



NEUROTOXICIDADE DA “ECSTASY” E DOS SEUS METABOLITOS EM CÉLULAS HUMANAS DOPAMINÉRGICAS SH-SY5Y

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

Orientador: Professor Doutor João Paulo Soares Capela

Co-orientador: Professor Doutor Félix Dias Carvalho

Patrícia da Silva Ferreira
Setembro, 2009

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Paulo Soares Capela, pela orientação desta dissertação e por todo o apoio prestado ao longo deste percurso. Agradeço-lhe a forma paciente e disponível com que me transmitiu conhecimentos científicos e a forma entusiasta com que sempre me motivou e encorajou a prosseguir.

Ao Professor Doutor Félix Dias Carvalho, pela co-orientação deste trabalho, pela disponibilidade, estímulo e apoio científico prestado.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos pela forma como, com as suas aulas, os seus conhecimentos científicos e o seu entusiasmo, cultivou em mim o gosto pela Toxicologia e pela investigação.

A todas as pessoas do Laboratório de Toxicologia, pelo bom ambiente humano proporcionado e pela constante disponibilidade na ajuda, em especial à Professora Doutora Helena Carmo pelos bons conselhos na parte experimental, à Doutora Vera pelos conselhos úteis na parte escrita, à Dra. Renata pela ajuda na cultura celular e à Dra. Luciana pela determinação da GSSG.

Aos amigos que me têm acompanhado, pela amizade, boa disposição e incentivo em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional e pela constante ajuda em todas as fases da minha vida.

RESUMO

A “ecstasy” (3,4-metilenodioximetanfetamina ou MDMA) é uma droga de abuso, psicoestimulante e alucinogénica, que produz efeitos neurotóxicos tanto em animais de laboratório, como em humanos. A maioria dos estudos experimentais em animais de laboratório e clínicos em humanos foca essencialmente os efeitos agudos e a longo prazo da MDMA na função serotoninérgica. No entanto, existem estudos contundentes que demonstram que a administração de MDMA promove igualmente alterações agudas na libertação de dopamina no tecido cerebral de animais de laboratório, levando nomeadamente a neurotoxicidade dopaminérgica no cérebro de ratinhos. Acrescente-se que experiências em modelos animais demonstram que os metabolitos da MDMA podem desempenhar um papel importante na sua neurotoxicidade. A principal via metabólica da MDMA em humanos inclui a O-desmetilenação com formação do catecol N-metil- α -metildopamina (N-Me- α -MeDA). Em menor percentagem, a MDMA é N-desmetilada a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), a qual pode sofrer O-desmetilenação dando origem a α -metildopamina (α -MeDA), sendo esta última via metabólica a mais relevante no modelo experimental rato.

Este trabalho teve como objectivo estudar a neurotoxicidade da MDMA e dos seus metabolitos catecólicos, α -MeDA e N-Me- α -MeDA em células humanas dopaminérgicas. A linha celular SH-SY5Y, um neuroblastoma humano, apresenta marcadores neuronais dopaminérgicos sendo, por isso, um modelo *in vitro* bastante usado na investigação de fenómenos neurotóxicos que envolvam o sistema dopaminérgico.

Demonstrou-se, no decurso deste trabalho, que a MDMA e os seus metabolitos são neurotóxicos para as células dopaminérgicas SH-SY5Y. Os metabolitos da MDMA, são substancialmente mais tóxicos que a própria MDMA e apresentam uma neurotoxicidade dependente da concentração e do tempo de incubação. Nos trabalhos com α -MeDA e N-Me- α -MeDA verificou-se uma morte neuronal com características essencialmente apoptóticas sem contudo, haver activação da caspase 3.

Foram realizados estudos avaliando o potencial protector da N-acetilcisteína (NAC), tiron e GBR 12909 na neurotoxicidade induzida pela MDMA e seus metabolitos. Observou-se que o pré-tratamento das culturas celulares com tiron e GBR 12909 não previne a neurotoxicidade induzida pela MDMA e pelos seus metabolitos. Por outro lado, a adição prévia de NAC às culturas celulares confere protecção contra a neurotoxicidade induzida pela α -MeDA e pela N-Me- α -MeDA, conforme verificado nos testes de viabilidade celular.

Para avaliar o papel do stresse oxidativo no processo de neurotoxicidade, os níveis de glutathiona (GSH) intracelular foram determinados, assim como foi usada a

butionina sulfoximina (BSO), um inibidor da enzima limitante na síntese de GSH, a γ -glutamylcisteína sintetase. O tratamento das células com apenas BSO depleta drasticamente a GSH intracelular sem afectar a viabilidade celular. A incubação de células pré-tratadas com BSO juntamente com os metabolitos diminui significativamente os níveis de GSH intracelular, assim favorecendo o fenómeno neurotóxico. Além disso, a adição prévia de BSO evita a neuroprotecção conferida pela NAC à exposição aos metabolitos catecólicos, confirmando a hipótese de que a protecção da NAC se deve, pelo menos parcialmente, à síntese *de novo* de GSH.

Esta dissertação demonstra pela primeira vez a neurotoxicidade dopaminérgica da MDMA e dos seus metabolitos catecólicos em células de origem humana e o importante papel do stresse oxidativo nesse processo.

ABSTRACT

“Ecstasy” (3,4-methylenedioxymethamphetamine or MDMA) is a widely abused, psychoactive, recreational hallucinogenic drug, which is known to induce neurotoxic effects, both in laboratory animals as in humans. Most experimental works in animals and clinical studies in humans tend to focus essentially on acute and long-term effects of MDMA on the serotonergic function. However, there are clear evidences showing that the administration of MDMA promotes acute changes on dopamine release from brain tissue of laboratory animals, namely dopaminergic neurotoxicity in the brain of mice. Studies conducted in laboratory animals show that MDMA metabolites can have a crucial role in their neurotoxicity. In humans, the major metabolic pathway of MDMA includes O-demethylation with formation of catechol N-methyl- α -methyldopamine (N-Me- α -MeDA). At a lower rate, MDMA is N-demethylated to 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), which is further metabolized to the catechol α -methyldopamine (α -MeDA). This metabolic pathway is the most relevant in the rat experimental model.

This work aimed to study the neurotoxicity of MDMA and its catechol metabolites, α -MeDA and N-Me- α -MeDA, in dopaminergic human cells. The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y exhibits neuronal dopaminergic properties making it a very useful *in vitro* model to study neurotoxic phenomena related to the dopaminergic system.

This work has demonstrated that MDMA and its metabolites are neurotoxic to the dopaminergic cells SH-SY5Y. In particular, the MDMA metabolites are more neurotoxic than MDMA itself, and induced neurotoxicity in a concentration and time dependent manner. α -MeDA and N-Me- α -MeDA induced neuronal death followed the apoptotic pattern without caspase 3 activation was observed.

The protector potential of N-acetylcystein (NAC), tiron and GBR 12909 against the neurotoxicity of MDMA and its metabolites was also assessed. The pre-treatment of cell cultures with tiron and GBR 12909 did not prevent the neurotoxicity induced by MDMA and its metabolites. Furthermore, the previous addition of NAC to cell cultures gives protection against neurotoxicity induced by α -MeDA and by N-Me- α -MeDA, as viewed in life-death assays.

To assess the role of oxidative stress in the neurotoxic process, intracellular glutathione (GSH) levels were determined, as well as buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of the rate limiting enzyme in GSH synthesis, γ -glutamylcysteine synthetase, was used. Cultures treatment with only BSO dramatically depleted intracellular GSH levels without affecting cell viability. The pre-treatment with BSO before treatment with the metabolites largely decreases intracellular GSH levels thus favouring the neurotoxic phenomena. Furthermore, prior addition of BSO prevented the neuroprotection conferred

by NAC against catechol metabolites neurotoxicity, confirming that the protection of NAC is, at least partially, due to *de novo* synthesis of GSH.

This dissertation demonstrates for the first time dopaminergic toxicity of MDMA and its catechol metabolites in human cells and also the important role of oxidative stress in this neurotoxic process.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
CAPÍTULO I – Introdução Geral.....	1
1. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	2
2. INTRODUÇÃO.....	3
2.1. História da “ecstasy”.....	3
2.2. Via de administração e padrão de utilização.....	4
3. FARMACOLOGIA DA MDMA.....	7
3.1. Inibição dos transportadores monoaminérgicos pela MDMA..	7
3.2. MDMA e o sistema serotoninérgico.....	8
3.3. MDMA e o sistema dopaminérgico.....	10
3.4. Propriedades alucinogénicas da MDMA.....	11
3.5. Afinidade da MDMA para outros receptores.....	12
4. FARMACOCINÉTICA.....	13
4.1. Absorção e distribuição.....	13
4.2. Metabolismo.....	14
4.3. Excreção.....	18
5. EFEITOS AGUDOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	20
6. EFEITOS AGUDOS EM HUMANOS.....	23
7. EFEITOS A LONGO PRAZO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	26
7.1. Neurotoxicidade em animais de laboratório.....	26
7.1.1. Neurotoxicidade em ratos.....	26
7.1.2. Neurotoxicidade em ratinhos.....	30
7.1.3. Neurotoxicidade em primatas.....	32
7.2. Neurotoxicidade em humanos.....	33
8. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE.....	38
8.1. Bioactivação metabólica da MDMA.....	38
8.2. Influência da temperatura.....	41
8.3. Influência da DA.....	42
8.4. Influência da 5-HT e dos seus metabolitos.....	45
8.5. Influência da inibição da TPH.....	46
8.6. Influência do 5-HTT.....	47

8.7. Influência do Glutamato.....	48
8.8. Influência do NO.....	50
8.9. Influência do receptor 5-HT _{2A}	51
9. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO.....	53
CAPÍTULO II – Parte Experimental.....	54
1. A LINHA CELULAR SH-SY5Y.....	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
2.1. Materiais.....	57
2.2. Cultura celular.....	57
2.3. Determinação da viabilidade celular.....	58
2.4. Morte celular por fragmentação do DNA.....	58
2.5. Determinação da actividade da caspase 3.....	58
2.6. Determinação da glutathiona reduzida e oxidada.....	59
2.7. Análise estatística.....	59
3. RESULTADOS.....	60
3.1. Neurotoxicidade da MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA nas células SH-SY5Y.....	60
3.2. Efeito da NAC, tiron, GBR 12909 e BSO na neurotoxicidade induzida pela MDMA e metabolitos nas células SH-SY5Y.....	62
3.3. Avaliação da fragmentação do DNA e da activação da caspase 3 em células SH-SY5Y expostas à MDMA e aos seus metabolitos.....	67
3.4. Determinação da GSH.....	68
CAPÍTULO III – Discussão e Conclusões.....	73
1. DISCUSSÃO.....	74
2. CONCLUSÕES.....	81
CAPÍTULO IV – Referências.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), mescalina e anfetamina.....	3
Figura 2. Comprimidos de “ecstasy”	5
Figura 3. Mecanismo de acção farmacológica da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) no terminal nervoso serotoninérgico e no espaço sináptico. A MDMA, tal como a serotonina (5-HT), é um substrato do transportador de serotonina (5-HTT) (1). A MDMA entra nas vesículas de armazenamento de 5-HT (2). A MDMA inibe a triptofano hidroxilase (TPH) (3). A 5-HT é degradada pela monoamina oxidase (MAO), a qual é parcialmente inibida pela MDMA (4). A MDMA promove uma rápida libertação de 5-HT intracelular para o espaço sináptico através da reversão da actividade do 5-HTT (5). A MDMA actua como agonista dos receptores de 5-HT do tipo 2A (5-HT _{2A}) (6).....	9
Figura 4. Principais vias do metabolismo e metabolitos da MDMA.....	18
Figura 5. Neurónios serotoninérgicos do córtex cerebral de macacos Squirrel. Controlo (A), duas semanas após a administração de MDMA (5 mg/Kg, duas vezes por dia, durante 4 dias consecutivos) (B) e 7 anos após a administração de MDMA (C). É evidente a redução na densidade dos axónios duas semanas após a exposição à MDMA e que persiste 7 anos após essa exposição. Adaptado de Hatzidimitriou e col., 1999.....	33
Figura 6. Neurotoxicidade da MDMA (A), α -MeDA (B) e N-Me- α -MeDA (C) avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT. As culturas celulares SH-SY5Y, foram expostas por um período de 24 e 48 h a diferentes concentrações (100, 200, 400 e 800 μ M). Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=24 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ concentração versus controlo; ### $p<0,01$ concentração às 48 h versus concentração às 24 h).....	61
Figura 7. Efeito do pré-tratamento com NAC (1 mM), tiron (100 μ M) e GBR 12909 (1 μ M) na neurotoxicidade induzida pela MDMA, avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT. As células SH-SY5Y foram incubadas com MDMA na concentração de 400 μ M durante 48 h. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o	

valor de 100 % (n=18 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p<0,01$ tratamento versus controlo).....62

Figura 8. Efeito do pré-tratamento com tiron (100 μ M) e GBR 12909 (1 μ M) na neurotoxicidade induzida pela α -MeDA (400 μ M) (A) e pela N-Me- α -MeDA (400 μ M) (B), avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT, após um período de incubação de 48 h com os metabolitos. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=18 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p<0,01$ tratamento versus controlo).....63

Figura 9. Efeito do pré-tratamento com 1 mM de NAC e com 25 μ M de BSO na neurotoxicidade induzida por 400 μ M de α -MeDA, avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT, após um período de incubação das culturas celulares de 48 h. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=18 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p<0,01$ tratamento versus controlo; $^{##} p<0,01$ α -MeDA + NAC versus α -MeDA; $^{**} \alpha$ -MeDA + NAC + BSO versus α -MeDA + NAC).....64

Figura 10. Efeito do pré-tratamento com 1 mM de NAC e com 25 μ M de BSO na neurotoxicidade induzida por 400 μ M de N-Me- α -MeDA, avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT, após um período de incubação das culturas celulares de 48 h. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=18 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos, pelo teste de Student-Newman-Keuls, foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ tratamento versus controlo; $^{##} p<0,01$ N-Me- α -MeDA + NAC, N-Me- α -MeDA + BSO e N-Me- α -MeDA + NAC + BSO versus N-Me- α -MeDA; $^{+} p<0,05$ N-Me- α -MeDA + NAC + BSO versus N-Me- α -MeDA + NAC).....65

Figura 11. Fotografias das células SH-SY5Y obtidas ao microscópio invertido com contraste de fase (ampliação 400X) após 24 h de exposição: controlo (A), NAC (1 mM) (B), MDMA (400 μ M) (C), MDMA (400 μ M) + NAC (1 mM) (D), α -MeDA (400 μ M) (E), α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM) (F), N-Me- α -MeDA (400 μ M) (G), N-Me- α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM)(H).....66

Figura 12. Fragmentação internucleossomal do DNA nas culturas celulares 48 h após a adição de NAC (1 mM), MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M), N-Me- α -MeDA (400 μ M), MDMA (400 μ M) + NAC (1 mM), α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM), N-Me- α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM). Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 %. Médias obtidas com uma experiência representativa com n=3.....67

Figura 13. Actividade da caspase 3 nas culturas celulares 48 h após a incubação das células SH-SY5Y com NAC (1 mM), MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M), N-Me- α -MeDA (400 μ M), MDMA (400 μ M) + NAC (1 mM), α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM), N-Me- α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM). Os dados são apresentados como absorvância (Abs) em função do conteúdo proteico (n=6 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).....68

Figura 14. Efeito da exposição das células SH-SY5Y, por um período de 24 h, com MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M), N-Me- α -MeDA (400 μ M) e do pré-tratamento com NAC (1 mM): na quantidade total de proteína apresentada como percentagem do controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (A) e nos níveis de GSH intracelular apresentado em μ mol/mg de proteína (B) (n=9 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ tratamento versus controlo; ### $p<0,01$ metabolito + NAC versus metabolito).....70

Figura 15. Determinação do conteúdo proteico nas culturas celulares expostas à α -MeDA (400 μ M) (A) e à N-Me- α -MeDA (400 μ M) (B), assim como com os agentes farmacológicos NAC (1 mM) e BSO (25 μ M), por um período de 48 h. O conteúdo em proteína total é apresentado como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=9 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p<0,01$ tratamento versus controlo; # $p<0,05$; ### $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + NAC, metabolito + BSO + NAC versus metabolito; $^{\text{££}}$ $p<0,01$ metabolito + BSO + NAC versus metabolito + NAC; ** $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + BSO + NAC versus BSO).....71

Figura 16. Efeito nos níveis de GSH intracelular da exposição das culturas celulares à α -MeDA (400 μ M) (A) e N-Me- α -MeDA (400 μ M) (B), assim como com os agentes

farmacológicos NAC (1 mM) e BSO (25 μ M), por um período de 48 h. O conteúdo em GSH intracelular é apresentado em μ mol/mg de proteína (n=8 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ tratamento versus controlo; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + NAC, metabolito + BSO + NAC versus metabolito; $^{\text{££}}$ $p<0,01$ metabolito + BSO + NAC versus metabolito + NAC; ++ $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + BSO + NAC versus BSO).....72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Factores que contribuem para a hipertermia provocada pela MDMA...	24
Tabela 2. Sintomas adversos agudos após consumo de MDMA.....	25
Tabela 3. Toxicidade aguda da MDMA.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina de soro bovino
BSO	Butionina sulfoximina
C _{máx}	Concentração máxima
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CSF	Fluído cerebroespinal
CYP	Citocromo P450
DA	Dopamina
DAT	Transportador da dopamina
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOI	(±)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-amiopropano
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EM	Metabolizadores extensivos
FBS	Soro bovino fetal
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GLU	Glutamato
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
HClO ₄	Ácido perclórico
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
HMA	4-hidroxi-3-metoxianfetamina, 3-O-Me-α-MeDA
HMMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina, 3-O-Me-N-Me-α-MeDA
HO•	Radical hidroxilo
Hsp-70	Proteína de choque térmico 70
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTT	Transportador da serotonina
HVA	Ácido homovanílico
IDT	Instituto da Droga e da Toxicodependência
KHCO ₃	Bicarbonato de sódio
K _i	Constante de inibição
L-DOPA	L-3,4-diidroxifenilalanina
L-NNA	N ^ω -nitro-L-arginina
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
MAO	Monoamina oxidase
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
α-MeDA	3,4-dihidroxianfetamina, α-metildopamina, HHA

METH	Metanfetamina
MK-801	Dizocilpina
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Fosfato do dinucleótido de β-nicotinamida e adenina na forma reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Noradrenalina, norepinefrina
NEAA	Aminoácidos não essenciais
NET	Transportador da noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
N-Me-α-MeDA	3,4-dihidroxi-metanfetamina, N-metil-α-metildopamina, HHMA
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
ONOO ⁻	Anião peroxinitrito
PBN	N-tert-butil alfa-fenilnitrona
PBS	Tampão fosfato-salino
PET	Tomografia de emissão de positrões
PKC	Proteína cínase C
PM	Metabolizadores pobres
RA	Ácido retinóico
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S-MTC	S-metil-L-tiocitrulina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido dismutase
SPECT	Tomografia computadorizada de emissão simples de fotões
t _{1/2}	Tempo de semi-vida
TH	Tirosina hidroxilase
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecaoilforbol
TPH	Triptofano hidroxilase
UCP-3	Proteína de desacoplamento 3
UM	Metabolizadores ultra-rápidos
VMAT	Transportador vesicular monoaminérgico
γ-GluCis	γ-glutamilcisteína

CAPÍTULO I

Introdução Geral

1. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

- **Capítulo I - Introdução geral**

Neste capítulo é elaborada uma revisão geral da literatura no que diz respeito à história da MDMA, desde a sua descoberta até à sua utilização recreativa como droga de abuso. São também referidas as características químicas, a farmacocinética, mecanismos de acção farmacológica, efeitos agudos, neurotoxicidade e mecanismos de neurotoxicidade.

