

TERESA CUNHA-OLIVEIRA (1,2)
ANA CRISTINA REGO (1,2)
MARIA TERESA MORGADINHO (3)
TICE MACEDO (3)
CATARINA RESENDE OLIVEIRA (1,2)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia: POCTI/SAU-FCF/58330/2004 e SFRH/BD/10910/2002. Os autores agradecem à Dra. Maria Teresa Lopes da Silva (Instituto de Anatomia Patológica, Secção de Hematopatologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra), Sílvia Sousa Neves (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Coimbra) e Prof. Ana Bela Sarmiento (Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra) pela ajuda prestada nos estudos morfológicos.

RESUMO

O consumo repetido de drogas, nomeadamente opióides, conduz ao desenvolvimento de dependência. Entre os mecanismos envolvidos neste processo, comuns à maioria das drogas de abuso, destaca-se a activação da neurotransmissão dopaminérgica em zonas específicas do cérebro. O metabolismo oxidativo da dopamina confere-lhe um potencial neurotóxico devido à formação de espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Neste trabalho avaliou-se o efeito da exposição crónica de células PC12 à “heroína de rua” ou ao H_2O_2 na resposta destas células a uma exposição aguda a estes compostos, em comparação com células PC12 “naïve” (sem exposição prévia aos compostos). As células cronicamente expostas à heroína ou ao H_2O_2 apresentaram-se parcial ou totalmente resistentes, respectivamente, a uma exposição aguda ao H_2O_2 . Este efeito correlacionou-se com a manutenção dos níveis de ATP após exposição aguda ao H_2O_2 , em contraste com as células “naïve”. Para além disso, observou-se que a viabilidade das células cronicamente expostas à heroína e ao H_2O_2 era mais afectada pela heroína, comparativamente às células “naïve”. Esta sensibilização poderá ser explicada pelo aumento da acumulação extracelular de dopamina, induzida por estes compostos. Por outro lado, a exposição aguda à heroína de células já cronicamente expostas a esta droga de abuso induziu uma maior susceptibilidade comparativamente a células cronicamente expostas ao H_2O_2 . Esta observação poderá ser explicada por um decréscimo dos níveis intracelulares de ATP e ADP induzido pela incubação crónica com “heroína de rua”, o que indicia um compromisso energético destas células. Em resumo, a exposição crónica à “heroína de rua” altera os níveis energéticos celulares, os níveis extracelulares de dopamina e a resposta a estímulos citotóxicos, evidenciando-se o papel nocivo do consumo regular desta droga por toxicodependentes.

(1) Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina

(2) Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal

(3) Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal

ABSTRACT

The repeated use of opiates and other drugs of abuse leads to drug dependence. The most studied mechanism involved in this process is the activation of the dopaminergic neurotransmission in the mesolimbic/mesocortical pathway. Dopamine is potentially neurotoxic, due to the generation of reactive oxygen species, namely hydrogen peroxide (H_2O_2), following its oxidative metabolism. In this work we evaluated the effect of chronic exposure of PC12 cells to street heroin or H_2O_2 upon an acute exposure to these compounds, in comparison with naïve PC12 cells. Cells chronically exposed to heroin or H_2O_2 were respectively partially or totally resistant to an acute exposure to H_2O_2 . This effect was related to the maintenance of ATP levels upon acute exposure to H_2O_2 , in contrast with naïve PC12 cells. Moreover, the viability of cells chronically exposed to heroin and H_2O_2 was highly affected by an acute heroin exposure. This sensitization may be related to the increase in extracellular dopamine accumulation induced by these compounds. On the other hand, acute exposure to heroin in cells chronically exposed to this drug was more cytotoxic than in cells chronically exposed to H_2O_2 . This observation may be related to the decrease in intracellular levels of ATP and ADP induced by chronic exposure to street heroin. In summary, chronic exposure to street heroin induces changes in cellular energy levels, in extracellular dopamine levels and in the response to cytotoxic stimuli. Together, these observations reflect the harmful effects of repeated heroin abuse.

