroscience* **2008**;151 (2):533-43. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.11.007.
280. Angelo MF., Aguirre A., Avilés Reyes RX., et al.; Buch SJ, ed. *PLoS One* **2014**;9 (9):e107901. doi:10.1371/journal.pone.0107901.
281. Galichet A., Weibel M. and Heizmann CW.; *Biochem Biophys Res Commun* **2008**. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.163.
282. Schifano F., Orsolini L., Papanti D. and Corkery J.; In: ; 2016:351-80. doi:10.1007/7854\_2016\_15.
283. Glasner-Edwards S., Marinelli-Casey P., Hillhouse M., Ang A., Mooney LJ. and Rawson R.; *J Nerv Ment Dis* **2009**;197 (4):225-31. doi:10.1097/NMD.0b013e31819db6fe.
284. Wang G., Shi J., Chen N., et al.; García AV, ed. *PLoS One* **2013**;8 (7):e68791. doi:10.1371/journal.pone.0068791.
285. Glennon RA., and Young R.; *Brain Res Bull* **2016**;126 (Pt 1):111-26. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.04.011.
286. Grace CE., Schaefer TL., Herring NR., et al.; *Neurotoxicol Teratol* **2010**;32 (3):346-55.

- doi:10.1016/j.ntt.2010.01.006.
287. Huang PK., Aarde SM., Angrish D., Houseknecht KL., Dickerson TJ. and Taffe MA.; *Drug Alcohol Depend* **2012**;126 (1-2):168-75. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.05.011.
  288. Gatch MB., Taylor CM. and Forster MJ.; *Behav Pharmacol* **2013**;24 (5 and 6):437-47. doi:10.1097/FBP.0b013e328364166d.
  289. Blum K., Foster Olive M., Wang KKW., et al.; *Med Hypotheses* **2013**;81 (3):450-5. doi:10.1016/j.mehy.2013.06.007.
  290. O'Callaghan JP., and Miller DB.; *J Pharmacol Exp Ther* **1994**;270 (2):741-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8071867>.
  291. Schmued L., and Slikker W.; *Brain Res* **1999**;837 (1-2):289-97. doi:10.1016/S0006-8993(99)01624-8.
  292. Bajaj A., LaPlante NE., Cotero VE., et al.; *J Histochem Cytochem* **2013**;61 (1):19-30. doi:10.1369/0022155412467353.
  293. Miner NB., O'Callaghan JP., Phillips TJ. and Janowsky A.; *Neurotoxicol Teratol* **2017**;61 :74-81. doi:10.1016/j.ntt.2017.02.003.
  294. Albertson DN., Pruetz B., Schmidt CJ., Kuhn DM., Kapatos G. and Bannon MJ.; *J Neurochem* **2004**;88 (5):1211-9. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02247.x.
  295. Fang F., Lue L-F., Yan S., et al.; *FASEB J* **2010**;24 (4):1043-55. doi:10.1096/fj.09-139634.
  296. Werling D., and Jungi TW.; **2003**. doi:10.1016/S0165-2427(02)00228-3.
  297. McCann UD., Kuwabara H., Kumar A., et al.; *Synapse* **2008**;62 (2):91-100. doi:10.1002/syn.20471.
  298. Krasnova IN., Hodges AB., Ladenheim B., et al.; *Neurosci Res* **2009**;65 (2):160-5. doi:10.1016/j.neures.2009.06.007.
  299. Alexander PD., Gicas KM., Willi TS., et al.; *Psychopharmacology (Berl)* **2017**;234 (9-10):1535-47. doi:10.1007/s00213-017-4551-7.
  300. Kolanos R., Solis E., Sakloth F., De Felice LJ. and Glennon R a.; *ACS Chem Neurosci* **2013**;4 (12):1524-9. doi:10.1021/cn4001236.
  301. Kolanos R., Sakloth F., Jain AD., Partilla JS., Baumann MH. and Glennon RA.; *ACS Chem Neurosci* **2015**;6 (10):1726-31. doi:10.1021/acchemneuro.5b00160.
  302. Rosas-Hernandez H., Cuevas E., Lantz SM., et al.; *Neurosci Lett* **2016**;629 :125-30. doi:10.1016/j.neulet.2016.06.029.
  303. EMCDDA - European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.; *Synthetic Cathinones Drug Profile*. <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones>. Accessed 29/29/2017.
  304. *Loja Online*. <https://www.exportersindia.com/bathdepot87/white-girl-concentrated-bath-salts-500mg-miami-united-states-1198489.htm>. Accessed 29/29/2017.
  305. Haegelen C., Coupé P., Fonov V., et al.; *Int J Comput Assist Radiol Surg* **2013**;8 (1):99-110. doi:10.1007/s11548-012-0675-8.
  306. Ares-Santos S., Granado N. and Moratalla R.; *J Intern Med* **2013**;273 (5):437-53. doi:10.1111/joim.12049.