- **Capítulo II - Parte experimental**

Este capítulo inclui os materiais e métodos seguidos no procedimento experimental. São também apresentados os resultados do trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação.

- **Capítulo III - Discussão e Conclusões**

Neste capítulo são discutidos os resultados e integrados com a literatura e estudos anteriores. Adicionalmente, são sumariadas as conclusões retiradas dos estudos incluídos nesta dissertação.

- **Capítulo IV - Referências**

No último capítulo encontram-se as referências da literatura usadas nos capítulos I, II e III.

2. INTRODUÇÃO

2.1. História da “ecstasy”

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), vulgarmente conhecida como “ecstasy”, é uma feniletilamina com estrutura química semelhante à da anfetamina e à da mescalina (Figura 1), o que lhe confere propriedades farmacológicas estimulantes e alucinogénicas (1).

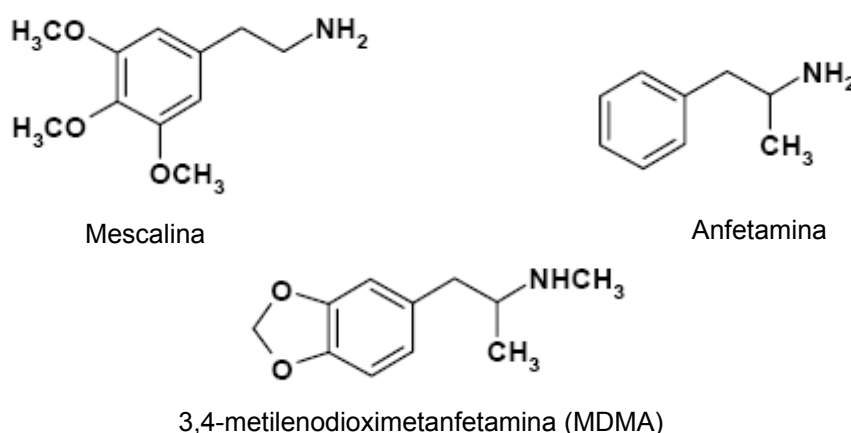


Figura 1. Estrutura química da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), mescalina e anfetamina.

A MDMA foi sintetizada pela primeira vez em 1912 pela indústria química alemã Merck. É frequente encontrar descrito na literatura que a MDMA foi patenteada como supressor do apetite, mas Freudemann e colaboradores, nas suas investigações recorrendo aos documentos originais do arquivo da Merck, demonstraram que a MDMA foi desenvolvida como um precursor de um composto terapêutico e que nunca houve intenção de a usar como anoréctica (2). Os primeiros estudos farmacológicos realizados pela Merck surgem em 1927, sendo a MDMA testada apenas em animais (2). A toxicologia da MDMA começou a ser estudada nos anos 50 juntamente com outros análogos da mescalina pelo exército dos Estados Unidos da América, presumivelmente fazendo parte de um programa químico de segurança (3).

Em 1965 o químico norte-americano Alexander Shulgin sintetizou MDMA no seu laboratório. O primeiro trabalho a demonstrar que a MDMA tinha efeitos psicoactivos nos humanos foi realizado por Shulgin e Nichols (4). Durante os anos 70 e início dos anos 80, a MDMA começou a ser usada em psicoterapia, uma vez que se considerava que o seu uso num esquema terapêutico controlado aumentava a auto-estima do paciente e facilitava a comunicação entre pacientes e terapeutas. Com este objectivo era

administrada oralmente (75 a 175 mg) aos pacientes e notava-se que produzia efeitos simpaticomiméticos, tais como o aumento do ritmo cardíaco, da pressão arterial e do nível de ansiedade (5, 6).

Em 1985 a agência Norte Americana “Drug Enforcement Administration” classificou a MDMA como substância “Schedule I controled substance” (substâncias com elevado potencial de abuso, sem utilizações clínicas reconhecidas e sem segurança aceitável mesmo sob supervisão médica) devido à evidência de que a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), composto relacionado e metabolito da MDMA, induz degeneração dos terminais serotoninérgicos em animais de experiência (7). Apesar destas restrições, a MDMA propagou-se muito rapidamente como droga recreativa, sendo mais vulgarmente conhecida por “ecstasy”, “Adam”, “XTC”, “E” ou “droga do amor”. A partir dos anos 80, a MDMA tornou-se bastante popular tanto nos Estados Unidos da América como na Europa, sendo principalmente consumida pelos jovens nas pistas de dança. Foi a partir de eventos musicais na ilha espanhola Ibiza, entre 1987 e 1988, nos quais muitos participantes experimentaram a MDMA, que surgiram as festas “rave”. Com elas, o uso de “ecstasy” popularizou-se na Europa pois, depois de terminado o evento, os jovens voltaram para os seus países com o desejo de perpetuar a experiência (8).

2.2. Via de administração e padrão de utilização

A “ecstasy” é geralmente consumida por via oral, embora também possa ser injectada ou inalada. Surge em forma de comprimidos, barras, cápsulas ou pó. Os comprimidos podem apresentar diversos aspectos, tamanhos e cores, de forma a tornarem-se mais atractivos e comerciais (Figura 2). Uma vez que se trata de uma droga sintetizada clandestinamente, a dose e a pureza variam consideravelmente, mas em média cada comprimido contém entre 80 e 150 mg de MDMA (1). O início dos efeitos provocados pela MDMA pode levar 20 a 60 minutos a ocorrer, atingindo normalmente o pico 60 a 90 minutos após a ingestão; os seus efeitos podem estender-se durante 3 a 5 horas (h). O que justifica a popularidade desta droga entre os jovens são os seus efeitos: euforia, sensação de bem-estar, aumento do estado de vigília e alerta, sentimentos de confiança e empatia com as pessoas ao redor, redução dos pensamentos negativos e diminuição das inibições (9).



Figura 2. Comprimidos de “ecstasy”.

De acordo com o relatório publicado pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) de 2008, a nível mundial, a seguir à “cannabis” a substância ilegal mais consumida é algum tipo de droga sintética, embora à escala europeia existam presentemente mais consumidores de cocaína. A produção mundial de “ecstasy” foi estimada em 102 toneladas em 2006. A Europa continua a ser o principal centro de produção de “ecstasy”, embora a sua importância relativa pareça estar a decrescer, já que essa produção alastrou a outras partes do mundo, nomeadamente à América do Norte e ao leste e sudeste da Ásia (10).

O relatório da OEDT revela que a “ecstasy” foi consumida a título experimental por 0,3 % a 7,3 % da população adulta europeia. Estima-se que quase 9,5 milhões de europeus consumiram “ecstasy” (uma média de 3 %) e quase 3 milhões consumiram-na no último ano. Entre a população jovem (15-34 anos), a prevalência do consumo de “ecstasy” ao longo da vida varia entre 0,5 % e 14,6 %. Estima-se que 7,5 milhões (5,6 %) de jovens europeus experimentaram “ecstasy” e 2,5 milhões (1,8 %) fizeram-no no último ano. Na faixa etária dos 15 aos 24 anos, a prevalência do consumo de “ecstasy” ao longo da vida varia entre 0,4 % e 18,7 % (10).

Os estudos sobre o consumo de droga em contextos recreativos, como os eventos de dança, podem proporcionar uma perspectiva útil sobre o comportamento das pessoas que consomem drogas estimulantes de forma regular ou intensiva. As taxas de consumo de droga nestes contextos são normalmente elevadas, mas não se podem generalizar à população em geral. Um inquérito anual realizado pela revista de música do Reino Unido *Mixmag* aos leitores, cujo público é constituído por pessoas que frequentam

clubes de dança regularmente, concluiu que a percentagem de pessoas definidas como grandes consumidoras de “ecstasy” (que consomem normalmente mais de quatro comprimidos por sessão) aumentou para mais do dobro entre 1999 e 2003, de 16 % para 36 % (11). Embora a representatividade desta amostra seja questionável, vem confirmar a preocupação geral de que a quantidade de comprimidos de “ecstasy” consumidos por alguns grupos de consumidores tenha aumentado. Num estudo realizado pela internet no Reino Unido (12) também é mencionado um consumo de “ecstasy” e um policonsumo de drogas cada vez mais intenso por parte dos consumidores de “ecstasy” experientes.

Um estudo que teve como população alvo os jovens, dos 15 aos 30 anos, que frequentam regularmente locais de diversão nocturna, realizado no ano de 2006 em cidades europeias (Atenas, Berlim, Lisboa, Liverpool, Liubliana, Palma, Veneza e Viena) apresentou estimativas de consumo ao longo da vida de 27 % para a “ecstasy”. O consumo frequente desta droga era muito menor, tendo apenas 1,4 % dos inquiridos respondido que consumiam “ecstasy” uma vez ou mais por semana. A média de idades para o consumo da droga no grupo estudado era de 18 anos. O consumo concomitante de álcool era comum, tendo 34 % dos entrevistados respondido que se tinham embriagado duas vezes nas quatro semanas anteriores à entrevista (10).

Em Portugal o consumo de “ecstasy” surgiu no início da década de 90 e à semelhança dos restantes países da Europa, ganhou rapidamente adeptos entre os jovens portugueses. Nos resultados dos vários estudos epidemiológicos realizados ao longo dos anos, o consumo de “ecstasy” tem vindo a ganhar visibilidade surgindo, de um modo geral, nos estudos mais recentes como a terceira droga com maior prevalência de consumo no contexto da população geral. O relatório anual de 2007 do Instituto da Droga e da Toxicodependência (IDT) revela que nos estudos nacionais de 2007 a “ecstasy” surgiu como a terceira droga preferencial dos portugueses, quer na população total (15-64 anos) quer na população jovem adulta (15-34 anos). Entre 2001 e 2007, registou-se um aumento da prevalência de “ecstasy” ao longo da vida na população total de 0,7 % para 1,3 %, enquanto na população jovem adulta o aumento foi de 1,4 % para 2,6 % (13).

3. FARMACOLOGIA DA MDMA

A MDMA afecta as funções do Sistema Nervoso Central (SNC) e do Sistema Nervoso Periférico (SNP), actuando principalmente no sistema monoaminérgico. A MDMA promove a libertação de neurotransmissores das vesículas dos terminais nervosos monoaminérgicos e da medula supra-renal, nomeadamente de serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) e das catecolaminas noradrenalina (NE, norepinefrina), adrenalina e dopamina (DA). Esta libertação origina um estado de estimulação simpática cuja intensidade e duração é proporcional à dose e via de administração.

A libertação de monoaminas após ingestão de MDMA não foi estudada em humanos nem em primatas não humanos, mas os dados obtidos com outros animais de laboratório, nomeadamente ratos e ratinhos, provaram que a MDMA actua como agonista monoaminérgico indirecto (14). Os primeiros estudos efectuados nos anos 80 revelaram que a MDMA estimula o efluxo de 5-HT e em menor extensão de DA no tecido nervoso (14-16). Descobertas posteriores revelaram que a MDMA interage com as proteínas transportadoras de monoaminas para estimular a libertação de 5-HT, DA e NE no cérebro de ratos (17, 18).

3.1. Inibição dos transportadores monoaminérgicos pela MDMA

Foi demonstrada a capacidade da MDMA para inibir o transportador da DA (DAT), da NE (NET) e da 5-HT (5-HTT) do homem, rato e ratinho (19-21). Um estudo realizado recentemente analisou a potência de uma mistura racémica de MDMA para inibir o DAT, o NET e o 5-HTT de humanos e de ratinhos (21). Neste estudo foram usadas culturas de células intestinais 407 que expressam estes receptores. Nas células que expressam os transportadores humanos, a mistura racémica de MDMA mostrou maior potência na inibição do NET, seguindo-se o 5-HTT e por último o DAT (21). Nas células intestinais que expressam os transportadores de ratinho a ordem de potências da MDMA para inibir os transportadores monoaminérgicos foi: 5-HTT > NET > DAT, estando estes resultados de acordo com os dados obtidos em ratos (21). Quando comparada com a metanfetamina (METH) e com a anfetamina, a principal consequência da introdução de um anel metilenodioxo na molécula de MDMA, é o aumento substancial da potência da MDMA para inibir o 5-HTT, enquanto a potência para inibir o DAT e o NET é diminuída. Estudos com preparações de sinaptossomas do cérebro de ratos indicam que a MDMA induz a libertação de NE com uma potência similar à de 5-HT e superior à de DA (19). Consistente com os resultados *in vitro*, a microdiálise *in vivo* demonstrou que a MDMA

aumenta os níveis extracelulares de 5-HT e DA no cérebro de ratos, sendo os efeitos na concentração de 5-HT de maior magnitude (22-24).

3.2. MDMA e o sistema serotoninérgico

Em condições fisiológicas, a 5-HT libertada pelos terminais com a chegada de um potencial de acção, pode ser recapturada para o terminal serotoninérgico através dos sistemas de transporte de 5-HT que funcionam coordenados. Um recapta a 5-HT extracelular para o interior da célula - 5-HTT - e o outro transporta o neurotransmissor para o interior das vesículas - transportador vesicular monoaminérgico (VMAT) - onde a 5-HT é armazenada em grandes quantidades. Pensa-se que a MDMA pode ser transportada por estes dois sistemas para o interior celular e vesicular, o que vai alterar fortemente o normal transporte de 5-HT. Desta forma, o neurotransmissor em vez de entrar nos terminais nervosos e seguidamente nas vesículas de armazenamento, segue o caminho inverso e sai dos compartimentos celulares.

O processo de libertação do neurotransmissor induzido pela MDMA ocorre por dois mecanismos: (1) a 5-HT sai da célula para o espaço sináptico, de acordo com o seu gradiente de concentração, através do transportador 5-HTT, como consequência do transporte de MDMA para o interior do neurónio; (2) a concentração citoplasmática de neurotransmissor aumenta devido à sua libertação das vesículas de armazenamento induzida pela MDMA (17, 18, 22, 25-27). O rápido aumento da libertação de 5-HT das vesículas de armazenamento deve-se ao facto da MDMA ser um substrato do VMAT e possivelmente, entrar nas vesículas através deste transportador e depletar o neurotransmissor armazenado por reverter o processo normal de transporte (26). Em concentrações elevadas, a MDMA pode entrar nas vesículas sinápticas por difusão passiva e, sendo uma base fraca, promover o aumento do pH vesicular e conduzir ao efluxo de 5-HT via VMAT. O baixo pH no interior das vesículas é mantido através de um gradiente de protões de hidrogénio regulado por uma bomba dependente da adenosina trifosfato (ATP) (28). Os detalhes do mecanismo de acção da MDMA no terminal nervoso serotoninérgico e no espaço sináptico estão representados na figura 3.

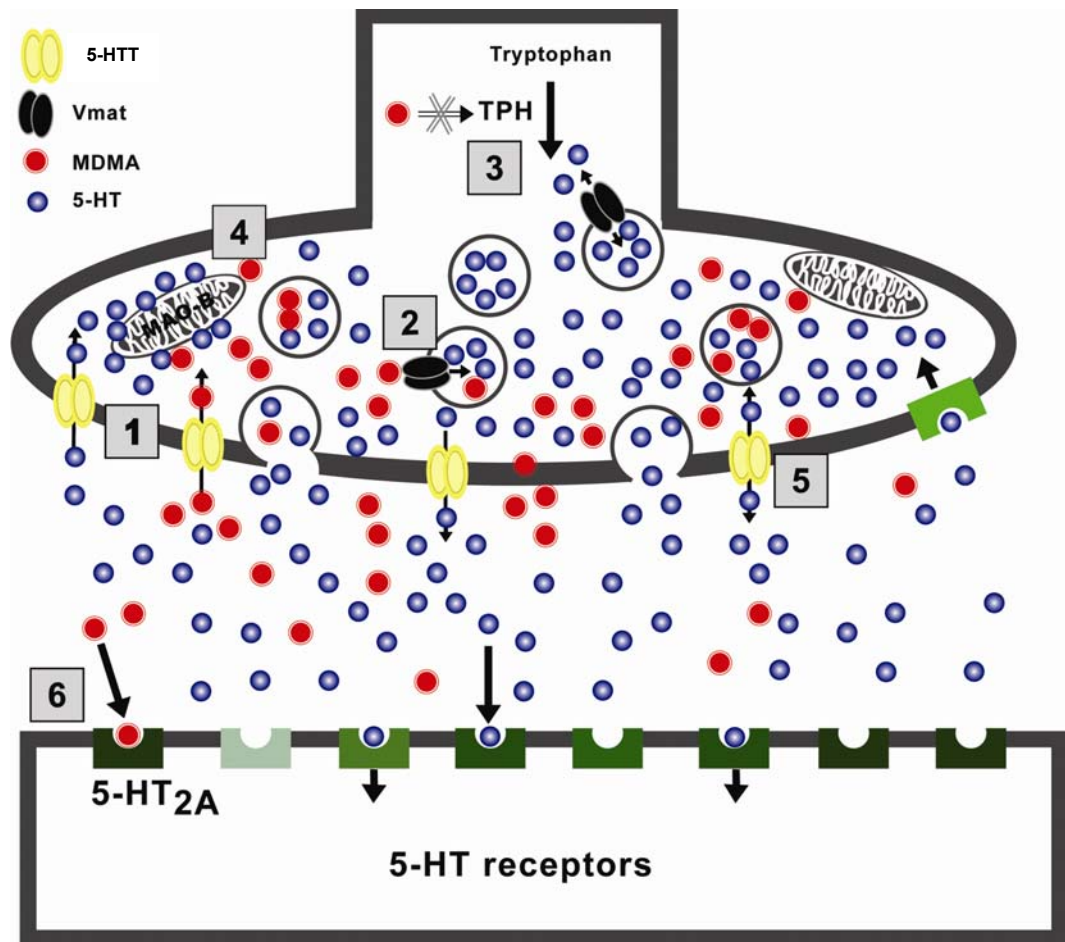


Figura 3. Mecanismo de acção farmacológica da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) no terminal nervoso serotoninérgico e no espaço sináptico. A MDMA, tal como a serotonina (5-HT), é um substrato do transportador de serotonina (5-HTT) (1). A MDMA entra nas vesículas de armazenamento de 5-HT (2). A MDMA inibe a triptofano hidroxilase (TPH) (3). A 5-HT é degradada pela monoamina oxidase (MAO), a qual é parcialmente inibida pela MDMA (4). A MDMA promove uma rápida libertação de 5-HT intracelular para o espaço sináptico através da reversão da actividade do 5-HTT (5). A MDMA actua como agonista dos receptores de 5-HT do tipo 2A (5-HT_{2A}) (6).

Estudos *in vitro* comprovam a importância do 5-HTT na acção farmacológica da MDMA, pois demonstram que a libertação de 5-HT é, pelo menos em parte, independente do cálcio, podendo ser inibida pela fluoxetina, que é um fármaco inibidor do 5-HTT (17, 27).