PALAVRAS-CHAVE: citotoxicidade, dopamina, heroína, nucleótidos de adenina, stress oxidativo

INTRODUÇÃO

O consumo repetido de drogas de abuso é responsável pelo desenvolvimento de dependência. Um dos mecanismos cerebrais envolvidos na dependência, comum à maioria das drogas de abuso, envolve o sistema de recompensa cerebral, do qual faz parte o circuito mesolímbico/mesocortical. O efeito destas drogas traduz-se num aumento da neurotransmissão dopaminérgica neste circuito (1), através de mecanismos específicos induzidos por cada classe de drogas. Para além da acção como neurotransmissor, a dopamina é potencialmente neurotóxica, devido ao facto do seu metabolismo (enzimático e não enzimático) produzir espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O H_2O_2 pode reagir com metais de transição, através da reacção de Fenton-Haber Weiss, dando origem ao radical hidroxilo ($\cdot OH$), o qual é altamente tóxico. Assim, a alteração do metabolismo da dopamina induz stress oxidativo e morte celular em células dopaminérgicas (2). O aumento dos níveis de espécies reactivas de hidrogénio pode levar à morte celular através da oxidação de macromoléculas

celulares importantes, tais como aminoácidos, fosfolípidos e ácidos nucleicos (3, para revisão). Neste contexto, a exposição aguda ao H_2O_2 induz morte celular por apoptose em células PC12 (4; 5). Em contraste, células repetidamente expostas a baixas concentrações de H_2O_2 tornam-se resistentes à toxicidade aguda deste composto (6; 7). Assim, a exposição aguda ao H_2O_2 pode ser usada como modelo de citotoxicidade, enquanto o tratamento crónico de células PC12 com H_2O_2 induz um modelo de adaptação celular (8).

Neste trabalho investigou-se o efeito da exposição crónica das células PC12 a concentrações sub-tóxicas de “heroína de rua” ou H_2O_2 , em comparação com células PC12 não expostas (células “naïve”). Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações tóxicas de “heroína de rua” ou H_2O_2 (exposição aguda), de acordo com estudos anteriores realizados no nosso laboratório (9; 10). Os resultados sugerem que a exposição crónica à “heroína de rua” altera a capacidade das células PC12 para responderem a estímulos citotóxicos, nomeadamente devido a um compromisso do metabolismo energético induzido por esta droga.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

A heroína foi obtida do Instituto da Droga e da Toxicodependência (IDT, Lisboa). As soluções May-Grünwald e Giemsa foram adquiridas à Merck (Darmstadt, Alemanha). As células PC12 foram adquiridas à ATCC (Manassas, VA, EUA). O meio RPMI e o MTT foram obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EUA).

Cultura de células PC12

As células PC12 (Greene and Tischler, 1976) foram cultivadas em frascos de 75cm², em meio RPMI 1640 contendo HEPES 25 mM, suplementado com soro de cavalo 10% (v/v), soro bovino 5% (v/v), estreptomicina 50 mg/ml e penicilina 50 U/ml. As culturas foram mantidas a 37°C numa incubadora com uma atmosfera 95% ar e 5% CO₂. Nas condições de tratamento crónico, as células foram cultivadas durante 7-12 meses em meio de cultura suplementado com concentrações sub-tóxicas de “heroína de rua” 10 μM ou H₂O₂ 10 μM. Nas condições de tratamento agudo, as células foram expostas durante 96 horas a 0,3 mM de “heroína de rua” ou durante 24 horas a 50 ou 75 μM de H₂O₂.

Avaliação da viabilidade celular

Após exposição aos diversos compostos, as células foram incubadas com uma solução de MTT 0,5 mg/ml em meio salino (em mM: NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 1, glicose 5,6, HEPES 20, CaCl₂ 1,5) durante 2 horas, no escuro, a 37°C. Os cristais formados foram dissolvidos com HCl 0,04 M em isopropanol, e a absorvência foi lida a 570 nm num leitor de ELISA Spectra SLT. Os resultados foram expressos em percentagem de redução do MTT relativamente às células controlo, não expostas à “heroína de rua” ou ao H₂O₂.

Análise da morfologia celular

A morfologia celular foi analisada através da coloração de esfregaços das células PC12 pelo

método de May-Grünwald-Giemsa. As células “naïve” e as células cronicamente expostas à “heroína de rua” ou ao H₂O₂ (1x10⁶ células), sujeitas ou não à exposição aguda a H₂O₂ (50 μM) durante 24 h, foram centrifugadas a 200 xg durante 5 minutos, ressuspensas em 30 μl FBS e colocadas numa lâmina de microscópio (esfregaço). Os esfregaços foram corados sequencialmente com as soluções May-Grünwald e Giemsa, e a morfologia celular foi avaliada usando um microscópio óptico Leits Dialux 20 acoplado a uma câmara fotográfica.

Determinação dos níveis intracelulares de nucleótidos de adenina

Os níveis intracelulares dos nucleótidos de adenina, ATP e ADP, foram determinados após extracção das células com ácido perclórico 0,3 M (0-4°C). As células foram centrifugadas a 15800xg durante 10 minutos, e o sedimento foi solubilizado com NaOH 1 M para quantificação da proteína total usando o *Biorad protein assay*. Os sobrenadantes foram neutralizados com KOH 5 M em Tris 2,5 M, centrifugados a 15800xg durante 10 minutos e armazenados a -80°C. As amostras foram testadas para a determinação dos níveis de ATP e ADP através da separação por HPLC de fase reversa (11).

Determinação dos níveis intra- e extracelulares de dopamina

Os níveis intracelulares de dopamina foram determinados após extracção das células com ácido perclórico 0,1 M (0-4°C). As células foram centrifugadas a 15800xg durante 10 minutos, e o sedimento foi solubilizado com NaOH 1 M para quantificação da proteína total usando o *Biorad protein assay*. Os sobrenadantes, armazenados a -80°C, foram extraídos com alumina, usando a dihidroxibezilamina (DHBA) como padrão interno, e testados para a determinação dos níveis de dopamina através da separação por HPLC de fase reversa, por adaptação do método descrito por Warnhoff *et al.* (12). Os níveis de dopamina acumulada no meio de cultura (extracelular) foram determinados usando o mesmo procedimento.

Análise estatística

Os dados apresentados correspondem à média \pm SEM de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em duplicado ou triplicado. A análise estatística foi realizada pelo teste t de student. O valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Susceptibilidade diferencial ao peróxido de hidrogénio e à heroína

Com o objectivo de comparar os efeitos da “heroína de rua” e do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) na viabilidade das células PC12 “naïve” ou cronicamente expostas a cada um destes compostos, avaliou-se a capacidade redutora das células após diferentes estímulos citotóxicos, através do teste do MTT (Figura 1A). As concentrações e o tempo de exposição foram determinados através de curvas de dose-resposta (dados não apresentados). Observou-se que a incubação com “heroína de rua” 0,3 mM, durante 96 horas, induziu um decréscimo da viabilidade celular na ordem dos 30% em células “naïve”, conforme observado anteriormente (9). Em células previamente expostas à “heroína de rua”, a mesma concentração de heroína produziu um decréscimo da viabilidade celular de cerca de 70% (Figura 1A), sugerindo uma maior susceptibilidade das células cronicamente expostas à heroína, quando expostas a uma concentração tóxica da mesma droga. Em células previamente expostas ao H_2O_2 , a heroína induziu um decréscimo de cerca de 50% da viabilidade celular (Figura 1A), evidenciando um menor grau de sensibilização aos efeitos tóxicos desta droga, em comparação com as células cronicamente expostas à heroína. Nestas condições não foi possível comparar os controlos das células cronicamente expostas entre si, uma vez que estas células apresentaram diferenças no estado de proliferação, inviabilizando a comparação da viabilidade celular através do teste do MTT, baseado na capacidade redutora celular. A exposição aguda ao H_2O_2 (50 μ M durante 24

horas) induziu um decréscimo da viabilidade celular de cerca de 70% em células “naïve”, enquanto em células cronicamente expostas a heroína, o decréscimo da viabilidade celular foi apenas cerca de 40% (Figura 1A). No entanto, o aumento da concentração de H_2O_2 para 75 μ M produziu um decréscimo da capacidade redutora das células “naïve” de cerca de 80%, em comparação com o controlo, enquanto nas células expostas cronicamente à heroína o decréscimo foi de aproximadamente 60% (Figura 1A). É de salientar o facto de em células cronicamente expostas ao H_2O_2 , a exposição aguda ao mesmo agente não ter induzido uma alteração significativa da viabilidade celular (Figura 1A). Este efeito representa uma adaptação celular ao H_2O_2 das células cronicamente expostas a uma concentração baixa de H_2O_2 . Por outro lado, as células cronicamente expostas à “heroína de rua” aparentam ser parcialmente resistentes ao H_2O_2 (Figura 1A).