A acção da MDMA sobre a 5-HT cerebral passa por múltiplas fases: a primeira é uma grande libertação de 5-HT, situando-se o máximo 1 h após a administração. Após este período as reservas cerebrais de 5-HT esgotam-se e a libertação diminui, acabando por ser inferior à libertação basal depois das 3 h após administração (29).

Outra importante acção da MDMA é o seu efeito sobre duas enzimas essenciais para a síntese e metabolismo da 5-HT: a triptofano hidroxilase (TPH) e a monoamina oxidase (MAO).

A actividade da TPH, enzima limitante na biossíntese de 5-HT, é inibida pela MDMA. Vinte e quatro horas após a administração de MDMA, os principais parâmetros da transmissão serotoninérgica voltam aos valores normais, com excepção da TPH que pode ficar alterada por um período de 2 semanas, após uma única administração (30).

Tal como outros análogos anfetamínicos, a MDMA provoca a inibição da MAO, através de um mecanismo competitivo, o que contribui para o prolongamento da estimulação simpática. A MDMA inibe preferencialmente a isoforma da MAO do tipo A, a qual tem mais afinidade para a 5-HT, o que conduz à diminuição da capacidade de degradação enzimática desta amina (31).

3.3. MDMA e o sistema dopaminérgico

A maioria dos estudos clínicos e experimentais conduzidos sobre a farmacologia da MDMA, aborda principalmente a sua acção na função serotoninérgica. No entanto, existem evidências consideráveis acerca da acção da MDMA na libertação de DA em ratos. A MDMA aumenta a libertação de DA do tecido cerebral, como já foi demonstrado quer em estudos *in vivo* através de microdiálise cerebral, quer em estudos *in vitro* que recorrem ao uso de fatias de tecido cerebral.

Estudos *in vitro* demonstram que a administração de MDMA promove a libertação de DA do tecido cerebral, assim como previne a recaptação de DA dos sinaptossomas cerebrais (14, 16, 18). Crespi e colaboradores demonstraram ainda que a libertação de DA dos sinaptossomas cerebrais induzida pela MDMA é mediada por transportadores e é dependente do cálcio (18). Nos estudos em ratos realizados *in vivo* usando a técnica de microdiálise, foi também possível observar o aumento da libertação de DA após a administração de MDMA (23, 29, 32-34). No núcleo caudado o aumento da concentração extracelular de DA induzido pela MDMA é maior do que o aumento de 5-HT (29). A injeção sistémica de MDMA também aumenta a concentração extracelular de DA no núcleo accumbens (23). Um aumento rápido de DA foi também observado no estriado, juntamente com a diminuição dos seus metabolitos, ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (35).

Diferenças na metodologia, nomeadamente na via de administração, na temperatura ambiente e nas estirpes de ratos, podem justificar os resultados obtidos por diferentes investigadores sobre o papel dos transportadores da DA na libertação de DA

promovida pela MDMA. Num estudo ficou demonstrado que o inibidor do DAT, GBR 12909, previne a libertação de DA mediada pela MDMA numa fatia de tecido cerebral correspondente ao estriado (36). Estes resultados são consistentes com outro estudo, no qual se administrou MDMA directamente no estriado e se verificou que o GBR 12909 antagonizou a libertação de DA (37). Resultados similares foram obtidos quando a MDMA e outro inibidor do DAT, o mazindol, foram co-administrados sistemicamente (38). Por outro lado, usando a microdiálise *in vivo*, Mechan e colaboradores observaram que o GBR 12909 não inibia a libertação de DA no estriado após administração periférica de MDMA (39).

Ao contrário dos ratos, a libertação de DA em ratinhos após a administração de MDMA está já bem documentada. Três horas após a administração de 3 injeções de MDMA, a concentração no estriado de DA, HVA e DOPAC encontra-se reduzida (40). Estudos realizados com a microdiálise *in vivo* demonstram que existe um forte aumento de DA extracelular no estriado após a administração de MDMA (41).

3.4. Propriedades alucinogénicas da MDMA

A MDMA actua directamente como agonista dos receptores da 5-HT do tipo 2A (5-HT_{2A}), facto que é responsável pelas suas propriedades farmacológicas alucinogénicas (42). Actualmente é aceite que os alucinogénios exercem os seus efeitos através da activação deste tipo de receptores (43).

O termo alucinogénio foi originalmente usado para descrever as substâncias que produzem alucinações, apesar deste efeito não ocorrer na maioria das substâncias, pelo menos, quando usadas nas dosagens típicas. Hoje em dia, muitas substâncias farmacológicas quimicamente diversas são enquadradas nesta categoria tais como, canabinóides, antagonistas do N-metil-D-aspartato (NMDA), agentes anticolinérgicos, MDMA entre muitas outras (43). O aspecto comum a todas estas classes de substâncias farmacológicas é o facto de alterarem a consciência, muitas vezes de forma dramática e imprevisível e de, em doses elevadas, serem capazes de produzir delírio, alucinações verdadeiras, perda de contacto com a realidade e em muitos casos a morte (43). As substâncias consideradas alucinogénicas são as que apresentam uma psicofarmacologia similar à dos produtos naturais, mescalina e psilocibina e também à substância semi-sintética conhecida como dietilamida do ácido lisérgico (LSD) (43). A “ecstasy” é denominada muitas vezes como droga alucinogénica devido aos seus efeitos subjectivos, que incluem alteração na percepção do tempo e mudanças na percepção visual.

Foi já demonstrado que a MDMA, tal como outros compostos alucinogénicos, possui afinidade para o receptor 5-HT_{2A} localizado nos neurónios corticais de ratos e de humanos (42) com uma constante de inibição (K_i) $\approx$ 5 μ M (44). O papel agonista da MDMA neste receptor foi estabelecido devido à descoberta de que a MDMA induz a degradação do fosfatidilinositol em células que expressam os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (45).

3.5. Afinidade da MDMA para outros receptores

A capacidade da MDMA para se ligar directamente a outros receptores é relevante, do ponto de vista farmacológico em modelos animais, dado que após a administração deste composto são encontradas concentrações μ M no cérebro de ratos e de ratinhos (46, 47).

A afinidade da MDMA para os receptores de neurotransmissores pode ser dividida em 3 grupos, de acordo com os valores de K_i . A MDMA apresenta um valor de K_i entre 1 e 10 μ M para os receptores α_2 -adrenérgicos, histamínicos do tipo 1 (H_1) e muscarínicos do tipo 1 (M_1). Para os receptores muscarínicos do tipo 2 (M_2), α_1 -adrenérgicos, β -adrenérgicos e 5-HT₁ o valor de K_i situa-se entre os 10 e os 100 μ M. O valor de K_i é superior a 100 μ M para os receptores da DA do tipo 1 e 2, para os receptores opióides e para os receptores das benzodiazepinas (44).

4. FARMACOCINÉTICA

4.1. Absorção e distribuição

A MDMA é uma base fraca com um pKa de 9,9, baixo peso molecular, elevado volume de distribuição (4 L/Kg) e baixa ligação às proteínas plasmáticas (inferior a 20 %). Estas características permitem-lhe atravessar facilmente as membranas biológicas e difundir-se para tecidos ou matrizes biológicas com pH inferior ao do sangue (48).

A farmacocinética da MDMA estuda-se fundamentalmente em modelos animais através da administração oral e parenteral. Os estudos farmacocinéticos em humanos são escassos e normalmente são efectuados num pequeno número de voluntários. No primeiro estudo publicado avaliando a farmacocinética da MDMA em humanos, os autores estudaram o metabolismo e a distribuição num único voluntário saudável, a quem administraram uma dose oral de 50 mg, tendo sido determinados os níveis plasmáticos em vários intervalos de tempo após a ingestão. A concentração máxima (C_{máx}) detectada para a MDMA foi de 106 µg/L e após 24 h diminuiu para 5 µg/L (49).

De la Torre e colaboradores realizaram um estudo em 14 voluntários saudáveis e verificaram que os picos plasmáticos ocorrem entre 1,5 a 3 h após a ingestão oral de MDMA (50). Neste estudo, após a administração de cinco doses diferentes de MDMA (50, 75, 100, 125 e 150 mg), a C_{máx} e a área sob a curva (AUC) referentes a 24 h aumentam de acordo com a dose tomada, embora para a dose de 150 mg o aumento dos parâmetros cinéticos não seja proporcional à dose. Estes resultados constituem argumentos a favor de uma farmacocinética da MDMA não linear (50).

Farré e colaboradores avaliaram a farmacocinética da MDMA em voluntários, após a administração repetida da droga (100 mg, administrados duas vezes com um intervalo de 24 h) e verificaram que após a administração da segunda dose, a concentração plasmática aumenta de forma desproporcional quando comparada com a primeira dose (51). Este facto é explicado por uma possível saturação do metabolismo da MDMA. Estudos *in vitro* sugerem que a MDMA pode actuar como inibidora do complexo enzimático do citocromo P450 (CYP), nomeadamente da isoforma 2D6 (CYP2D6), por mecanismos que incluem interacção competitiva e/ou formação de um complexo metabolito-enzima (52-55).

Foi descrita uma distribuição estereosselectiva da MDMA nos humanos. A MDMA, tal como outras anfetaminas, possui um centro quiral com dois enantiómeros que apresentam diferente actividade farmacológica, um metabolismo estereosselectivo e uma diferente distribuição corporal. As pastilhas de “ecstasy” apresentam, normalmente, a mistura racémica de MDMA (56). Após a administração oral de 40 mg de uma mistura

racémica de MDMA, a $C_{\text{máx}}$ para o enantiómero R-(-)-MDMA é bastante superior à do enantiómero S-(+)-MDMA. A razão enantiométrica (R/S) da AUC referente a 24 h indica uma eliminação mais rápida do enantiómero farmacologicamente mais activo, S-(+)-MDMA (48). Um estudo realizado por Fallon e colaboradores indica que o enantiómero mais activo, S-(+)-MDMA, tem uma distribuição mais extensa, o que suporta a hipótese da estereosseletividade da farmacocinética da MDMA em humanos (57).

As anfetaminas possuem em geral baixa ligação às proteínas plasmáticas (<20 %). Na prática esta baixa ligação significa que quase toda a droga se encontra livre no plasma e disponível para se difundir para o compartimento extravascular, distribuindo-se por todos os tecidos e passando facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) (48). São ainda bastante limitados os estudos sobre a distribuição da MDMA nos tecidos humanos após administração em ambiente laboratorial controlado. Segundo um estudo de de la Torre e colaboradores, foi estabelecido um volume de distribuição de 452 ± 137 L ($6,4$ L/Kg) após a administração oral de 100 mg de MDMA (50).

4.2. Metabolismo

A MDMA, tanto nos humanos como nos animais de laboratório, é metabolizada principalmente no fígado. A principal via metabólica em humanos inclui a O-desmetilação com formação do catecol 3,4-dihidroxi metanfetamina (HHMA, N-metil- α -metildopamina, N-Me- α -MeDA), sendo esta etapa catalisada principalmente pela isoenzima CYP2D6. O passo seguinte é a O-metilação a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA, 3-O-Me-N-Me- α -MeDA), reacção regulada pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). Em menor percentagem a MDMA é N-desmetilada a MDA reacção principalmente catalisada pela CYP2B6, a qual é depois metabolizada ao derivado catecólico intermediário 3,4-dihidroxi anfetamina (HHA, α -metildopamina, α -MeDA) e, finalmente, O-metilada a 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA, 3-O-Me- α -MeDA) (58-60). Os quatro metabolitos, N-Me- α -MeDA, α -MeDA, HMMA e HMA podem sofrer conjugação com sulfatos ou ácido glucurónico, sendo estes encontrados, principalmente no plasma e na urina (9).

Alternativamente, estudos em ratos sugerem que a N-Me- α -MeDA e a α -MeDA podem ser oxidadas às correspondentes orto-quinonas, as quais podem formar aductos com a glutathione (GSH) e com outros compostos que contenham o grupo tiol (61). Estes conjugados com a GSH permanecem redox activos e podem por isso formar um conjugado 2,5-bis-glutationil, devido à adição de uma segunda molécula de GSH (61). A formação sistémica dos conjugados com a GSH da α -MeDA e da N-Me- α -MeDA no

fígado é seguida da sua distribuição para outros órgãos, nomeadamente para o cérebro (62). Os conjugados com a GSH podem ser metabolizados via ácidos mercaptúricos pela γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) e dipeptidase aos correspondentes conjugados com a cisteína e, finalmente, pela N-acetiltransferase a conjugados com a N-acetilcisteína (NAC) (62). As principais vias metabólicas da MDMA podem ser observadas na figura 4.

A etapa da O-desmetilenação nos humanos é catalisada principalmente pela isoenzima hepática CYP2D6 (possui elevada afinidade para concentrações baixas de substrato). Outras isoenzimas envolvidas nesta reacção são a CYP1A2 (possui elevada afinidade para concentrações elevadas de substrato) e em menor extensão a CYP2B6 e a CYP3A4 (63). Alguns fármacos inibidores da recaptação de 5-HT, como a paroxetina e a fluoxetina, são inibidores potentes da CYP2D6. Uma vez que esta isoenzima do citocromo P450 regula o primeiro passo do metabolismo da MDMA em humanos, é de esperar a acumulação de MDMA no organismo devido às interacções farmacocinéticas entre estes fármacos e a MDMA. Para testar a existência destas interacções foi realizado um estudo em humanos, aos quais se administrou paroxetina nos 3 dias anteriores à administração de MDMA (64). A administração de paroxetina aumentou aproximadamente 30 % a concentração plasmática de MDMA enquanto a concentração plasmática do seu metabolito HMMA diminuiu aproximadamente 40 %. Considerando que a redução na concentração de HMMA é maior do que o aumento na concentração de MDMA é possível supor que a CYP2D6 contribui para o metabolismo menos do que os 60% que se supõem, com base nos estudos *in vitro* (64).

Comparando o metabolismo da MDMA em humanos e animais de experiência, observa-se que as principais reacções metabólicas são qualitativamente similares. No entanto, a velocidade e a importância destas vias metabólicas apresentam diferenças quantitativas (65). Por exemplo, enquanto nos ratos a N-desmetilação da MDMA, que leva à formação da MDA, é a via metabólica mais importante para baixas doses (46), nos humanos a O-desmetilenação com formação de N-Me- α -MeDA é a via predominante para qualquer dose administrada (50). Estudos em ratos demonstraram um metabolismo estereosselectivo na N-desmetilação da MDMA a MDA, sendo o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) de eliminação do enantiómero (R)-MDMA menor do que o do enantiómero (S)-MDMA. Pelo contrário para a MDA o $t_{1/2}$ de eliminação do enantiómero (S)-MDA é menor quando comparado com o enantiómero (R)-MDA (66). Estes dados não são consistentes com os estudos de estereosselectividade da MDMA em humanos. Isto deve-se ao facto da estereosselectividade em ratos estar associada à N-desmetilação, contribuindo esta via metabólica para apenas para 8 a 9 % da concentração de MDMA em humanos. O passo estereosselectivo nos humanos é a O-desmetilenação, regulada principalmente pela CYP2D6 (50).

O metabolismo estereosselectivo é a explicação mais provável para a farmacocinética estereosselectiva da MDMA. Os dados obtidos de estudos de inibição (58, 63) e de experiências com CYP2D6 recombinante (63, 67) indicam que a CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2 e CYP2B6 estão envolvidas na O-desmetilação e na N-desmetilação da MDMA. No entanto, o conhecimento relativo ao metabolismo estereosselectivo da MDMA é ainda escasso. Os estudos realizados focam apenas a etapa da desmetilação da MDMA pela CYP2D6 recombinante, indicando a maior afinidade desta isoforma da enzima pelo enantiómero (S)-MDMA (67). Meyer e colaboradores, realizaram um estudo que tinha como objectivo determinar a cinética estereosselectiva de diversas isoformas da CYP450 de humanos, na N-desmetilação e na O-desmetilação da MDMA (68). Neste estudo demonstrou-se pela primeira vez que a CYP2C19 também está envolvida no metabolismo estereosselectivo da MDMA. Esta enzima demonstrou ser a mais estereosselectiva em ambas as reacções metabólicas, com uma preferência pelo enantiómero (S)-MDMA. A CYP2D6 também demonstrou uma elevada estereosselectividade ao contrário do que se passou com as outras isoformas (68). Se cruzarmos estes factos com o facto da O-desmetilação em humanos ser a principal via no metabolismo da MDMA, pode concluir-se que as diferentes propriedades farmacocinéticas dos enantiómeros da MDMA são atribuídas principalmente à O-desmetilação estereosselectiva realizada pela CYP2C19 e pela CYP2D6 (68). Neste contexto a CYP2D6 deve ser a mais importante uma vez que contribui para 33% da metabolização da MDMA, mesmo com as condições máximas de substrato, enquanto a CYP2C19 contribui com um máximo de 17 % (68).

A actividade da CYP2D6 apresenta uma grande variabilidade interindividual, a qual é devida ao polimorfismo genético que influencia a expressão e funcionamento da enzima (55, 69). A CYP2D6 representa uma pequena percentagem do total de isoenzimas hepáticas do citocromo P450, mas é a responsável pelo metabolismo de aproximadamente 20 a 30 % dos fármacos (70). Esta enzima exhibe um acentuado polimorfismo genético, sendo os indivíduos classificados de acordo com o seu fenótipo em metabolizadores pobres (PM), metabolizadores extensivos (EM) e metabolizadores ultra-rápidos (UM) (69). Foram descritos mais de 70 alelos cuja combinação resulta nos diferentes fenótipos. A total deleção do gene, ou mutações, que resultem numa proteína funcionalmente inactiva é designada por alelos nulos e os indivíduos homozigóticos que possuem estes alelos expressam um fenótipo de PM. Este fenótipo corresponde a 7-10 % da população caucasiana Europeia (71).

O polimorfismo genético da CYP2D6 pode contribuir para a variabilidade interindividual nas manifestações de toxicidade da MDMA. Seria de esperar que os indivíduos com a actividade da enzima diminuída fossem mais susceptíveis aos efeitos

agudos da MDMA mas, por outro lado, seriam menos vulneráveis aos seus efeitos por administração repetida (efeitos neurotóxicos), dado que a produção de metabolitos tóxicos estaria diminuída. No entanto, o facto da MDMA inibir a isoenzima CYP2D6, aliado à existência de outras isoenzimas do citocromo P450 capazes de metabolizar a MDMA, pode explicar a pouca relevância do polimorfismo genético da CYP2D6 no contexto da expressão da toxicidade da MDMA (56).

As diferenças entre os géneros na metabolização da MDMA, podem envolver inúmeras vias hormonais ou factores relacionados com o peso e tamanho corporal, podendo qualquer um destes factores modificar a biodisponibilidade da MDMA. Além disso, não podem ser excluídas diferenças na distribuição da MDMA. No entanto, o metabolismo parece ser a chave da toxicidade da MDMA. Os estudos em ratos demonstram que existem diferenças no metabolismo da MDMA relacionadas com o género e com a estirpe, as quais são atribuídas ao polimorfismo das isoenzimas do citocromo P450.