A exposição aguda ao H_2O_2 induziu uma alteração da morfologia celular, avaliada pela técnica de May-Grunwald-Giemsa (Figura 1B), levando à desintegração da membrana e ao aparecimento de deformações membranares (“blebs”). Em células cronicamente expostas ao H_2O_2 , a morfologia celular apresentou-se semelhante ao controlo obtido após exposição aguda ao mesmo composto (Figura 1B), confirmando a resistência total destas células ao H_2O_2 . Em células cronicamente expostas à heroína, a exposição aguda ao H_2O_2 induziu uma alteração da morfologia celular, relativamente ao controlo (Figura 1B). Esta alteração foi menos evidente do que a alteração produzida em células “naïve”, o que parece estar de acordo com a resistência parcial sugerida pelo teste do MTT (Figura 1A).

Alteração do metabolismo energético induzida pela heroína

Uma vez que o H_2O_2 interfere com o metabolismo celular, investigou-se se a resistência parcial ao H_2O_2 em células cronicamente expostas à heroína ou a resistência total em células cronicamente expostas ao H_2O_2 estaria relacio-

nada com alterações dos níveis intracelulares dos nucleótidos de adenina, ATP (Figura 2A) e ADP (Figura 2B). Observou-se que a exposição aguda das células “naïve” ao H_2O_2 (50 mM) conduziu a um decréscimo dos níveis intracelulares de ATP (Figura 2A). Contudo, este decréscimo não foi compensado por um aumento dos níveis intracelulares de ADP (Figura 2B) ou de AMP (resultados não apresentados). A exposição crónica à heroína induziu um decréscimo dos níveis intracelulares de ATP e de ADP, o que sugere um compromisso energético conferido por esta droga de abuso. Nestas células, a exposição aguda ao H_2O_2 não induziu alterações significativas dos níveis de ATP observados nas células “naïve”, o que poderá justificar a resistência parcial destas células ao H_2O_2 , observada na Figura 1 A. Para além disso, e de acordo com a resistência total ao H_2O_2 (Figura 1A), não se observaram alterações significativas dos níveis intracelulares de ATP ou ADP em células cronicamente expostas ao H_2O_2 , antes ou após a incubação com H_2O_2 50 mM (Figura 2).

Papel da dopamina na sensibilização à heroína

Uma vez que as células PC12 constituem uma linha celular catecolaminérgica, e a dopamina é potencialmente neurotóxica, investigou-se se a sensibilização à heroína observada em células cronicamente expostas à heroína ou ao H_2O_2 estaria relacionada com alterações dos níveis intra- ou extracelulares de dopamina (Figura 3). Observou-se que a exposição aguda à “heroína de rua” induziu um decréscimo dos níveis intracelulares de dopamina (Figura 3A) e, paralelamente, um aumento da acumulação extracelular deste neurotransmissor (Figura 3B), em todos os subtipos celulares testados. Por outro lado, a exposição crónica à “heroína de rua” e ao H_2O_2 induziu um aumento da acumulação extracelular de dopamina (Figura 3B). Após exposição aguda à heroína, a acumulação extracelular de dopamina nas células cronicamente expostas ao H_2O_2 aumentou significativamente quando comparada com as células “naïve” (Figura 3B). Este aumento poderá de-

ver-se ao facto de estas células apresentarem um aumento, embora não estatisticamente significativo, dos níveis intracelulares de dopamina (Figura 3A). Não foram observadas alterações significativas dos níveis intracelulares de DOPAC em qualquer das condições experimentais testadas (resultados não apresentados).

DISCUSSÃO

Neste trabalho mostrou-se que o tratamento crónico das células PC12 com “heroína de rua” ou H_2O_2 induziu, respectivamente, uma resistência parcial ou total à citotoxicidade aguda do H_2O_2 , acompanhada de uma manutenção dos níveis intracelulares de ATP após exposição ao este agente oxidante.

As células cronicamente expostas à “heroína de rua” apresentaram uma maior susceptibilidade à exposição aguda à mesma droga, em comparação com as células cronicamente expostas ao H_2O_2 . Este facto poderá estar relacionado com a alteração do metabolismo energético em células cronicamente expostas à heroína, tal como evidenciado pelo decréscimo dos níveis intracelulares de ATP e ADP. Para além disso, a acumulação extracelular de dopamina parece contribuir para a susceptibilidade das células cronicamente expostas à heroína ou ao H_2O_2 , no que respeita à exposição aguda à heroína, sugerindo um papel citotóxico da dopamina.