Em muitas estirpes de ratos a CYP2D1 é equivalente à CYP2D6 humana, estando esta isoenzima ausente nas fêmeas Dark Agouti (72). Este facto ajuda a explicar a maior concentração cerebral de MDMA observada nesta estirpe, a qual representa um modelo animal para CYP2D PM. Malpass e colaboradores demonstraram que a MDMA é mais letal para as fêmeas Dark Agouti, as quais não possuem CYP2D1, do que para as fêmeas Sprague-Dawley (73). Num estudo realizado com ratos Sprague-Dawley, observou-se que os machos são mais sensíveis à toxicidade aguda do que as fêmeas. A explicação para esta ocorrência pode estar na maior actividade da CYP1A2 nos machos, o que conduz a um maior metabolismo via N-desmetilação da MDMA com o consequente aumento da MDA no plasma (74).

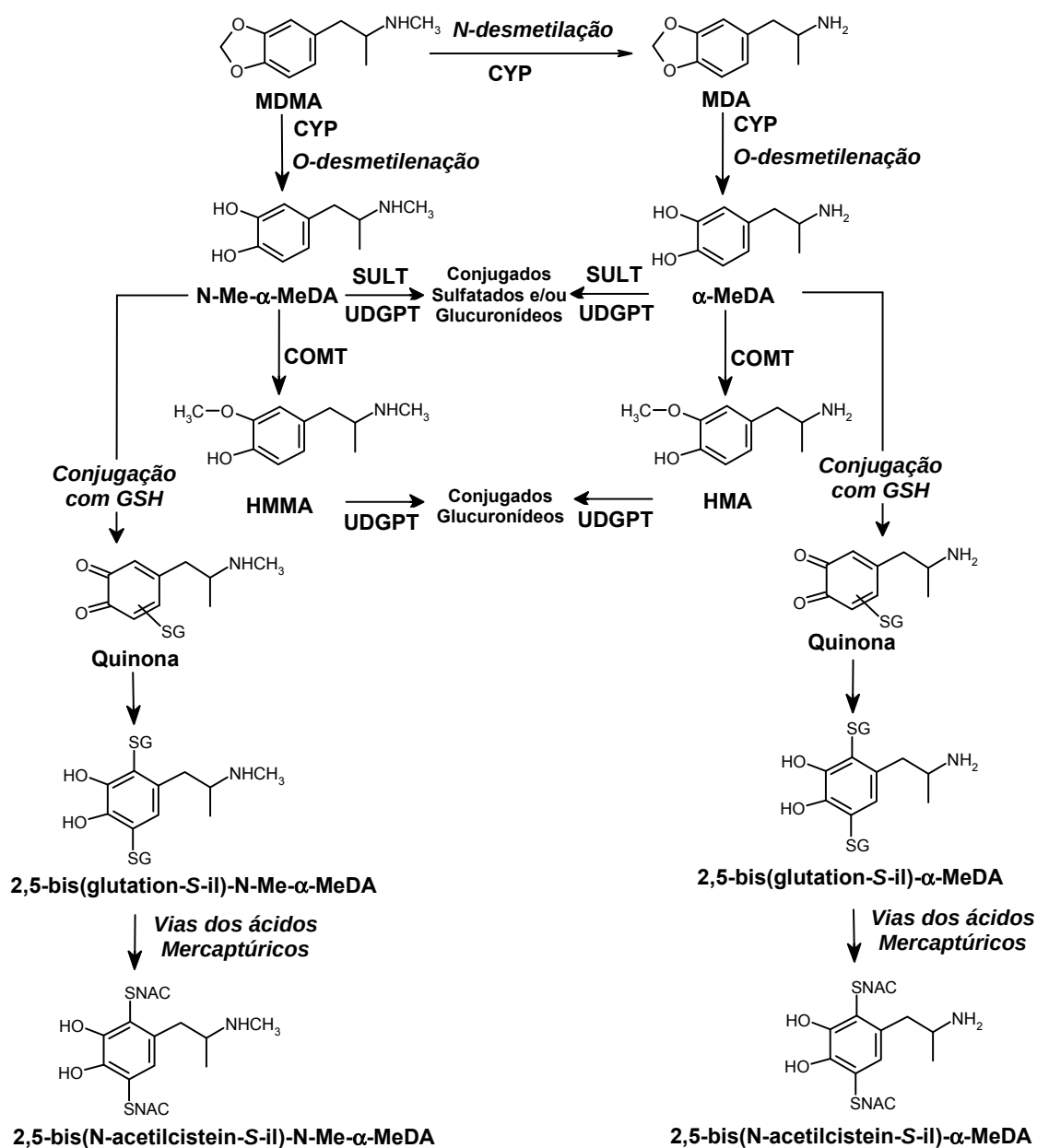


Figura 4. Principais vias do metabolismo e metabolitos da MDMA

4.3. Excreção

O $t_{1/2}$ das anfetaminas e das substâncias relacionadas é, normalmente, dependente do pH urinário, uma vez que a excreção renal é a principal via de eliminação. Como estes compostos são bases fracas, a excreção renal aumenta com a acidificação da urina e diminui com a alcalinização, o que conduz a uma variação significativa no $t_{1/2}$ destas substâncias. Por este motivo, alguns consumidores de anfetaminas recorrem à toma de bicarbonato com o objectivo de prolongar os efeitos da droga (48).

Os derivados anfetamínicos que possuem o substituinte metilenodioxí no anel aromático sofrem metabolização extensa, pelo que a quantidade excretada na urina sem biotransformação é relativamente pequena. Cerca de 80% da MDMA consumida é metabolizada no fígado e 20% é excretada inalterada pela urina. A velocidade de excreção urinária da MDMA após a administração de diferentes doses é constante. Pelo contrário a clearance não renal é dependente da dose (48).

A excreção da MDMA pode ocorrer por vias alternativas, nomeadamente através da saliva e do suor. Estas vias alternativas de excreção apresentam algum interesse, uma vez que constituem possibilidades não invasivas para a detecção do consumo de MDMA (48).

Os estudos farmacocinéticos em humanos demonstram que a excreção da MDMA também é estereosselectiva, sendo o isómero (S)-MDMA excretado mais rapidamente do que o isómero (R)-MDMA (56).

5. EFEITOS AGUDOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Os efeitos agudos da MDMA no SNC são mediados pela libertação de neurotransmissores monoaminérgicos com a consequente activação dos receptores pré- e pós-sinápticos (1). Estes efeitos em animais de laboratório incluem hipertermia, hiperactividade e síndrome serotoninérgica, a qual se manifesta por alterações do estado mental, motor e autonómico.

Foi já demonstrado em diversos estudos que a administração de MDMA provoca uma resposta hipertérmica dependente da dose em animais de laboratório, nomeadamente no ratinho, rato, coelho, porquinho-da-índia, porco e primatas não humanos (1). A hipertermia aguda produzida pela MDMA em animais de laboratório é um dos poucos efeitos que pode ser directamente comparado com a hipertermia nos humanos.

A hipertermia induzida pela MDMA é um processo fisiológico bastante complexo. Apesar da extrema importância, os mecanismos biológicos envolvidos na produção de calor e na progressão para hipertermia após exposição à MDMA, ainda não estão totalmente esclarecidos. Além disso, ainda não estão totalmente compreendidas as ligações entre a hipertermia e algumas das alterações patológicas induzidas pela MDMA. Experiências em animais de laboratório confirmam que a temperatura ambiente pode influenciar o efeito da MDMA e de outras anfetaminas na temperatura corporal (1).

Vários estudos demonstram que em condições de temperatura ambiente controlada (20-22 °C), a administração de MDMA a ratos provoca uma resposta hipertérmica de aproximadamente +1-2 °C, com o pico a ocorrer 40 a 60 minutos após a injeção (75-80).

Foi realizado um estudo em que se demonstrou que a temperatura ambiente influencia o efeito da MDMA em ratos. A administração de 20 ou 40 mg/Kg de MDMA a ratos expostos a uma temperatura ambiental inferior a 22 °C provoca uma resposta hipotérmica. No entanto, se a temperatura ambiente for superior a 28 °C observa-se uma resposta hipertérmica (81). Também a administração de 20 mg/Kg de MDMA a ratinhos a uma temperatura ambiente de 22 °C provoca uma resposta hipertérmica, enquanto a administração de MDMA a uma temperatura ambiente de 15 °C provoca uma resposta hipotérmica (82).

Gordon e colaboradores realizaram um estudo para determinar os efeitos da MDMA nos mecanismos de termorregulação em ratos e observaram que a administração de MDMA afecta o sistema termorregulador, aumentando a velocidade metabólica, a perda de água por evaporação e a temperatura rectal, sendo estes efeitos aparentemente dependentes da temperatura ambiente (83).

A capacidade da MDMA para aumentar a temperatura corporal em ratos tem sido atribuída à 5-HT. Contudo, estudos mais recentes têm demonstrado que a hipertermia induzida pela MDMA envolve também a activação do receptor pós-sináptico da DA do tipo 1 (D_1) pela DA (39).

Além do envolvimento da DA é também necessária a activação do sistema nervoso simpático para desencadear a resposta hipertérmica. Num estudo realizado em ratos, o pré-tratamento com dois antagonistas dos receptores adrenérgicos α_1 e β_3 resultou no desaparecimento da resposta hipertérmica (84). No mesmo estudo, a administração de MDMA a ratos sem hipotálamo ou sem tiróide resultou na abolição da resposta hipertérmica, ocorrendo até hipotermia. A hipertermia foi associada à tiroxina (hormona T4), uma vez que nos animais tireoidectomizados a administração de tiroxina reactivou a hipertermia induzida pela MDMA. Sprague e colaboradores propuseram então um mecanismo no qual o sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-pituitária-tiróide são activados pela MDMA e os receptores α e β juntamente com a hormona tiroxina desencadeiam hipertermia pela activação das proteínas de desacoplamento (84). De facto, ratinhos sem a proteína de desacoplamento 3 (UCP-3) não produzem resposta hipertérmica após a administração de MDMA, sendo resistentes aos efeitos letais da hipertermia (85).

Uma vez que a administração de MDMA em ratos resulta numa maior libertação de 5-HT em várias regiões do cérebro, esta vai também produzir uma resposta aguda hiperlocomotora, a qual é dependente da dose, juntamente com o aparecimento das manifestações clínicas comportamentais da síndrome serotoninérgica (23, 86-88). A síndrome serotoninérgica corresponde a um conjunto de sintomas agudos que resultam do excesso de 5-HT na fenda sináptica. Os sintomas descritos incluem hiperactividade comportamental, confusão mental, agitação, hiperreflexia, hiperpirexia, taquicardia, clonus, mioclonus, oscilações oculares e tremuras (89).

Callaway e colaboradores demonstraram que a MDMA produz um aumento da actividade locomotora, dependente da dose. Este efeito desaparece quando é feito um pré-tratamento com fluoxetina, o que indica que a libertação de 5-HT tem um papel importante nos efeitos comportamentais da MDMA (90).

Em ratos, a MDMA provoca também efeitos neuroendócrinos que incluem a secreção de prolactina da pituitária anterior e de corticosterona da glândula supra-adrenal (75). Enquanto que a secreção de corticosterona induzida pela MDMA pode ser bloqueada pelo antagonista do receptor 5-HT_{2A}, ketanserina, nenhum dos antagonistas 5-HT₂ bloqueia a secreção de prolactina induzida pela MDMA, o que indica que, provavelmente, a secreção de prolactina seja mediada via estimulação do receptor 5-HT₁ (75).

Estudos em ratos demonstram que a MDMA provoca alguns efeitos na função cardiovascular que incluem taquicardia e arritmia (83) e aumento da vasoconstrição (91). A MDMA promove um aumento, dependente da dose, da pressão arterial devido à estimulação cardíaca que provoca, dando origem ao aparecimento de taquicardia e arritmia (92).

6. EFEITOS AGUDOS EM HUMANOS

A “ecstasy” tornou-se famosa como droga consumida para fins recreacionais, principalmente em ambientes de dança, devido às suas propriedades que podem ser traduzidas na expressão dos “3 Es”: energia, empatia e euforia (93).

Os principais efeitos observados resultam da acção da MDMA ao nível do SNC e incluem aumento do estado de vigília e alerta, euforia, sensação de bem-estar, aumento da capacidade de introspecção, sentimentos de confiança e empatia para com os outros, hiperactividade motora, anorexia, perda de apetite e diminuição da capacidade visual e auditiva (94-96).

Os efeitos periféricos da MDMA resultam da sua acção simpaticomimética indirecta sobre os receptores adrenérgicos (essencialmente do tipo α e β) e serotoninérgicos. Estes efeitos traduzem-se num aumento da energia e da actividade física, aumento da pressão sanguínea, taquicardia, palpitações, hipertermia, dilatação das pupilas (midríase), secura na boca, bruxismo, tremor, broncodilatação, náusea, suor e hiperreflexia (94-96).

Os níveis plasmáticos de MDMA foram estudados em indivíduos numa festa “rave” e foram medidos parâmetros fisiológicos tais como pressão arterial, ritmo cardíaco e temperatura corporal. Observou-se que nos indivíduos com concentrações plasmáticas de MDMA superiores, estes parâmetros estavam moderadamente aumentados (97).

Num estudo realizado em humanos, foi utilizado o inibidor da recaptação de 5-HT, citalopram, para examinar o papel da 5-HT nas respostas fisiológicas agudas induzidas pela MDMA. Neste estudo verificou-se que o aumento da pressão arterial e do ritmo cardíaco era atenuado pelo citalopram, o que permite concluir que a libertação de 5-HT induzida pela MDMA tem um papel importante nestes efeitos fisiológicos (98). Um estudo similar foi realizado para verificar o efeito do antagonista do receptor D_2 , o haloperidol, nas respostas fisiológicas e psicológicas à MDMA. Os resultados indicam que o antagonismo do receptor D_2 não altera os efeitos fisiológicos periféricos (pressão arterial, ritmo cardíaco e temperatura corporal), o que revela que a DA não deve contribuir, pelo menos em grande medida, para os efeitos fisiológicos da MDMA (99). Em contrapartida, a administração de haloperidol diminui o estado de euforia e a sensação de bem-estar, o que reforça a teoria de que estes efeitos estão relacionados com a acção da MDMA na neurotransmissão dopaminérgica (99).

A hipertermia representa um aspecto clínico importante nos consumidores de MDMA em ambientes recreativos, uma vez que a temperatura corporal pode atingir os 43 °C (97, 100). O uso de MDMA em locais com muitos indivíduos, com uma temperatura ambiente elevada, a intensa actividade física e a desidratação podem contribuir para o

aumento da resposta hipertérmica. Os principais factores que contribuem para o efeito hipertérmico associado ao consumo de MDMA estão resumidos na tabela 1.

A hipertermia pode conduzir a outras patologias fatais incluindo rabdomiólise, coagulação intravascular disseminada e falha renal aguda (100, 101).

Tabela 1. Factores que contribuem para a hipertermia provocada pela MDMA

- Temperatura ambiente elevada
- Actividade física intensa (dança)
- Vasoconstrição periférica
- Desregulação dos mecanismos termorreguladores no SNC
- Desregulação dos sinais corporais de percepção
- Euforia
- Produção de calor

O consumo de MDMA nas doses recreacionais típicas conduz a alterações neuroendócrinas, nomeadamente aumento dos níveis da hormona adrenocorticoide, cortisol, prolactina, oxitocina, arginina e vasopressina, com um decréscimo nas concentrações de sódio (50, 102, 103).

Os principais efeitos adversos agudos da MDMA incluem náusea, vômitos, trismo (contração dos maxilares), bruxismo, hipertensão, palpitações, dores de cabeça, hiperreflexia, ataxia (falta de coordenação dos movimentos), urgência urinária, dores e tensão muscular, midríase, visão alterada e xerostomia (secura na boca) (104, 105).

Outros sintomas fisiológicos que foram reportados durante as primeiras horas após a ingestão de MDMA incluem taquicardia, coagulopatia, trombocitopenia, leucocitose, acidose, hipoglicemia, edema e hepatite (9).

Os efeitos psicológicos, que ocorrem no período de pico após a ingestão de MDMA, geralmente incluem euforia e redução dos pensamentos negativos. Os efeitos adversos que ocorrem após a ingestão aguda de MDMA incluem depressão, irritabilidade, ataques de pânico, alucinações visuais e paranóia (104-106). Segundo alguns consumidores de MDMA, as alucinações visuais e as ilusões paranóicas podem persistir por dias ou até mesmo semanas (105). As complicações neuropsiquiátricas que surgem após o abuso de MDMA são: desordens de pânico, psicoses, comportamento agressivo, transtorno perceptivo persistente (analepse), desordens depressivas e distúrbios cognitivos e de memória (94, 104, 106). Os principais efeitos adversos agudos induzidos pela MDMA estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2. Sintomas adversos agudos após consumo de MDMA

Sintomas do Sistema Nervoso Central	Sintomas do Sistema Nervoso Periférico
• Ataques de pânico • Alucinações • Insónia • Irritabilidade • Confusão	• Taquicardia • Hipertensão • Midríase • Secura na boca • Suores • Ataxia • Bruxismo • Trismo

Outros efeitos agudos graves compreendem arritmias e colapso cardiovascular, falência renal, rabdomiólise e falha de múltiplos órgãos, coagulação intravascular disseminada, hiponatremia, falha renal aguda, síndrome serotoninérgico e morte súbita. Podem também ocorrer efeitos neurológicos fatais após a ingestão de MDMA, como hemorragia subaracnóide, hemorragia intracraniana, enfarte cerebral e trombose venosa cerebral. Estas complicações podem surgir devido a uma hipertensão inicial ou devido ao processo de desidratação (93, 100, 104). Os principais efeitos agudos graves decorrentes da toxicidade da MDMA estão representados na tabela 3.

Tabela 3. Toxicidade aguda da MDMA

• Rabdomiólise • Coagulação intravascular disseminada • Toxicidade no sistema cardiovascular • Nefrotoxicidade • Hepatotoxicidade • Hiponatremia

7. EFEITOS A LONGO PRAZO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

7.1. Neurotoxicidade em animais de laboratório

O potencial neurotóxico da MDMA tem sido intensamente estudado nos últimos anos. Está documentado que a administração de uma ou de múltiplas doses de MDMA a animais de laboratório, induz a depleção a longo prazo de marcadores neuronais serotoninérgicos e dopaminérgicos.

A neurotoxicidade no rato é principalmente serotoninérgica e pode ser determinada avaliando os níveis de 5-HT e do seu metabolito maioritário, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), a actividade da TPH, enzima limitante na síntese de 5-HT e perda dos transportadores de 5-HT (107-110). Este défice serotoninérgico é observado em várias regiões do cérebro do rato nomeadamente no córtex frontal, estriado, hipocampo e hipotálamo.

Em ratinhos a administração de MDMA induz essencialmente neurotoxicidade dopaminérgica. A neurotoxicidade em ratinhos pode ser avaliada determinando os níveis de DA e dos seus metabolitos, a actividade da tirosina hidroxilase (TH), a perda dos transportadores de DA e o aumento da proteína acídica fibrilar glial, marcador de astrogliose (111-113).

7.1.1. Neurotoxicidade em ratos

Os estudos em ratos, de longe o animal de laboratório mais usado, demonstram que os efeitos neurotóxicos da MDMA nos neurónios serotoninérgicos são detectáveis 24 h a duas semanas após a administração de MDMA, sendo possível observar uma diminuição dos níveis de 5-HT e de 5-HIAA, bem como uma diminuição dos transportadores envolvidos na captação de 5-HT. A diminuição destes marcadores bioquímicos é mais acentuada no neocórtex, no estriado e no hipocampo. É também observada uma diminuição a longo prazo da actividade da TPH no neocórtex, hipotálamo, hipocampo e córtex (30, 114-116).