A adaptação celular ao H_2O_2 pode ser explicada por dois mecanismos. Quando presente em concentrações moderadas (0,25 mM, durante 24 h), o H_2O_2 induz um aumento da capacidade antioxidante celular, nomeadamente através de um aumento da expressão da peroxidase do glutatião (13). Por outro lado, quando presente em concentrações baixas (0,05 mM, durante 24 h), o H_2O_2 induz um processo adaptativo que não parece estar associado com o aumento da capacidade antioxidante celular. Nestas condições, poderá ocorrer um bloqueio das vias de sinalização celular, envolvendo, nomeadamente, o factor nuclear κB (NF- κB) (14) ou a via da proteína cinase activada pelo stress (SAPK/JNK) (15), normalmente activadas

por concentrações tóxicas de H_2O_2 (1 mM) (13). A adaptação celular induzida por concentrações baixas de H_2O_2 pode também estar associada a um aumento da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético, tais como a sintetase do ATP (da cadeia respiratória mitocondrial) e a desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (da via glicolítica), como demonstrado através de análise proteómica (16). O aumento da expressão destas enzimas poderá explicar a manutenção dos níveis intracelulares de ATP e consequente resistência celular após a exposição aguda ao H_2O_2 de células cronicamente expostas ao H_2O_2 (Figura 2A), mas não em células cronicamente expostas à “heroína de rua”, uma vez que estas apresentaram um decréscimo dos níveis intracelulares dos nucleótidos de adenina (Figura 2). A análise proteómica sugere também que a adaptação ao H_2O_2 pode induzir o aumento da expressão de proteínas envolvidas no processamento do ARN, proteínas *chaperones* e proteínas envolvidas na regulação redox (16). Contrariamente, a toxicidade aguda do H_2O_2 poderá estar relacionada com a inibição da fosforilação de ADP, nomeadamente através da inibição da sintetase do ATP ou da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (17). Estes dados podem explicar o decréscimo dos níveis intracelulares de ATP observado nas células “naïve” após exposição aguda ao H_2O_2 (Figura 2A), tal como foi anteriormente observado por outros autores (18).

Por outro lado, o decréscimo dos níveis energéticos celulares induzido pela heroína poderá estar relacionado com a inibição da fosforilação oxidativa, uma vez que estudos anteriores observaram que o metabolito da heroína, a morfina, inibe a actividade da sintetase do ATP e da ATPase da membrana mitocondrial interna (19).

Estudos recentes demonstraram que a exposição ao H_2O_2 induz a libertação de dopamina em fatias de estriado de rato (20), tendo sido sugerido que o H_2O_2 pode interferir com a captação e/ou o armazenamento de dopamina em vesículas pré-sinápticas. Foi também demonstrado que o H_2O_2 induz inibição reversível da actividade do transportador de dopamina presente

na membrana plasmática (DAT), através de uma regulação redox dependente de cálcio (21). Desta forma, nas nossas condições, o aumento da acumulação extracelular de dopamina após exposição crónica ao H_2O_2 poderá ser explicado pela acção inibidora deste composto na actividade do DAT. Em estudos anteriores, verificámos que a exposição crónica à cocaína (um inibidor clássico do DAT) em células PC12 produziu efeitos semelhantes à exposição crónica ao H_2O_2 no que respeita aos níveis intra e extracelulares de dopamina (10).

Curiosamente, a exposição crónica à heroína conduziu também a um aumento dos níveis extracelulares da dopamina. Para além disso, a exposição aguda a esta droga potenciou a acumulação extracelular de dopamina em células cronicamente expostas ao H_2O_2 , em comparação com as células cronicamente expostas à heroína (Figura 3B). Contudo, os resultados obtidos não permitem esclarecer o mecanismo pelo qual a heroína conduz a um aumento dos níveis extracelulares de dopamina. A exposição à heroína pode induzir stresse oxidativo quando administrada intraperitonealmente em ratinhos (22; 23). Em estudos prévios observámos que o tratamento agudo das células PC12 com heroína induziu um aumento (não significativo) dos níveis intracelulares de hidroperóxidos, o que se correlacionou com um aumento dos níveis intracelulares de DOPAC (9). Estes dados sugerem que os efeitos citotóxicos da heroína poderão envolver um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes celulares. Desta forma, a resistência parcial ao H_2O_2 observada após exposição crónica à heroína poderá evidenciar alguma adaptação ao stress oxidativo.

Em conjunto, estes resultados mostram que a exposição prolongada das células catecolaminérgicas à heroína induz um compromisso energético nestas células e um aumento da sensibilidade a concentrações elevadas da mesma droga. Apesar disto, as células são mais resistentes ao H_2O_2 , o que sugere uma adaptação ao stress oxidativo. Estes dados são importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na dependência de drogas de abuso.

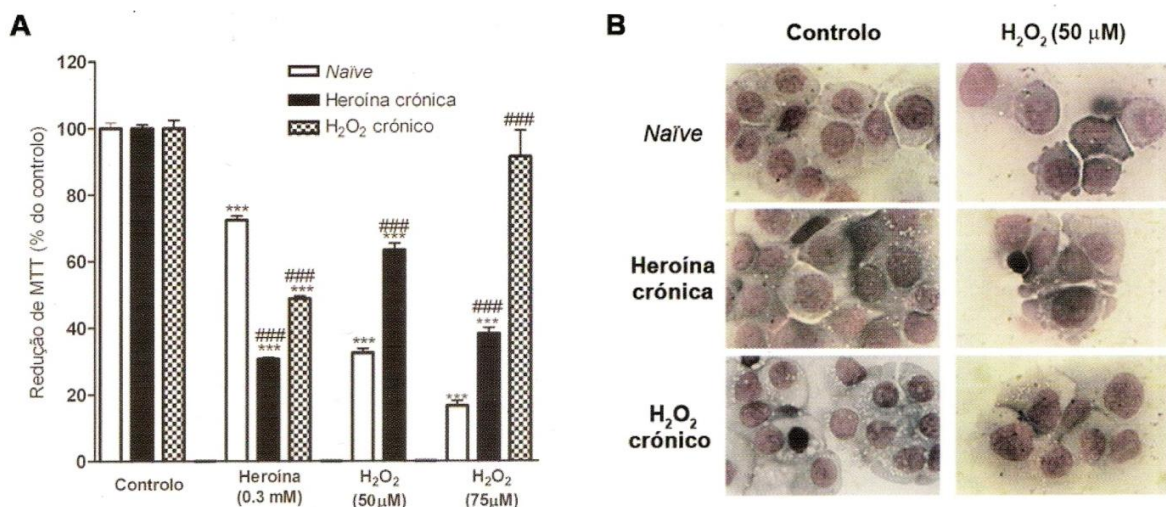


FIGURA 1: Análise da viabilidade celular das células cronicamente expostas à “heroína de rua” e ao H₂O₂, antes e após exposição aguda a concentrações tóxicas destes compostos. As células PC12 “naïve” ou cronicamente expostas à “heroína de rua” ou ao H₂O₂ (durante 7 a 12 meses) foram incubadas com “heroína de rua” 0,3 mM, durante 96 h ou com 50 ou 75 mM H₂O₂, durante 24 h. A) A viabilidade celular foi determinada pelo teste de redução de MTT. Os dados foram normalizados em percentagem dos respectivos controlos. Os valores correspondem à média±SEM de um mínimo de 3 experiências realizadas em triplicado. Foi considerado estatisticamente significativo: ***P<0,001, comparado com o respectivo controlo, e ###P<0,001, comparado com a mesma situação em células “naïve”. B) A morfologia celular foi analisada através da coloração de esfregaços de células pela técnica de May-Grünwald-Giemsa. Note-se a formação de protuberâncias membranares (“blebs”) e a redução do volume celular das células “naïve” e cronicamente expostas a heroína após exposição aguda ao H₂O₂ (50 mM, durante 24 h). As imagens são representativas de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado.