A depleção de 5-HT verificada após a administração de uma única dose de MDMA a ratos (10 mg/Kg) apresenta duas fases perfeitamente distinguíveis (109). Na primeira fase, entra as 3 e as 6 h, após a administração de MDMA, há uma depleção significativa dos níveis de 5-HT atingindo 16% do valor dos controlos. No entanto, entre as 6 e as 24 h, a concentração de 5-HT volta aos valores do controlo. A segunda fase de depleção surge uma semana após o tratamento com MDMA. Os valores de 5-HT vão gradualmente

descendo entre o primeiro e o sétimo dia, estando reduzidos a 74 % dos valores controlo, após uma semana. Alguns estudos demonstram uma redução dependente da dose de MDMA na concentração de 5-HT e 5-HIAA no córtex frontal, 18 h após doses múltiplas de MDMA (44, 116).

Têm sido realizados estudos com o objectivo de avaliar a recuperação dos marcadores neuroquímicos serotoninérgicos em ratos, após a administração de doses neurotóxicas de MDMA. Os resultados sugerem que, em algumas regiões cerebrais do rato, pode haver recuperação destes marcadores um ano após o tratamento com MDMA (44, 117-119).

Os vários marcadores bioquímicos indicam que ocorre neurodegeneração após a administração de MDMA mas, por si só, não servem como prova absoluta de neurotoxicidade. A avaliação do dano neurotóxico só pode ser feita tendo em conta também as análises histológicas e histoquímicas, havendo já vários estudos nesse sentido. Análises imunocitoquímicas da 5-HT em áreas corticais e subcorticais de ratos tratados com MDMA, revelam uma perda dos axónios e terminais serotoninérgicos, mantendo-se intactos os corpos celulares, especialmente nas projecções provenientes do núcleo dorsal de raphe (120). Para além disso, os axónios e terminais serotoninérgicos que permanecem após o tratamento com MDMA aparecem fragmentados, o que sugere a existência de dano estrutural.

Vários estudos demonstram que, quando a MDMA ou o seu metabolito MDA são injectadas directamente no cérebro de ratos, não se observa neurotoxicidade serotoninérgica (121, 122). Mesmo quando infundida no hipocampo uma dose de MDMA (10 e 15 mg/Kg), capaz de produzir uma concentração tecidular 4 vezes superior à observada após a administração sistémica de uma dose neurotóxica, não se observa neurodegeneração dos terminais serotoninérgicos. Apesar de não produzir neurotoxicidade, esta administração central provoca uma libertação aguda de 5-HT (122). Estes dados indicam que a molécula de MDMA provoca um aumento da libertação de 5-HT, enquanto que a neurotoxicidade é da responsabilidade dos metabolitos produzidos após administração sistémica.

A prevenção da resposta hipertérmica induzida pela MDMA traduz-se numa protecção contra a subsequente perda neurotóxica de 5-HT. Sabe-se agora que os compostos que foram inicialmente designados como neuroprotectores, exercem esta acção devido ao efeito que têm na temperatura corporal do animal e não por terem uma acção neuroquímica específica (9). Em geral, a administração de um fármaco que previna a hipertermia irá produzir neuroprotecção contra um agente neurotóxico (123). Se assumirmos que o aumento da formação de radicais livres é um elemento chave na neurotoxicidade induzida pela MDMA, então facilmente se compreende o papel da

temperatura corporal no processo neurodegenerativo. A formação de radicais livres no cérebro, após administração de MDMA, encontra-se aumentada em animais hipertérmicos (123). Estes dados são consistentes com os estudos de neurodegeneração induzidos pela isquemia, onde se descobriu que a formação de radicais livres é influenciada pela temperatura corporal (124, 125). Aparentemente o efeito protector da hipotermia pode ser ultrapassado se a dose de MDMA for muito elevada (78).

Os estudos de neuroprotecção em ratos revelam que existem compostos que protegem contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA por um mecanismo não relacionado com alterações na temperatura corporal. Os inibidores de recaptção da 5-HT, como a fluoxetina e a fluvoxamina, quando co-administrados com a MDMA, previnem totalmente a perda de 5-HT a longo prazo, sem alterar a hipertermia induzida pela MDMA (79, 126). A fluoxetina continua a fornecer total protecção mesmo quando administrada 4 dias antes da MDMA. Este efeito neuroprotector a longo prazo deve-se à contínua presença da fluoxetina e do seu principal metabolito activo, norfluoxetina, no cérebro. Ambos os compostos inibem o 5-HTT e podem, por isso, bloquear a entrada da MDMA ou do metabolito tóxico da MDMA no terminal nervoso serotoninérgico (126).

O dano neurotóxico induzido pela MDMA pode conduzir a défices funcionais a longo prazo. Dado que a 5-HT é um neurotransmissor envolvido nos mecanismos de termorregulação, é possível que neurotoxicidade induzida pela MDMA promova alterações nos mecanismos termorreguladores dos ratos. Os estudos demonstram que ratos previamente expostos a doses neurotóxicas de MDMA apresentam mecanismos de termorregulação deficientes quando expostos a temperaturas ambiente elevadas, podendo este facto ser uma consequência do défice serotoninérgico (127, 128).

A administração repetida de MDMA a ratos (superior a 24 dias) aumenta a intensidade de locomoção e a possibilidade de desenvolvimento da síndrome serotoninérgica comportamental (129). A MDMA produz uma alteração a longo prazo do comportamento cognitivo em ratos expostos durante 3 dias a um regime neurotóxico de MDMA (130). Enquanto que a administração aguda de MDMA a ratos promove um aumento na interacção social, a administração a longo prazo provoca um decréscimo na sociabilidade (131-133). Num estudo, após a administração repetida de MDMA (5 mg/kg) a ratos jovens, verificou-se a depleção de 5-HT e um comportamento do tipo ansioso no teste de interacção social, acompanhados por uma redução no receptor 5-HT_{2A} (134). Os estudos parecem concordar no desenvolvimento a longo prazo de patologias relacionadas com a ansiedade após exposição à MDMA.

Um facto que tem sobressaído dos estudos realizados em ratos é que diferentes estirpes têm diferente sensibilidade no que diz respeito à neurotoxicidade induzida pela MDMA. O exemplo mais óbvio é o da estirpe Dark Agouti que requer uma dose única (10-

15 mg/Kg) de MDMA para produzir uma perda cerebral de 5-HT de 30-50 % (72, 80) ao contrário dos ratos das estirpes Sprague-Dawley, Hooded Lister e Wistar, que necessitam de múltiplas doses (normalmente 20 mg/Kg ou mais) para uma perda similar (76, 88, 135).

Existem tantos estudos que evidenciam a degeneração dos terminais nervosos serotoninérgicos no cérebro de animais de experiência após administração de MDMA, que os efeitos a longo prazo nos neurónios dopaminérgicos raramente são avaliados. Isto deve-se essencialmente ao facto de a maioria dos estudos usar ratos nas suas experiências, sendo os neurónios dopaminérgicos desta espécie particularmente resistentes ao dano neurotóxico induzido pela MDMA. No entanto, já foi observada casualmente toxicidade dopaminérgica em ratos (136, 137). No trabalho de Commins e colaboradores foram administradas várias doses elevadas de MDMA (40 mg/Kg duas vezes por dias durante 4 dias) e no trabalho de Yuan e colaboradores os ratos foram mantidos a temperaturas ambiente elevadas. Em ambos os casos poderá ter ocorrido uma resposta hipertérmica exacerbada, a qual poderá ser a responsável pela modesta perda de DA no estriado.

Foi realizado um estudo em que se depletou a actividade antioxidante do cérebro de ratos alimentando-os com um dieta deficiente em selénio (138). No entanto, este procedimento não resultou em dano nos neurónios dopaminérgicos após a administração de MDMA. Observou-se neste estudo um marcado decréscimo da actividade da glutathione peroxidase, um dos principais sistemas antioxidantes contra a formação de radicais livres (138).

Os estudos realizados sobre os efeitos neurotóxicos da MDMA focam sobretudo o dano no sistema serotoninérgico e dopaminérgico, enquanto pouco se sabe acerca dos seus efeitos noutros sistemas neuronais. No entanto, alguns estudos têm demonstrado uma morte cerebral mais generalizada induzida por derivados anfetamínicos. Já foi demonstrado que a MDMA produz degeneração neuronal em diferentes áreas do cérebro do rato, tais como o córtex e o tálamo ventromedial/ventrolateral (108, 139-143). Num estudo em que se analisava a localização no cérebro do rato da degeneração neuronal induzida pela MDMA (20 mg/Kg e 40 mg/Kg), observou-se que a extensão da degeneração neuronal estava relacionada com o grau de hipertermia atingido (140). Num outro estudo ficou demonstrado que a administração de MDMA afecta significativamente o processo de neurogénese no hipotálamo (144). Estudos recentes realizados *in vitro*, usando culturas neuronais provenientes do córtex de rato (145, 146) e células neuronais da retina de rato (147) demonstram a toxicidade da MDMA noutros tipos de células. Nestes estudos prova-se que a morte celular observada nas células corticais e da retina envolvem a activação do receptor pós-sináptico 5-HT_{2A}.

Estes resultados tornam evidente que a neurotoxicidade induzida pelas anfetaminas não se limita aos neurónios serotoninérgicos e dopaminérgicos, ocorrendo degeneração de outros neurónios localizados em outras áreas cerebrais como o córtex, o estriado e o hipotálamo dos modelos animais (148, 149).

7.1.2. Neurotoxicidade em ratinhos

O facto da MDMA apresentar um perfil neurotóxico diferente em ratinhos já se encontra bem estabelecido. Nestes animais de laboratório, a MDMA produz um dano neurotóxico mais selectivo nos terminais dopaminérgicos, o qual se reflecte na diminuição da concentração de DA e dos seus principais metabolitos, assim como na diminuição do DAT e da TH (1). De facto, os efeitos a longo prazo da MDMA encontrados na maioria dos estudos com ratinhos contrastam profundamente com os resultados observados em ratos. Em ratinhos o conteúdo cerebral de 5-HT permanece inalterado, enquanto a concentração de DA no estriado é substancialmente reduzida (40, 150-152).

Existem poucos estudos realizados em ratinhos com vista à determinação dos efeitos agudos e a longo prazo da MDMA, ao contrário do que acontece em ratos. Consequentemente, pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos na acção neurotóxica da MDMA nos neurónios dopaminérgicos. Foi realizado um estudo em que se observou que ratinhos transgénicos com uma actividade de superóxido dismutase (SOD) elevada, são resistentes à acção neurotóxica da MDMA (153). Num outro estudo, observou-se que a administração de MDMA aos ratinhos promove uma diminuição da actividade da SOD, diminui a actividade da glutathione peroxidase e aumenta a peroxidação lipídica no cérebro (112). Estes dados sugerem que a produção de radicais livres desempenha, provavelmente, um papel na neurodegeneração induzida pela MDMA em ratinhos.

O'Shea e colaboradores realizaram um estudo onde demonstraram que a fluoxetina não inibe a neurotoxicidade dopaminérgica promovida pela MDMA em ratinhos. Pelo contrário, a administração do inibidor do DAT, GBR 12909, demonstrou ter um efeito neuroprotector. Este composto não inibe a libertação aguda de DA induzida pela administração repetida de MDMA (3 injeções de 30 mg/Kg a cada 3 horas), promovendo antes o seu aumento, o que sugere que a sua acção neuroprotectora não está relacionada com a inibição do DAT (40). No cérebro dos ratos foi sugerido que a MDMA actua como substrato do DAT (18). Se acontecesse o mesmo no cérebro dos ratinhos, seria expectável que o GBR 12909 inibisse a entrada de MDMA no terminal nervoso. Os dados do estudo de O'Shea e colaboradores não suportam esta hipótese, uma vez que a

co-administração de MDMA e GBR 1909 produz um aumento da libertação de DA (40). Por outro lado, a MDMA é uma molécula lipossolúvel e pode portanto, entrar no terminal nervoso por difusão passiva, como ocorre nos sinaptossomas (154). Estas observações permitiram aos autores sugerir que o efeito neuroprotector do GBR 12909 na neurotoxicidade induzida pela MDMA em ratinhos não é devido à sua capacidade de prevenir a entrada da MDMA nos neurónios, nem à inibição da libertação de DA para a fenda sináptica (40). O efeito neuroprotector do GBR 12909 foi confirmado num estudo subsequente. Neste estudo, usando a microdiálise *in vivo*, também se observou que o GBR 12909 aumenta a concentração extracelular de DA, após a administração de MDMA (3 injeções de 30 mg/Kg com intervalos de 3 h) (155). Este estudo demonstra que o GBR 12909 não previne a entrada da MDMA no terminal nervoso pré-sináptico, o que demonstra que a MDMA provavelmente penetra no terminal por difusão passiva (40). Por outro lado, o facto do bloqueio do DAT pelo GBR 12909 não resultar na diminuição da libertação da DA, sugere que a DA é libertada por um mecanismo não relacionado com o transportador. Camarero e colaboradores observaram que a libertação de DA induzida pela MDMA era fortemente reduzida com a diminuição da concentração de cálcio (155). Os dados destes estudos permitem concluir que a libertação de DA induzida pela administração de MDMA é resultado de um processo exocítico dependente de cálcio e não uma consequência do transporte de MDMA para o interior da célula via DAT (155). Camarero e colaboradores verificaram neste estudo através da microdiálise *in vivo*, que o GBR 12909 inibe o aumento da formação de radicais livres no estriado induzido pela MDMA. Com estes dados os autores sugerem que a formação de radicais livres no ratinho não está associada com a libertação de DA e que a toxicidade da MDMA pode ser devida a metabolitos tóxicos da MDMA. Estes metabolitos entram no terminal nervoso através do DAT e uma vez no interior da célula iniciam a produção de radicais livres (155).

Dependendo da dose e da estirpe de ratinho, a administração de MDMA pode promover neurotoxicidade dopaminérgica e serotoninérgica (156, 157). A administração de MDMA a ratinhos (duas doses de 50 mg/Kg, com intervalo de 2 h) provocou, uma semana depois, a depleção de 5-HT e DA em várias regiões cerebrais, nomeadamente no cerebelo, córtex frontal, hipocampo, hipotálamo, estriado e substância negra (156). Num outro estudo, a administração de MDMA (duas doses de 15 mg/Kg, com intervalo de 8 h durante 2 dias) a ratinhos Swiss-Webster causou uma marcada depleção no estriado de DA e do DAT, assim como depleção de 5-HT no estriado e no hipocampo e depleção do 5-HTT no córtex frontal. A depleção no estriado e no córtex frontal do DAT no ratinho foi observada 82 dias após a exposição à MDMA (157).

Os estudos realizados em animais de laboratório focam essencialmente o dano nos terminais nervosos. Foi realizado um estudo em ratinhos no qual se observou que a administração de MDMA (quatro doses de 5 mg/Kg com intervalo de 2 h) produz alterações no núcleo que consistem na oxidação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e em quebras de cadeias simples de DNA, acompanhadas de um aumento da proteína de choque térmico 70 (Hsp-70) no núcleo perto dos filamentos de cromatina (158). Neste estudo observou-se também no citoplasma e no núcleo, a ocorrência de corpos de inclusão de ubiquitina positivos. Estes dados sugerem que os processos de oxidação induzidos pela MDMA envolvem os corpos celulares dos neurónios, podendo estender-se ao núcleo. Estes dados foram observados *in vivo* na substância negra e no estriado de ratinhos e foram reproduzíveis *in vitro* na linha celular PC12 (158).

7.1.3. Neurotoxicidade em primatas

Em primatas não humanos, a depleção serotoninérgica e o dano neuronal foram também demonstrados, sendo estes efeitos mais pronunciados do que nos ratos (159-165). A administração de MDMA (2,5, 3,75 ou 5,0 mg/Kg) a macacos Squirrel (duas vezes por dia, durante quatro dias consecutivos) provoca uma redução, dependente da dose, de 5-HT no córtex, núcleo caudado, caudado putamen, hipocampo, hipotálamo e tálamo (160). Num outro estudo administrou-se 2,5 ou 10 mg/Kg, duas vezes por dia, durante quatro dias, a macacos Rhesus, tendo-se observado uma selectiva e significativa diminuição no fluído cerebrospinal (CSF) dos níveis de 5-HIAA e nas concentrações de 5-HT e 5-HIAA no cérebro. A dose mais elevada de MDMA (10 mg/Kg) também produziu uma selectiva diminuição nos locais de captação da 5-HT (164). Os efeitos a longo prazo da neurotoxicidade induzida pela MDMA, foram definitivamente comprovados num estudo em que macacos Squirrel apresentam uma redução da inervação serotoninérgica e dos níveis de 5-HT, 7 anos após a exposição à droga (Figura 4) (165). Macacos Squirrel, apresentam um crescimento substancial dos axónios serotoninérgicos e um diferente modelo de re-inervação 18 meses após o tratamento com MDMA (162). A reorganização das projecções serotoninérgicas em primatas, apesar de possível, segue um padrão anormal. A via de administração da MDMA também parece afectar o grau de depleção de 5-HT, sendo a administração por via oral menos tóxica do que a administração por via sub-cutânea. A administração de 5 mg/Kg, duas vezes por dia, durante 4 dias consecutivos, produz uma depleção de 5-HT no córtex frontal de 86 %, quando administrada por via sub-cutânea. Quando a administração é oral, a depleção de 5-HT é de apenas 42 % (166).

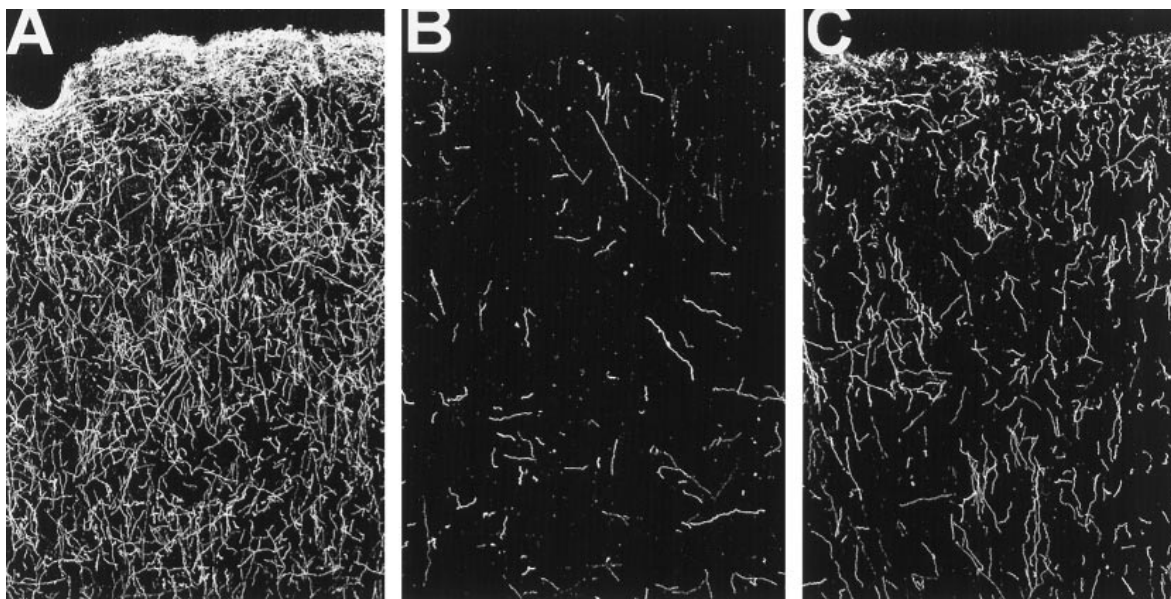


Figura 5. Neurónios serotoninérgicos do córtex cerebral de macacos Squirrel. Controlo (A), duas semanas após a administração de MDMA (5 mg/Kg, duas vezes por dia, durante 4 dias consecutivos) (B) e 7 anos após a administração de MDMA (C). É evidente a redução na densidade dos axónios duas semanas após a exposição à MDMA e que persiste 7 anos após essa exposição. Adaptado de Hatzidimitriou e col., 1999.