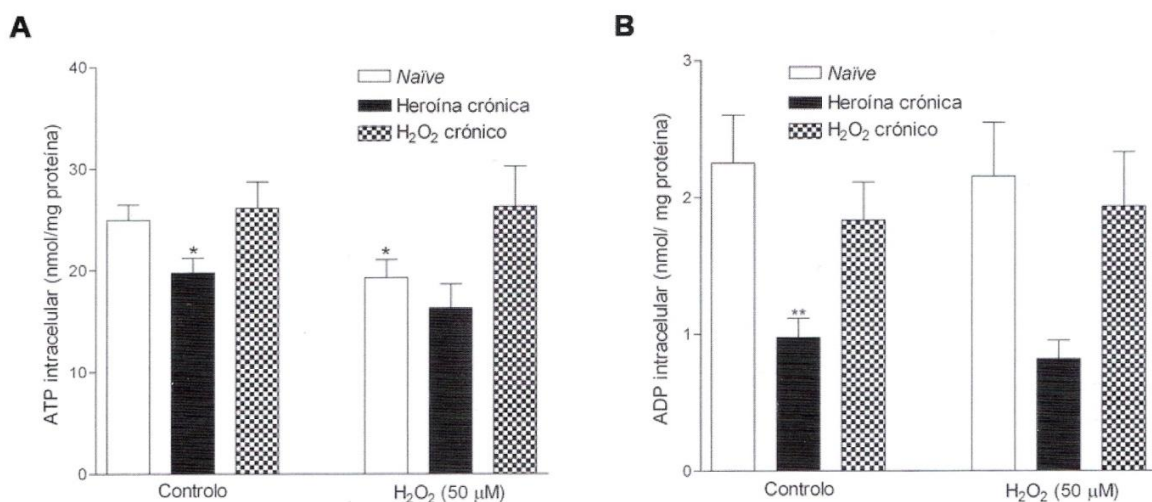


FIGURA 2: Avaliação dos níveis intracelulares de ATP (A) e ADP (B) antes e após exposição aguda ao H₂O₂. As células “naïve” e as células cronicamente expostas à “heroína de rua” e ao H₂O₂ foram incubadas com H₂O₂ 50 mM, durante 24 horas. Os níveis intracelulares dos nucleótidos de adenina foram determinados por HPLC de fase reversa com detecção por UV. Os dados correspondem à média±SEM de 4 experiências independentes, realizadas em triplicado. Foi considerado estatisticamente significativo *P<0,05 e **P<0,01, comparativamente ao controlo correspondente às células “naïve”.