7.2. Neurotoxicidade em humanos

Como descrito anteriormente neste texto, os efeitos neurotóxicos da MDMA em modelos animais encontram-se bem documentados. No entanto, não é fácil extrapolar estes dados para prever o potencial neurotóxico nos consumidores de “ecstasy”. Os estudos em animais usam doses elevadas e vias de administração diversas daquelas dos humanos, assim como as diferenças na farmacocinética, são algumas das variáveis que podem conduzir a diferenças nos efeitos a longo prazo da MDMA nos animais e humanos. Apesar destas limitações, os resultados obtidos em modelos animais são de enorme importância para avaliar a acção neurotóxica da MDMA. A interpretação dos efeitos da MDMA em humanos é ainda dificultada pela variabilidade na frequência e na dose de MDMA consumida pelos utilizadores. Para além disso, factores como a idade e o sexo, podem também contribuir para uma diferente resposta às acções da MDMA.

Os métodos para avaliar a neurotoxicidade em humanos estão muitas vezes limitados à neuroimagem e, ocasionalmente, a estudos bioquímicos em voluntários ou ainda, a estudos histológicos após a ingestão fatal de MDMA (1). No entanto, a neurotoxicidade em humanos pode ser estudada usando métodos menos invasivos como a medida dos metabolitos monoaminérgicos no CSF, ou a medida das alterações nos neurónios e nas células gliais através da espectroscopia de ressonância magnética de prótons (167), ou ainda, avaliando a função neuroendócrina. O uso da expressão de

genes como biomarcador de neurotoxicidade é um campo em desenvolvimento que poderá ter algum interesse na determinação da neurotoxicidade provocada pela MDMA. Bowyer e colaboradores demonstraram uma alteração específica na expressão génica em regiões do córtex cerebral, onde ocorreu degeneração neuronal induzida por anfetaminas, a qual não pode ser atribuída a factores tais como convulsões ou hipertermia (168).

Num estudo realizado através da medida directa de 5-HT e do 5-HIAA na zona do nigroestriado cerebral (21h *post mortem*) de um consumidor de “ecstasy” com 26 anos de idade e nove anos de consumo, observou-se uma profunda depleção, entre 50 a 80 %, destes biomarcadores. No entanto, o indivíduo tinha também consumido cocaína e heroína nos meses que antecederam a sua morte. Uma vez que nenhuma destas duas drogas demonstrou, por si só, ser capaz de produzir uma alteração da concentração de 5-HT no nigroestriado, os investigadores concluíram que os resultados se deveram ao uso crónico de MDMA (169).

Os recentes avanços nas técnicas de imagiologia têm sido aplicados ao estudo do sistema serotoninérgico no cérebro de humanos consumidores de MDMA. A tomografia de emissão de positrões (PET) em combinação com um ligando do transportador de 5-HT, demonstrou uma menor densidade de locais de transporte de 5-HT, no cérebro de consumidores de MDMA, a qual está correlacionada com a exposição prévia à MDMA (170). A técnica PET foi também usada para revelar distúrbios no uso metabólico da glucose cerebral em consumidores de MDMA quando comparados com o grupo controlo, o que pode sugerir que a MDMA tem uma acção a longo prazo no metabolismo neuronal dos utilizadores (171). A tomografia computadorizada de emissão simples de fótons (SPECT) permitiu verificar uma diminuição do número de transportadores serotoninérgicos, recorrendo a um marcador específico do transportador em indivíduos consumidores de “ecstasy” (172-174). Um outro estudo avaliou os efeitos agudos e crónicos da MDMA nos receptores corticais 5-HT_{2A} no cérebro de ratos e humanos. Nos ratos observou-se uma diminuição, seguida de uma recuperação dependente da dose, na densidade dos receptores corticais 5-HT_{2A}. Em indivíduos com consumo recente de MDMA, a densidade dos receptores 5-HT_{2A} era significativamente mais baixa em todas as áreas corticais estudadas (175). Alguns autores têm criticado o uso de técnicas de imagiologia como método para demonstrar o dano neuronal em consumidores de MDMA (176). No entanto, os dados obtidos dos estudos em humanos, usando as técnicas de PET e SPECT, foram convenientemente validados para a medida da neurotoxicidade induzida pela MDMA, sendo instrumentos essenciais no estudo dos consumidores de MDMA (177). Os resultados destes estudos de neuroimagiologia, que utilizam diferentes metodologias e múltiplos ligandos, demonstram que os consumidores de MDMA

apresentam uma diminuição dos níveis do 5-HTT cerebrais. Para além disso, estes estudos revelam que existe uma associação entre o grau de exposição à MDMA e a percentagem de diminuição da ligação do ligando do 5-HTT, sendo também possível observar a recuperação do 5-HTT com o aumento da duração da abstinência ao uso de MDMA (178).

Foram medidos em consumidores de MDMA (indivíduos que ingeriram “ecstasy” em mais de 25 ocasiões) e num grupo controlo, as concentrações no CSF dos metabolitos de 5-HT, 5-HIAA, e de DA, HVA. Os consumidores de MDMA apresentavam níveis significativamente mais baixos de 5-HIAA no CSF do que o grupo controlo, sendo a redução maior no sexo feminino (46 %) do que no sexo masculino (20 %). Foi encontrada uma correlação aparentemente negativa, sem significado estatístico, entre os níveis de 5-HIAA no CSF e o número de exposições à MDMA. Não se verificou uma correlação entre os níveis de 5-HIAA no CSF e a duração e frequência de uso de MDMA. Não foi observada nenhuma diferença na concentração de HVA no CSF entre os dois grupos (179, 180). Num outro estudo, a correlação aparentemente negativa entre os níveis de 5-HIAA no CSF e o consumo de MDMA apresentou, no entanto, significado estatístico. Neste estudo, Bolla e colaboradores verificaram que a concentração de 5-HIAA no CSF em consumidores de MDMA era inferior à concentração no grupo controlo, e que os níveis de 5-HIAA no CSF diminuía com o aumento da dose de MDMA (181).

Os efeitos neuropsiquiátricos a longo prazo decorrentes do consumo recreativo de MDMA estão já bem documentados e sabe-se que permanecem muito tempo após a cessação do uso (104, 179, 181-183). É difícil para os investigadores considerarem que haja uma dose de MDMA que seja segura, uma vez que os comprimidos são sintetizados clandestinamente e, portanto, a dose e a pureza da MDMA são uma incerteza. Complicações adicionais advêm do facto de muitos consumidores de MDMA serem também consumidores de outras drogas, o que dificulta a tarefa de saber quais os efeitos que podem ser atribuídos à MDMA sozinha. Os comprimidos de MDMA contêm muitas vezes na sua composição outras drogas psicoactivas, que os consumidores ingerem sem saber (184). Nos consumidores de “ecstasy” onde se observa doença psiquiátrica é difícil determinar se o aparecimento destes problemas é o resultado do consumo de MDMA ou se a desordem psiquiátrica já existia e desenvolveu o seu curso normal. Vários estudos dos efeitos da MDMA em humanos revelam uma redução na memória e na aprendizagem, principalmente na memória de trabalho, na capacidade de planear, no controlo executivo e na impulsividade cognitiva (185-190). Ocasionalmente, as alucinações visuais e as ilusões paranóicas que se manifestam na fase aguda podem persistir durante dias ou semanas, juntamente com depressão, desordens de pânico, redução cognitiva e outras alterações no comportamento (104, 179, 181, 182, 191, 192).

O défice cognitivo provocado pela MDMA parece ser selectivo (193-195) e pode ser mais pronunciado nos consumidores habituais de MDMA (196, 197). Foi já demonstrado que a memória verbal e visual se encontra reduzida em consumidores de MDMA, o que está relacionada com a concentração de 5-HIAA, e indica que o dano serotoninérgico pode ser a causa dos défices cognitivos (181). Mais recentemente descobriu-se que os consumidores de MDMA apresentam défices nos aspectos executivos da memória de trabalho espacial e na performance da memória de trabalho verbal (198). Usando uma bateria de testes psicológicos computadorizados, os consumidores de MDMA em abstinência demonstraram défices em vários testes cognitivos particularmente na memória de trabalho. Estes défices estão relacionados com a quantidade e duração do uso de MDMA, porém não se observou uma redução de 5-HIAA no CSF (198).

O uso de MDMA em adolescentes pode estar associado a reduções cognitivas e disfunção dos circuitos inibitórios no hipocampo, o que indica que neste grupo etário as alterações comportamentais são semelhantes às que são observadas em adultos (199). Os estudos indicam que a disfunção primária na memória dos consumidores habituais de “ecstasy” pode estar relacionada com a particularidade do hipocampo ser altamente vulnerável aos efeitos neurotóxicos da MDMA (186).

Alguns estudos têm procurado examinar o papel do género do utilizador na neurotoxicidade ocorrida após o consumo de MDMA. Os consumidores do sexo feminino demonstram níveis mais elevados de depressão do que os consumidores masculinos, assim como em relação ao grupo controlo do sexo feminino, vários dias após a ingestão de uma dose de MDMA numa festa (200). Usando a técnica de SPECT, observa-se que a ligação de um radioligando com alta afinidade para o receptor de 5-HT é mais baixa nos consumidores habituais de MDMA do sexo feminino, do que nos do sexo masculino, assim como em relação ao grupo controlo. Este efeito não está associado a um maior consumo de MDMA, o que sugere que os consumidores do sexo feminino são provavelmente mais sensíveis aos efeitos neurotóxicos da MDMA (173). Os estudos bioquímicos suportam esta sugestão, já que se observa uma maior redução dos níveis de 5-HIAA no CSF de consumidores do sexo feminino. Outro estudo verificou uma redução dos níveis de 5-HIAA no sexo feminino de 46 % enquanto no sexo masculino a redução foi de 20 %, comparativamente aos valores controlo (179). Estas diferenças podem ser atribuídas a uma possível diferença no sistema serotoninérgico ou a diferenças de género no perfil metabólico da MDMA.

Está já demonstrado que a DA se encontra envolvida nos efeitos eufóricos observados em humanos após o consumo de psicoestimulantes como a anfetamina, a cocaína e o metilfenidato, mas também após a ingestão de MDMA (35). Como já foi referido anteriormente, os resultados do estudo de Liechti e Vollenweider indicam que a

DA apresenta um papel nos efeitos psicológicos em humanos, após a administração de MDMA (99). A ingestão de “ecstasy”, além do efeito na libertação aguda de DA no cérebro, parece também conduzir a alterações a longo prazo nas vias dopaminérgicas observadas após o consumo. Foi demonstrado num estudo, que 3 semanas após a descontinuação do consumo de “ecstasy” a resposta da hormona do crescimento à bromocriptina (agonista dos receptores D_2) estava significativamente reduzida nos consumidores de “ecstasy” em comparação com os indivíduos controlo (201). Os autores sugerem que estes resultados indicam a existência de uma disfunção das vias dopaminérgicas que estão envolvidas na regulação da libertação da hormona do crescimento. No entanto, esta disfunção não pode ser directamente encarada como uma evidência absoluta de neurotoxicidade dopaminérgica, pelo que mais estudos são necessários para clarificar este dano dopaminérgico.

Foi realizado um estudo em humanos que pretendia determinar se os consumidores de MDMA com consumo recorrente, em intervalos de tempo curtos (duas ou mais doses num período de 3 a 12 h), o qual produz concentrações plasmáticas elevadas de MDMA, desenvolviam défices no DAT, em adição aos défices no 5-HTT. O critério de inclusão neste estudo para todos os indivíduos era a abstinência do consumo de drogas nas duas semanas anteriores. Foi utilizada a técnica PET em combinação com radioligandos do DAT e do 5-HTT. Os consumidores de MDMA apresentam uma redução na ligação do ligando específico ao 5-HTT em múltiplas regiões cerebrais, mas não se observam reduções no estriado na ligação ao DAT (202).

Apesar dos estudos com consumidores exclusivos de “ecstasy” não demonstrarem a existência de um decréscimo da densidade do DAT no estriado, o uso combinado de anfetamina e MDMA pode estar associado à redução da densidade do transportador no estriado, ou seja, esta combinação pode ser neurotóxica para os neurónios dopaminérgicos (203). Estes dados podem ter um significado clínico relevante, uma vez que os consumidores de “ecstasy” são muitas vezes utilizadores de vários tipos de drogas.

Embora os estudos acerca da toxicidade da MDMA no desenvolvimento fetal sejam escassos, a literatura clínica sugere que a exposição pré-natal à MDMA é tóxica para o desenvolvimento do feto humano. Demonstrou-se que os fetos expostos à “ecstasy” devido ao consumo materno, apresentam um significativo aumento do risco de defeitos congénitos, incluindo problemas cardiovasculares e músculo-esqueléticos (204, 205).

8. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE

Apesar da evidência clínica comprovar a existência de neurotoxicidade induzida pela MDMA, os mecanismos envolvidos na sua produção não estão totalmente esclarecidos. Em seguida, serão referidas algumas das teorias que têm sido propostas pelos diversos autores para explicar os efeitos neurotóxicos da MDMA.

8.1. Bioactivação metabólica da MDMA

Os metabolitos da MDMA têm sido propostos como os agentes causadores de neurotoxicidade. De facto, vários estudos falharam na tentativa de demonstrar neurotoxicidade serotoninérgica quando a MDMA ou a MDA são injectadas directamente no cérebro de ratos (121, 122). Uma vez que a injeção directa de MDMA no cérebro do rato não é capaz de reproduzir a neurotoxicidade serotoninérgica observada após a administração periférica, foi sugerido que é necessária a existência do metabolismo sistémico para a ocorrência de neurotoxicidade (65, 206). Da mesma forma, os principais metabolitos da MDMA, N-Me- α -MeDA e α -MeDA, quando administrados directamente no cérebro, não induzem toxicidade a longo prazo nos neurónios, apresentando no entanto, neurotoxicidade após administração periférica. A α -MeDA não é neurotóxica após a injeção directa no cérebro de ratos (207) e a N-Me- α -MeDA não provoca depleção a longo prazo de DA ou 5-HT, após injeção no estriado de ratinhos (208). Por outro lado, a administração sub-cutânea dos metabolitos da MDA, α -MeDA e HMA, provoca uma diminuição da concentração de 5-HT no córtex frontal do rato (209). Também a administração intraperitoneal de N-Me- α -MeDA no ratinho provoca a depleção dos níveis de monoaminas, DA e 5-HT (208).

Como já foi referido neste texto, a N-Me- α -MeDA e a α -MeDA são catecóis que podem ser oxidados às correspondentes *orto*-quinonas. Estas quinonas podem entrar no ciclo redox e originar radicais semi-quinónicos, levando à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de espécies reactivas de azoto (RNS) (210). As *orto*-quinonas podem formar aductos com a GSH e com outros compostos contendo o grupo tiol, podendo em seguida estes conjugados ligar-se a uma nova molécula de GSH (61). Após a formação sistémica dos conjugados de N-Me- α -MeDA e α -MeDA com a GSH, estes são transportados e posteriormente metabolizados no cérebro, o que é demonstrado pelo facto de os conjugados com a GSH e com a NAC estarem presentes no estriado de ratos após administração sub-cutânea de MDMA (62). Os tioéteres são compostos hidrofílicos com pouca capacidade para atravessar a BHE. Foi proposto um mecanismo que permite

a passagem do conjugado catecol-GSH através da BHE, baseado no seu transporte por intermédio dos transportadores de aminoácidos neutros localizados na membrana endotelial (1). Uma vez no cérebro, o metabolismo leva à formação dos conjugados com a NAC, os quais são eliminados mais lentamente e são mais persistentes a nível cerebral (1). De acordo com o exposto, estudos recentes usando a microdialise *in vivo* demonstraram que os metabolitos da MDMA conjugados com a NAC, têm um $t_{1/2}$ superior ao dos conjugados com a GSH no cérebro de ratos, após a administração sub-cutânea de MDMA (62). Foi realizado um estudo em que se demonstrou que os conjugados com a NAC, 5-(NAC)-N-Me- α -MeDA e 5-(NAC)- α -MeDA, são toxinas potentes para os neurónios corticais de ratos, expostos por um período curto de 6 h aos metabolitos (211). Também se verificou que estes conjugados com a NAC são mais tóxicos nos neurónios corticais, quer em exposições curtas, quer em exposições longas, do que os catecóis que lhes deram origem e do que a própria MDMA. Consequentemente, o potencial neurotóxico dos conjugados com a NAC é maior, uma vez que estes tendem a acumular-se no cérebro (211). Adicionalmente, é importante considerar que todos os metabolitos podem aparecer no cérebro simultaneamente após a administração de MDMA. É portanto possível, a ocorrência de um efeito tóxico sinérgico ou aditivo destes metabolitos em concentrações mais baixas do que aquelas de cada composto isolado (211, 212).

Os estudos *in vivo* têm demonstrado que os metabolitos da MDMA conjugados com a GSH promovem efeitos neurotóxicos quando injectados directamente no cérebro. A injeção intracerebroventricular em ratos de 5-(NAC)- α -MeDA e 5-(GSH)- α -MeDA, produz alterações comportamentais características da administração periférica de MDMA ou de MDA, assim como um aumento agudo da concentração extracelular de 5-HT e DA no cérebro (207). Também a injeção directa destes metabolitos no estriado, córtex e hipocampo produz depleção de 5-HT e alterações comportamentais similares às obtidas após a administração periférica de MDMA e MDA (213).

Os metabolitos da MDMA conjugados com a GSH podem formar quinonas tioéter, as quais podem ligar-se a macromoléculas tecidulares assim como ao DNA (214, 215). Além disso, as *orto*-quinonas, aminocromos e os conjugados com a GSH podem causar inibição irreversível de enzimas, que possuam grupos tiol (210). Os catecóis, as hidroquinonas e as quinonas podem sofrer oxidação espontânea através do oxigénio e formar superóxido e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), os quais podem levar a peroxidação lipídica e conduzir ao dano neuronal, um evento secundário à produção de radicais hidroxilo ($OH^\bullet$). Estas ideias são fundamentadas pela prevenção da neurotoxicidade induzida pela MDMA em animais de laboratório com o uso de antioxidantes, tais como: N-tert-butil alfa-fenilnitrona (PBN) (216), ácido alfa-lipóico (217) e acetil-L-carnitina (218).