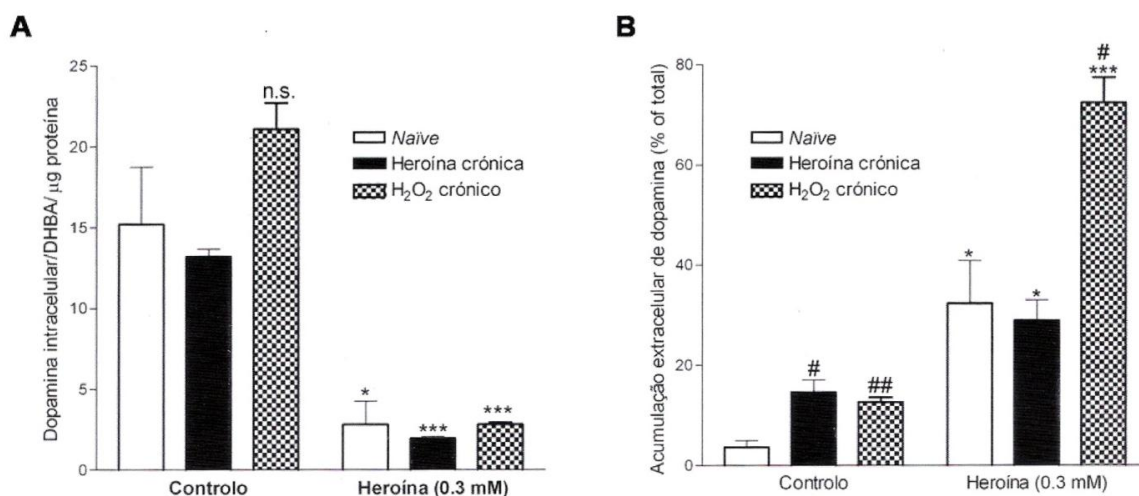


FIGURA 3: Determinação dos níveis intracelulares (A) e extracelulares (B) de dopamina antes e após exposição aguda à “heroína de rua”. As células “naïve” e as células cronicamente expostas à “heroína de rua” e ao H₂O₂ foram incubadas com a droga de abuso (0,3 mM), durante 96 horas. Os níveis intra e extracelulares de dopamina foram determinados por HPLC de fase reversa com detecção electroquímica. Os valores apresentados correspondem à média±SEM de 3 experiências realizadas em triplicado. Foi considerado estatisticamente significativo *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 relativamente ao respectivo controlo. #P<0,05 e ###P<0,001 relativamente às células “naïve” n.s.= não estatisticamente significativo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] DI CHIARA G, IMPERATO A. DRUGS abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(14):5274-5278.
- [2] JONES DC, GUNASEKAR PG, BOROWITZ JL, ISOM GE. Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells. *J Neurochem* 2000; 74(6):2296-2304.
- [3] CADET JL, BRANNOCK C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* 1998; 32(2):117-131.
- [4] BENEDI J, ARROYO R, ROMERO C, MARTIN-ARAGON S, VILLAR AM. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Life Sci* 2004; 75(10):1263-1276.
- [5] JANG JH, SURH YJ. Possible role of NF-kappaB in Bcl-X(L) protection against hydrogen peroxide-induced PC12 cell death. *Redox Rep* 2004; 9(6):343-348.
- [6] WIESE AC, PACIFICI RE, DAVIES KJ. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318(1):231-240.
- [7] DAVIES KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 1999; 48(1):41-47.
- [8] JACKSON GR, SAMPATH D, WERRBACH-PEREZ K, PEREZ-POLO JR. Effects of nerve growth factor on catalase and glutathione peroxidase in a hydrogen peroxide-resistant pheochromocytoma subclone. *Brain Res* 1994; 634(1):69-76.
- [9] OLIVEIRA MT, REGO AC, MORGADINHO MT, MACEDO TR, OLIVEIRA CR. Toxic effects of opioid and stimulant drugs on undifferentiated PC12 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 965:487-496.
- [10] CUNHA-OLIVEIRA T, REGO AC, MORGADINHO MT, MACEDO TR, OLIVEIRA CR. Differential cytotoxic responses of PC12 cells chronically exposed to psychostimulants or to hydrogen peroxide. *Toxicology*. In press.

- [11] REGO AC, SANTOS MS, OLIVEIRA CR. Adenosine triphosphate degradation products after oxidative stress and metabolic dysfunction in cultured retinal cells. *J Neurochem* 1997; 69(3):1228-1235.
- [12] WARNHOFF M. Simultaneous determination of norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their main metabolites in rat brain using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Enzymatic hydrolysis of metabolites prior to chromatography. *J Chromatogr* 1984; 307(2):271-281.
- [13] LEE BR, UM HD. Hydrogen peroxide suppresses U937 cell death by two different mechanisms depending on its concentration. *Exp Cell Res* 1999; 248(2):430-438.
- [14] KIM DK, CHO ES, LEE BR, UM HD. NF-kappa B mediates the adaptation of human U937 cells to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(5):563-571.
- [15] KIM DK, CHO ES, SEONG JK, UM HD. Adaptive concentrations of hydrogen peroxide suppress cell death by blocking the activation of SAPK/JNK pathway. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 23):4329-4334.
- [16] SEONG JK, KIM DK, CHOI KH et al. Proteomic analysis of the cellular proteins induced by adaptive concentrations of hydrogen peroxide in human U937 cells. *Exp Mol Med* 2002; 34(5):374-378.
- [17] HYSLOP PA, HINSHAW DB, HALSEY WA, JR. et al. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; 263(4):1665-1675.
- [18] MILUSHEVA E, SPERLAGH B, SHIKOVA L et al. Non-synaptic release of [3H]noradrenaline in response to oxidative stress combined with mitochondrial dysfunction in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 2003; 120(3):771-781.
- [19] GEGENAVA G, CHISTYAKOV V. Effect of morphine invitro on oxidative-phosphorylation in rat-liver mitochondria. *Bull Exp Biol Med* 1975; 80(10):1218-1220.
- [20] MILUSHEVA E, BARANYI M, KITTEL A, SPERLAGH B, VIZI ES. Increased sensitivity of striatal dopamine release to H₂O₂ upon chronic rotenone treatment. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(1):133-142.
- [21] HUANG CL, HUANG NK, SHYUE SK, CHERN Y. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. *J Neurochem* 2003; 86(5):1247-1259.
- [22] PAN J, ZHANG Q, ZHANG Y, OUYANG Z, ZHENG Q, ZHENG R. Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection. *Life Sci* 2005; 77(2):183-193.
- [23] QIUSHENG Z, YUNTAO Z, RONGLIANG Z, DEAN G, CHANGLING L. Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice. *Pharmazie* 2005; 60(7):539-543.