A neurotoxicidade dos conjugados 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e 5-(NAC)-N-Me- α -MeDA é bastante importante para a extrapolação dos resultados obtidos em animais para os humanos. A N-Me- α -MeDA é o principal metabolito plasmático da MDMA nos humanos, enquanto nos ratos é a α -MeDA (65, 184). Como as reacções metabólicas são similares entre humanos e ratos, variando apenas a velocidade e importância destas reacções, é de esperar encontrar os metabolitos da MDMA conjugados com a GSH e com a NAC no cérebro de humanos e que estes conjugados possam atingir concentrações neurotóxicas, à semelhança do que acontece nos ratos (211). É também importante salientar que a fracção de N-Me- α -MeDA convertida em metabolito tóxico pode variar bastante entre indivíduos expostos a doses similares de MDMA, devido ao polimorfismo das enzimas envolvidas na activação da MDMA (CYP2D6) e na inactivação dos metabolitos da MDMA (COMT) (55, 60). As diferenças entre as espécies animais na velocidade de O-desmetilação da MDMA e da MDA podem ser responsáveis pelas diferentes respostas neurotóxicas a estas anfetaminas (48, 184).

Considerando os resultados obtidos pelos diferentes grupos de investigação foi elaborada uma hipótese para explicar a neurotoxicidade dos metabolitos da MDMA. A MDMA é metabolizada no fígado com formação dos catecóis N-Me- α -MeDA e α -MeDA, os quais podem ser posteriormente metabolizados aos correspondentes conjugados com a GSH. No cérebro ou no interior dos vasos da BHE os metabolitos conjugados com a GSH podem ser metabolizados pela via dos ácidos mercaptúricos. Inicialmente, os conjugados com a GSH são metabolizados por acção da γ -GT e dipeptidase aos correspondentes conjugados com a cisteína, podendo posteriormente ser metabolizados a conjugados com a NAC pela N-acetiltransferase. Os conjugados com a GSH e com a cisteína podem atravessar a BHE através do sistema de transportadores de aminoácidos neutros que está situado neste sistema. No entanto, a acumulação destes compostos no cérebro pode ser comprometida pela acção dos transportadores multirresistentes a fármacos 1 e 2, os quais estão localizados na BHE e fazem a eliminação do cérebro dos aductos da GSH. Os aductos com a NAC tendem a acumular-se no cérebro uma vez que este mecanismo não favorece a sua retirada. Os conjugados com a GSH e com a NAC podem exercer a sua acção tóxica em diferentes neurónios no cérebro, mas parecem ter grande afinidade para entrar nos neurónios serotoninérgicos via 5-HTT e dopaminérgicos via DAT. Os metabolitos conjugados com a GSH e com a NAC são altamente reactivos e podem entrar no ciclo redox, o que conduz à formação de quinonas e ROS, podendo também formar aductos com outras moléculas como proteínas e DNA. Os metabolitos da MDMA, assim como outros factores que serão discutidos nos próximos pontos, promovem stresse oxidativo nas células neuronais o que poderá conduzir à degeneração

dos terminais nervosos serotoninérgicos e dopaminérgicos, assim como de outros sistemas neuronais (1).

Resumindo, pode dizer-se que o metabolismo da MDMA, que conduz à formação de metabolitos conjugados com a GSH reactivos, os quais produzem ROS/RNS e produtos tóxicos de oxidação, pode desempenhar um papel fundamental nos eventos neurotóxicos provocados pela “ecstasy”.

8.2. Influência da temperatura

Vários estudos *in vivo* demonstraram que a hipertermia é um factor muito importante quando se tenta perceber a neurotoxicidade da MDMA. A importância da temperatura ambiente na depleção a longo prazo de 5-HT e 5-HIAA após a administração de MDMA (20 ou 40 mg/Kg) a ratos ficou demonstrada num estudo em que se verificou que, a uma temperatura ambiente de 20, 22 ou 24 °C, não se observam depleções significativas em nenhuma das áreas cerebrais estudadas. No entanto, quando no mesmo estudo a temperatura ambiente se eleva para 26, 28 ou 30 °C é observada uma depleção significativa destes marcadores. Estes factos demonstram que pequenas alterações na temperatura ambiente podem produzir marcadas alterações no grau de neurotoxicidade serotoninérgica (81). Gordon e colaboradores sugeriram que a MDMA pode provocar a perda dos mecanismos de termorregulação, uma vez que os ratos tratados com MDMA (30 mg/Kg) a temperaturas ambiente acima dos 24 °C apresentam hipertermia, enquanto se tratados a 10 °C apresentam hipotermia (83).

Foi demonstrado que a hipertermia no rato aumenta a libertação de DA e 5-HT induzida pela MDMA, num estudo usando a microdiálise e no qual se procedeu à administração intraperitoneal de 2,5 e 5 mg/Kg de MDMA no estriado e no núcleo accumbens. Neste estudo observou-se um substancial aumento da concentração extracelular de DA e 5-HT, sendo este aumento mais marcado na temperatura ambiente mais elevada (30 °C). Estes resultados demonstram que as temperaturas ambiente elevadas aumentam a actividade locomotora e a libertação de monoaminas induzida pela MDMA, na região envolvida na recompensa das drogas de abuso, o que sugere que os efeitos da MDMA podem ser mais pronunciados a temperaturas ambientes mais elevadas (219). O aumento do efluxo de DA e 5-HT, em condições ambientais de temperatura elevada pode potenciar os efeitos neurotóxicos promovidos pela MDMA.

A hipertermia potencia a neurotoxicidade dos metabolitos da MDMA conjugados com a GSH. Tendo em conta que os metabolitos da MDMA produzem ROS e RNS e que

diminuem os níveis de GSH intracelular, o stresse oxidativo induzido pela hipertermia vai potenciar a toxicidade destes metabolitos (211).

Quando é administrada uma única dose de MDMA, é necessária a existência de hipertermia para que ocorram efeitos neurotóxicos. Por outro lado, a administração repetida de baixas doses de MDMA (4 mg/Kg, duas vezes por dia, durante 4 dias) não produz hipertermia, mas produz depleção a longo prazo de 5-HT (80). Mesmo quando se observa hipotermia em ratos após a administração de MDMA, pode ocorrer uma significativa redução de 5-HT e de 5-HTT (78, 115). Portanto, embora a hipertermia possa potenciar a neurotoxicidade induzida pela MDMA, não é a única responsável pela neurotoxicidade que sucede a longo prazo após a administração de MDMA. Por outro lado, ao contrário do que ocorre no modelo animal rato, a MDMA leva sempre a um aumento da temperatura corporal em humanos, independentemente da temperatura ambiente (220). A MDMA causa hipertermia aguda em animais de laboratório podendo ser fatal em humanos (9, 100). Estes resultados são especialmente importantes dado que o consumo de MDMA ocorre com maior frequência em locais de diversão nocturnos (por norma ambientes quentes e sobrelotados) o que pode potenciar os efeitos no sistema termorregulador e conduzir a hipertermia fulminante.

Foi já verificado que a prevenção da hipertermia induzida pela MDMA diminui a neurotoxicidade e que muitos agentes que protegem contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA também diminuem a temperatura corporal dos animais (79, 221). Como mencionado anteriormente neste texto, muitos dos compostos que foram inicialmente propostos como protectores contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA em animais fazem-no, não devido a uma acção neuroquímica específica, mas sim devido a um efeito indirecto de diminuição da temperatura corporal. De facto, a administração de um fármaco que previna a hipertermia irá produzir neuroprotecção (79, 123).

Em resumo, pode dizer-se que a hipertermia é um importante factor nos efeitos neurotóxicos induzidos pela MDMA. A hipertermia que se sucede à administração de MDMA potencia a neurotoxicidade da MDMA e as drogas que bloqueiam a hipertermia atenuam-na. No entanto, a neurotoxicidade a longo prazo provocada pelo consumo de “ecstasy” não está directamente dependente da hipertermia.

8.3. Influência da DA

Alguns estudos têm sugerido que a DA tem uma significativa importância na neurotoxicidade induzida pela MDMA. A MDMA promove a libertação de DA tanto *in vivo* como *in vitro* (222) sendo esta libertação de DA amplificada pelo aumento pós-sináptico

de 5-HT, que conduz à activação dos receptores 5-HT_{2A}, envolvidos no aumento da síntese e libertação de DA (24). Stone e colaboradores efectuaram um estudo em que observaram que o dano nos terminais serotoninérgicos em animais era atenuado com a administração de um inibidor da síntese de DA, α -metil-*p*-tirosina, ou do agente depletor de catecolaminas, reserpina (223). A lesão selectiva dos terminais nervosos dopaminérgicos de ratos com 6-hidroxi-dopamina, bloqueia os efeitos neurotóxicos da MDMA em várias regiões do cérebro (223). Também se verificou que o pré-tratamento dos ratos com L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), um precursor da DA, aumenta a neurotoxicidade da MDMA (224). Outros estudos mostram que os inibidores do DAT, GBR 12909 e mazindol, previnem o aumento dos níveis de DA e a neurotoxicidade serotoninérgica, após o tratamento com MDMA (38, 223). O antagonista dos receptores da DA, haloperidol, apresenta um efeito neuroprotector (225, 226). No entanto, em alguns destes estudos a temperatura corporal dos animais não foi controlada e alguns compostos (reserpina, α -metil-*p*-tirosina e haloperidol) podem atenuar a hipertermia induzida pela MDMA (1).

Também suportando a noção do envolvimento do metabolismo da DA na neurotoxicidade induzida pela MDMA em ratos está o facto da inibição da MAO-B, quer por agentes farmacológicos, como o L-deprenil, quer por oligonucleótidos “antisense” marcados para a MAO-B, resultar em neuroprotecção (218, 227-229).

A administração de antagonistas dos receptores 5-HT_{2A} previne a estimulação da síntese de DA induzida pela MDMA e a depleção a longo prazo dos níveis de 5-HT cerebrais (77, 230). Por outro lado, a administração concomitante de MDMA e agonistas dos receptores 5-HT_{2A} potencia o efluxo de DA induzido pela MDMA e o efeito tóxico nos neurónios serotoninérgicos (34, 231). Com efeito, os níveis de DA podem aumentar como resultado da estimulação dos receptores pós-sinápticos serotoninérgicos do sub-tipo 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} localizados nos neurónios GABAérgicos.

O sistema GABAérgico, que se pensa estar envolvido como modulador da actividade dopaminérgica, pode também estar envolvido na neurotoxicidade induzida pela MDMA. Colado e colaboradores demonstraram que o clometiazole, um agonista do ácido γ -aminobutírico (GABA), atenua a toxicidade serotoninérgica induzida pela administração de MDMA a ratos (76). Num outro estudo usando a microdiálise, observou-se que o aumento extracelular de DA induzido pela MDMA estava associado a uma diminuição dos níveis extracelulares de GABA no estriado do rato, o qual podia ser revertido pelo antagonista do receptor 5-HT_{2A}, ritanserina (232). É possível que a redução dos níveis de GABA mediada pela MDMA, possa aumentar a síntese e libertação de DA, potenciando desta forma os seus efeitos neurotóxicos.

Num outro estudo é sugerido um papel para a tirosina, aminoácido precursor da biosíntese da DA, na depleção de biomarcadores serotoninérgicos induzida pela MDMA (233). Foi demonstrado que a MDMA aumenta a concentração de tirosina no cérebro. A infusão local de L-tirosina no estriado ou no hipocampo de ratos durante a administração de MDMA potencia a depleção a longo prazo de 5-HT, a qual pode ser atenuada pela inibição da enzima responsável pela conversão da L-DOPA em DA (233). Com estas observações, os autores sugerem que a MDMA depleta a 5-HT através do aumento da tirosina no cérebro e da sua eventual conversão em DA nos terminais serotoninérgicos (233). Num estudo mais recente avaliando o papel da tirosina na neurotoxicidade induzida pela MDMA os autores concluem que, embora a tirosina possa contribuir para a neurotoxicidade, existem outros factores, como por exemplo o metabolismo da MDMA, que parecem ser o passo limitante na neurotoxicidade (234).

Sprague e colaboradores elaboraram uma hipótese para explicar o papel da DA na neurotoxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA (235). Segundo esta teoria a MDMA induz uma série de eventos que culminam na neurotoxicidade serotoninérgica. Inicialmente, a MDMA induz uma libertação aguda de 5-HT e DA a qual é seguida da depleção intraneuronal das reservas de 5-HT. A libertação inicial de 5-HT activa os receptores pós-sinápticos 5-HT_{2A/2C} localizados nos neurónios GABAérgicos, ocorrendo como resultado uma diminuição da transmissão GABAérgica e um aumento da libertação e síntese de DA. A DA em excesso no espaço sináptico é transportada para o interior dos neurónios depletados em 5-HT, onde vai ser desaminada pela MAO-B, localizada nos terminais serotoninérgicos, produzindo H₂O₂. Esta sequência de acontecimentos leva à formação de radicais livres e à degeneração dos terminais neuronais serotoninérgicos (235).

No entanto, existem estudos que contrariam a hipótese de que a DA esteja envolvida no mecanismo de neurotoxicidade da MDMA. A teoria da DA não tem em conta o facto de que o dano nos terminais serotoninérgicos é observado em todo o SNC, nomeadamente em áreas com pouca inervação dopaminérgica como é o caso do hipocampo. O papel da DA em outras regiões cerebrais, onde o conteúdo em DA é muito baixo, implicaria diferentes mecanismos para o dano, em diferentes regiões cerebrais (236). Os estudos de Yuan e colaboradores também sugerem que a DA não está envolvida no mecanismo de neurotoxicidade induzida pela MDMA. Nenhuma protecção é conferida aos neurónios serotoninérgicos quando a reserpina ou a α -metil-*p*-tirosina são administradas a ratos, nos quais a temperatura corporal é mantida elevada (137). Similarmente, não se observa protecção destes agentes contra a neurotoxicidade induzida pela METH (237). Estes resultados sugerem que a DA pode ter um importante

papel, mas que sozinha não é determinante para a ocorrência de eventos neurotóxicos serotoninérgicos.

A administração de GBR 12909 aumenta a concentração extracelular de DA em ratinhos após a administração de MDMA, e diminui a formação de radicais livres e de malondialdeído, conferindo protecção contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA (40). Este facto sugere que os radicais livres e o stresse oxidativo estão envolvidos na neurotoxicidade dopaminérgica induzida pela MDMA. Estes dados demonstram que o aumento da libertação de DA não é um mecanismo chave na produção de dano neurotóxico, pelo menos no ratinho.

Existem inúmeras evidências experimentais que demonstram a existência de uma relação entre a oxidação da DA e a formação de $\text{HO}^\bullet$. É sabido que a DA é uma molécula reactiva que pode ser degradada por via enzimática pela MAO originando DOPAC e H_2O_2 , o qual, por sua vez, origina o $\text{HO}^\bullet$ por via da reacção de Fenton (238). Quando, ao nível intracelular, se esgotam as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, a DA pode entrar num processo de oxidação com a formação de espécies altamente reactivas. Comparativamente a outros neurotransmissores catecolaminérgicos, a DA é o mais propenso a sofrer auto-oxidação com a consequente formação de quinonas, semi-quinonas, aminocromos, tioéteres, ROS e RNS, que podem danificar macromoléculas essenciais à sobrevivência da célula como, por exemplo, lípidos, proteínas e DNA, dada a sua capacidade de reacção com os locais nucleófilos intracelulares (239). Esta particularidade da DA tem sido estudada para explicar a neurodegeneração dopaminérgica que ocorre na doença de Parkinson (240, 241).

8.4. Influência da 5-HT e dos seus metabolitos

Foi igualmente sugerido que a 5-HT ou um metabolito tóxico da 5-HT possam ser responsáveis pela neurotoxicidade induzida pela MDMA, uma vez que a inibição da recaptação de 5-HT, promovida pela fluoxetina e pelo citalopram, antagoniza a neurotoxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA (77, 126). Um estudo recente verificou que a inibição da MAO-B pela selegilina consegue evitar os fenómenos de neurotoxicidade induzidos pela MDMA ao nível das mitocôndrias cerebrais, nomeadamente as deleções de DNA mitocondrial, a peroxidação lipídica e carbonilação proteica (218). Os autores atribuem o papel protector da selegilina à inibição do metabolismo da 5-HT, o que previne a formação de H_2O_2 e a consequente produção de ROS a nível mitocondrial. Uma situação de stresse oxidativo aumentado, gerado pelo metabolismo da 5-HT pela MAO-B, conduziria a degeneração do terminal

serotoninérgico. Por outro lado, o metabolismo da 5-HT pode levar à formação de metabolitos reactivos tóxicos capazes de serem transportados pelos transportadores serotoninérgicos, como por exemplo, a neurotoxina 5,6-diidroxitriptamina ou a triptamina-4,5-diona, sendo estas condições conseguidas pela acção de anfetaminas como a MDMA (242, 243).

Adicionalmente, o facto de se ter verificado que os antagonistas dos receptores 5-HT_{2A} atenuam os efeitos neurotóxicos da MDMA, sugere que a activação destes receptores pela 5-HT possa ter um papel no mecanismo de toxicidade, possivelmente por provocarem alterações na homeostase do cálcio ou através da translocação e activação da proteína cínase C (PKC) (244). Em concordância com um possível papel do cálcio nos efeitos neurotóxicos da MDMA, verificou-se que a utilização de um bloqueador dos canais de cálcio (tipo L) evitou a toxicidade induzida pela MDMA (245). No entanto, uma vez que os antagonistas do receptor 5-HT_{2A} também atenuam a libertação de DA induzida pela MDMA, existe a possibilidade dos eventos mediados pela DA poderem explicar esta protecção (1).

8.5. Influência da inibição da TPH

Vários estudos já confirmaram que após a administração de MDMA a ratos ocorre uma diminuição a longo prazo da actividade da TPH, enzima limitante na síntese de 5-HT, no neoestriado, hipocampo, hipotálamo e córtex (30, 114-116), podendo esta enzima ter um papel na neurotoxicidade induzida pela MDMA. A inibição da actividade da TPH continua a ser detectada mais de duas semanas após a administração de uma única dose de MDMA (30). Esta inibição é irreversível, pois a recuperação da actividade enzimática requer a síntese de nova enzima (30, 115). Embora uma única injeção central directa de MDMA não altere a actividade da TPH no córtex e no estriado, a infusão contínua de MDMA durante uma hora, resulta numa redução significativa da actividade da enzima (246). Estes dados podem indicar que é necessária a formação periférica de um metabolito activo, responsável pelos efeitos neuroquímicos agudos da MDMA. Esta hipótese é suportada pela observação de que a MDMA não inibe a actividade da enzima *in vitro* (30). Os metabolitos da MDMA, como os derivados quinónicos, podem entrar no ciclo redox e interagir com os grupos sulfidrílo da enzima levando à sua oxidação (247, 248). Os estudos também indicam que o óxido nítrico (NO) inactiva a TPH por uma acção selectiva nos grupos sulfidrílo críticos contidos em resíduos de cisteína (249). Estes dados podem ser relevantes para a neurotoxicidade da MDMA, uma vez que a droga aumenta a produção de NO e ROS *in vivo*.

Em ratos, a prevenção da diminuição a longo prazo da actividade da TPH após a administração de MDMA, pode ser conferida pelos inibidores da recaptação de 5-HT (250) e também pela inibição da MAO-B (227). A diminuição da actividade da TPH pode contribuir para o défice de 5-HT induzido pela MDMA, uma vez que é a enzima limitante envolvida no processo de síntese. No entanto, ao contrário das outras acções desencadeadas pela administração de MDMA, os neurónios serotoninérgicos parecem ser capazes de recuperar deste evento neurotóxico (1).

8.6. Influência do 5-HTT

O envolvimento do 5-HTT no mecanismo de neurotoxicidade induzido pela MDMA foi já evidenciado em vários estudos. A base para esta hipótese reside no facto de os inibidores do 5-HTT, como a fluoxetina ou a fluvoxamina, prevenirem a neurotoxicidade serotoninérgica em ratos induzida pela MDMA, sem interferirem com a hipertermia induzida pela MDMA (79, 126, 135, 250).

A activação do 5-HTT pela MDMA parece ter um papel crítico na toxicidade a longo prazo nos terminais serotoninérgicos. A administração concomitante de MDMA e fluoxetina ou fluvoxamina a ratos machos Dark-Agouti providencia uma protecção completa contra a neurotoxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA no córtex, no hipocampo e no estriado (126). A administração de fluoxetina 4 h após a administração de MDMA confere total protecção contra a toxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA, enquanto o mesmo tratamento 6 h após a MDMA atenua significativamente a neurotoxicidade induzida pela MDMA (251). Além disso, a administração de fluoxetina a ratos 2 ou 4 dias antes da administração de MDMA providencia protecção total e, quando administrada 7 dias antes, ainda é observada uma protecção significativa (126). Este efeito protector a longo prazo da fluoxetina parece estar relacionado com a significativa concentração no cérebro do seu metabolito, norfluoxetina, o qual apresenta um $t_{1/2}$ superior e uma actividade inibitória do 5-HTT equivalente à da fluoxetina (126, 252). A administração de fluoxetina, antes ou depois da administração de MDMA, resulta na redução da formação de radicais livres induzida pela MDMA (251). Um potencial mecanismo pelo qual a fluoxetina atenua a formação de radicais é através da prevenção da entrada no terminal serotoninérgico de substâncias reactivas como os metabolitos da MDMA que são capazes de gerar radicais livres.

Foi realizado um estudo em ratinhos “knockout” para o 5-HTT com o objectivo de avaliar os efeitos neurotóxicos induzidos pela MDMA. Quatro semanas após a última injeção de MDMA (20 mg/Kg duas vezes por dia durante 4 dias), os ratinhos “wild type”

C57BL/6J apresentam depleção de 5-HT na área anterior do núcleo de rafe, no hipocampo, no estriado e no córtex (253). O mesmo regime de MDMA produz um decréscimo de 30 % na proliferação celular das células do hipocampo marcadas com 5-bromodeoxiuridina (253). Todos os efeitos descritos anteriormente são abolidos nos ratinhos “knockout” (253). Estes resultados demonstram a importância da função do 5-HTT nos défices serotoninérgicos observados em animais tratados com MDMA.

A expressão do 5-HTT pode ser rapidamente modulada pela estimulação do receptor, produção do segundo mensageiro e activação da cínase. A supressão da actividade do 5-HTT é acompanhada pela activação da PKC, a qual induz a perda da capacidade de recaptação da 5-HT (254). A activação da PKC conduz à fosforilação do transportador, à sua redistribuição na superfície da célula, seguindo-se a sequestração em vesículas intracelulares e a consequente perda da actividade de recaptação. Os ligandos que são capazes de permear o transportador, tais como a 5-HT e as anfetaminas, previnem a fosforilação do 5-HTT dependente da PKC. Por outro lado, os antidepressivos facilitam a fosforilação do 5-HTT e bloqueiam a recaptação de 5-HT (254, 255). Dado que a MDMA é um substrato do 5-HTT, uma diminuição na densidade das proteínas transportadoras na membrana celular, induzida pela presença de inibidores do 5-HTT, poderá levar a um significativo e prolongado bloqueio da recaptação de MDMA e dos seus produtos metabólicos para os terminais nervosos serotoninérgicos pré-sinápticos (126).

Um potencial mecanismo pelo qual os inibidores de 5-HTT evitam a neurotoxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA, é por prevenção da entrada no terminal serotoninérgico de substâncias reactivas, tais como os metabolitos da MDMA ou produtos da oxidação da 5-HT e da DA, que são capazes de originar radicais livres (1). Estes estudos sugerem, portanto, que o 5-HTT desempenha um importante papel no mecanismo de neurotoxicidade induzido pela MDMA embora não seja o único responsável pela regulação desses eventos.

8.7. Influência do Glutamato

Os aminoácidos excitatórios, nomeadamente o glutamato (GLU), têm sido implicados na neurotoxicidade induzida pelas anfetaminas. A libertação excessiva de GLU tem sido associada com a morte das células neuronais, sendo este processo designado por excitotoxicidade. O aumento de GLU pode activar receptores ionotrópicos e metabotrópicos do GLU e aumentar os níveis de cálcio intracelular. O aumento de

cálcio pode conduzir à activação de uma variedade de cínases e proteases o que resulta no colapso de proteínas do citoesqueleto e na formação de ROS (256).

Foi realizado um estudo em ratos no qual se efectuou a administração repetida de MDMA e de METH, tendo-se observado que a METH aumentou a concentração extracelular de GLU no estriado, enquanto a MDMA não aumentou o efluxo de GLU na mesma área (257). Um outro estudo demonstrou que a administração local de MDMA a ratos diminuiu o efluxo de GLU no núcleo accumbens, devido a interacções entre o sistema serotoninérgico e o sistema dopaminérgico (258). De acordo com o estudo de Obradovic e colaboradores, a activação do receptor 5-HT_{2A} provoca um aumento dos níveis de DA que irá por sua vez provocar a diminuição dos níveis de GLU (259). Estes estudos indicam que a MDMA pode levar à diminuição da libertação de GLU em algumas áreas cerebrais.

Também se demonstrou que a administração de antagonistas dos receptores NMDA como a dizocilpina (MK-801) confere protecção contra o dano nos terminais serotoninérgicos induzido pela MDMA (76, 226, 245). No entanto, um outro estudo revelou que a co-administração de MK-801 e MDMA produz uma resposta hipotérmica e que quando a temperatura dos animais é mantida elevada o efeito neuroprotector do MK-801 é perdido (79, 221).

Avaliando a neurotoxicidade da MDMA noutros sistemas neuronais, um estudo, realizado em culturas de neurónios corticais de ratos, demonstrou que a toxicidade da MDMA era parcialmente prevenida pelo MK-801, tanto em condições normotérmicas como em condições hipertérmicas (212). Estes dados sugerem que o efeito protector conferido contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA nos terminais nervosos serotoninérgicos observado nos estudos *in vivo*, pode ser dissociado do efeito hipotérmico promovido pelo tratamento com MK-801 (76, 226, 245). Os dados obtidos do trabalho de Capela e colaboradores sugerem a possibilidade do envolvimento da excitotoxicidade na morte neuronal de células pós-sinápticas induzida pela MDMA. A MDMA pode promover ao nível das células corticais, a libertação de GLU directa ou indirectamente via receptor 5-HT_{2A} (212).

De acordo com estes estudos, pode-se concluir que a excitotoxicidade do GLU pode estar envolvida, mas não desempenha um papel fundamental na neurotoxicidade induzida pela MDMA.

8.8. Influência do NO

O NO é sintetizado pela NO sintetase (NOS) que está classificada em 3 isoformas principais: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e indutível (iNOS) (260). O NO tem uma função importante na comunicação entre neurónios e também na excitotoxicidade. Foi demonstrada a neurotoxicidade do NO formado por activação da NOS, após a entrada de cálcio pelos receptores NMDA mediada pelo GLU (261). O NO pode reagir com o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e formar peroxinitritos ($ONOO^-$), os quais são potentes neurotoxinas (262).

Um estudo realizado em ratos demonstrou que a actividade da NOS no córtex se encontrava significativamente elevada 6 h após a administração de MDMA (263). O pré-tratamento com N^w -nitro-L-arginina (L-NNA), um inibidor da NOS, protege parcialmente contra a depleção a longo prazo de 5-HT induzida pela MDMA, no córtex frontal e parietal. Além disso, foi também demonstrado que o pré-tratamento com este inibidor da NOS causa uma significativa inibição da actividade da NOS cerebral, mas não afecta as alterações agudas de 5-HT e DA ou a hipertermia induzida pela MDMA (263). Estes resultados sugerem que são as propriedades inibitórias da NOS, e não os seus efeitos nas alterações agudas das monoaminas e na hipertermia induzida pela MDMA, as responsáveis pela prevenção da neurotoxicidade serotoninérgica e dopaminérgica conferida pela L-NNA.

Mais recentemente, verificou-se que a administração sistémica a ratos de um inibidor da NOS, S-metil-L-tiocitrulina (S-MTC), apresenta um efeito protector na depleção de 5-HT induzida pela MDMA (264). É importante salientar que esta protecção foi conseguida sem alterar os efeitos hipertérmicos da MDMA, o que demonstra o envolvimento do NO na depleção de 5-HT induzida pela MDMA. Adicionalmente, observou-se que a administração de MDMA aumenta significativamente a formação de NO, bem como a concentração de nitrotirosina no estriado (264). A administração intraperitoneal de MDMA (10 mg/Kg) e de METH (10 mg/Kg) produz um aumento na concentração de nitrotirosina, o que sugere que estas anfetaminas podem potenciar a formação de $ONOO^-$ e estes, por sua vez, induzem a nitração dos resíduos de tirosina em várias proteínas. É portanto possível que entre estas proteínas nitradas estejam algumas fundamentais para o funcionamento dos terminais serotoninérgicos e dopaminérgicos, tais como a TH, a TPH ou os transportadores vesiculares monoaminérgicos.

Foi já demonstrado que a incubação de células neuronais de rato em cultura, com um inibidor da NOS e com um inibidor dos receptores NMDA protege contra a morte celular induzida pela MDMA (145).

Colado e colaboradores verificaram que os inibidores da nNOS conferem uma significativa neuroprotecção em ratinhos contra a toxicidade dopaminérgica, com uma interferência mínima na temperatura (41). Estes estudos provam que o NO pode ser importante no mecanismo de toxicidade da MDMA nos sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos ou ainda noutros sistemas neuronais. No entanto, novos estudos são necessários para clarificar a relevância do NO no mecanismo de neurotoxicidade da MDMA.

8.9. Influência do receptor 5-HT_{2A}

Como já foi referido neste texto a MDMA, tal como outros compostos alucinogénicos, possui afinidade para o receptor 5-HT_{2A} localizado nos neurónios corticais de ratos e humanos (42) com um $K_i \approx 5 \mu\text{M}$ (44).

Os antagonistas do receptor 5-HT_{2A}, ketanserina e ritanserina, mostram eficácia na prevenção do dano neuronal induzido pela MDMA em ratos (77, 265). No entanto, foi também demonstrado que a co-administração de ketanserina e MDMA produz uma resposta hipotérmica. Quando a temperatura destes animais é mantida elevada, o efeito protector destas drogas é abolido (79). De acordo com isto, também a activação do receptor 5-HT_{2A} com agonistas directos, como por exemplo o ($\pm$)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-amipropano (DOI) e a MDMA, resulta no aumento da temperatura do animal (266). Uma vez que o efeito protector dos antagonistas dos receptores 5-HT_{2A} *in vivo* não pode ser dissociado do efeito hipotérmico promovido pelo antagonista, a avaliação *in vitro* do efeito protector dos antagonistas 5-HT_{2A} em condições de temperatura normal e hipertérmicas controladas assume particular relevância.

Stumm e colaboradores foram os primeiros a mostrar que a exposição à MDMA resulta em significativa neurotoxicidade para as culturas corticais de rato (267). Um estudo posterior em culturas neuronais sem soro provenientes do córtex do rato avaliou o papel do receptor 5-HT_{2A} na neurotoxicidade induzida pela MDMA (145). Este estudo revelou que os efeitos neurotóxicos induzidos pela MDMA são parcialmente dependentes das suas propriedades de agonista do receptor 5-HT_{2A}, tanto em condições normotérmicas (36,5 °C), como em condições hipertérmicas (40 °C), simuladas em incubadora celular.

Noutro trabalho que usou culturas neuronais primárias do córtex de rato com o objectivo de testar se a neurotoxicidade induzida pela MDMA é mediada por agonismo no receptor 5-HT_{2A}, foi feita a pré-incubação dos neurónios corticais com um anticorpo do receptor 5-HT_{2A} em condições de hipertermia. O pré-tratamento das culturas com o

anticorpo, uma hora antes da exposição ao período de 48 h de estimulação com 400 μ M de MDMA, previne os efeitos neurotóxicos da MDMA. O anticorpo ao ser um bloqueador não competitivo irreversível do receptor 5-HT_{2A} demonstrou que a neurotoxicidade induzida pela MDMA é, de facto, totalmente mediada pela estimulação do receptor 5-HT_{2A} (146). Neste artigo os autores reportam que a apoptose neuronal mediada pela estimulação do receptor 5-HT_{2A} é acompanhada pela activação da caspase 3. A actividade da caspase 3 aumenta de uma forma dependente da concentração de MDMA em culturas neuronais corticais.

9. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO

Nos últimos 20 anos tem-se verificado uma intensa investigação no sentido de conhecer o mecanismo de acção e de toxicidade da MDMA, uma droga consumida para fins recreacionais por milhões de pessoas em todo o mundo. A maioria dos estudos foca essencialmente os danos no sistema serotoninérgico deixando para segundo plano o estudo da neurotoxicidade da MDMA no sistema dopaminérgico e noutros sistemas neuronais. O trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação de Mestrado teve como objectivos:

- Determinar a neurotoxicidade dopaminérgica da MDMA e dos seus metabolitos, α -MeDA e N-Me- α -MeDA, usando como modelo as células dopaminérgicas SH-SY5Y, um neuroblastoma humano;
- Avaliar o tipo de morte celular induzida pela MDMA e pelos seus metabolitos;
- Determinar o mecanismo pelo qual a MDMA e os seus metabolitos produzem neurotoxicidade dopaminérgica nas células SH-SY5Y;
- Estabelecer o envolvimento do stresse oxidativo na morte celular induzida pela MDMA e pelos seus metabolitos;
- Determinar agentes protectores que possam evitar a toxicidade dopaminérgica da MDMA e metabolitos testados.

CAPÍTULO II

Parte Experimental

1. A LINHA CELULAR SH-SY5Y

No presente trabalho foram usadas linhas celulares de um neuroblastoma humano, como modelo *in vitro* para o estudo da neurotoxicidade dopaminérgica da MDMA e dos seus metabolitos. As linhas celulares são provenientes de tumores ou produzidas por transfecção com vector viral. Estas linhas celulares apresentam a vantagem de poderem ser sub-cultivadas várias vezes e criopreservadas. As propriedades das células (por exemplo receptores e enzimas) estão bem caracterizadas embora, normalmente, o nível de diferenciação seja baixo. As linhas celulares facilitam a caracterização de subpopulações celulares e a compreensão de mecanismos a nível molecular. Para além disso, permitem realizar estudos num ambiente controlado sem a complexidade de interacções entre numerosos tipos de células e factores que ocorrem *in vivo*, realçando o efeito específico atribuído a um tipo celular ou estímulo (268).

A linha celular SK-N-SH, estabelecida nos anos 70, deriva de tumores malignos de neurónios imaturos (269) e demonstrou exibir propriedades de células estaminais, consistindo numa população heterogénea de vários tipos de células que se interconvertem. As células SK-N-SH expressam enzimas para a síntese de DA e NE (270), tendo sido demonstrado que secretam mais DA do que NE *in vitro* (271). Estas células foram modificadas geneticamente para criar a linha celular conhecida como SH-SY5Y, a qual mantém as características das células estaminais (269) e consegue proliferar em cultura por longos períodos de tempo, sem contaminação (269). Estas células têm sido utilizadas no estudo dos mecanismos de apoptose produzidos pelo 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) e na neuroprotecção pelos agonistas da DA (272-275). Esta linha celular tem também sido utilizada para estudos com derivados anfetamínicos, como é o caso da METH (276-278) e da MDMA (279).

A linha celular SH-SY5Y exibe propriedades neuronais e um fenótipo catecolaminérgico, que inclui a capacidade para transportar DA e NE, expressão de enzimas para a síntese e metabolismo da DA e da acetilcolina e expressão de receptores para a DA e acetilcolina (280). O uso de células SH-SY5Y indiferenciadas como modelo para neurónios dopaminérgicos apresenta algumas limitações, nomeadamente a baixa expressão das enzimas de síntese da DA e a mitose contínua, o que pode afectar a resposta das células aos fármacos e às toxinas. Foi já demonstrado que a diferenciação das células SH-SY5Y com ácido retinóico (RA) seguida do tratamento com 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) aumenta significativamente a produção de enzimas de síntese da DA (281), os receptores D₂ (282) e a proteína G (283). Um outro estudo demonstrou que as células SH-SY5Y são imunorreactivas aos anticorpos dirigidos contra a TH e o DAT e que as membranas preparadas das células SH-SY5Y também são

imunopositivas usando a técnica de western blot (280). A diferenciação com RA seguida do tratamento com TPA aumenta significativamente o conteúdo de TH e DAT, quando comparada com as células indiferenciadas ou apenas diferenciadas com o RA. Por outro lado, o tratamento combinado com RA e TPA reduz os níveis de VMAT (280).

A cultura desta linha celular representa, então, uma ferramenta importante para o estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas de vários fármacos, constituindo um bom modelo para a avaliação da neurotoxicidade dopaminérgica da MDMA e dos seus metabolitos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os meios de cultura celular usados foram adquiridos à Gibco (Invitrogen, Paisley, UK): meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), tampão fosfato-salino (PBS), tripsina, penicilina/estreptomicina, aminoácidos não essenciais (NEAA) e soro bovino fetal (FBS). A MDMA foi extraída e purificada de comprimidos de MDMA de elevada pureza fornecidos pela Polícia Judiciária Portuguesa. O sal obtido foi purificado e caracterizado por técnicas de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. A α -MeDA e a N-Me- α -MeDA foram sintetizadas pelo Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, laboratório associado ao REQUIMTE/CQFB, de acordo com o que foi descrito por Capela e colaboradores (212). O kit para determinação da fragmentação do DNA foi adquirido à Roche (Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). O kit para determinação das proteínas foi adquirido à Bio-Rad (Richmond, CA, USA). As placas de cultura de 6 e 48 poços foram obtidas da empresa Corning Costar (Corning, NY, USA). Os frascos de 25 cm³ e 75 cm³ foram adquiridos à empresa TPP (Trasadingen, Switzerland). Todos os outros químicos foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

2.2. Cultura celular

A linha celular SH-SY5Y (ATCC, Manassas, VA, USA), cresceu até à confluência no meio DMEM suplementado com 10 % de FBS, 1 % da mistura penicilina/estreptomicina e 1 % de NEAA. As células foram mantidas à temperatura de 37 °C numa atmosfera com 5 % de CO₂. Após a confluência, as células foram tripsinizadas e sub-cultivadas em placas de 6 ou 48 poços. Para aumentar o fenótipo dopaminérgico, as células foram diferenciadas (280) com RA com uma concentração final de 10 μ M, durante 3 dias e com TPA com concentração final de 80 nM, durante mais 3 dias. Após 6 dias de diferenciação, o meio foi substituído por meio DMEM novo e as culturas foram tratadas com MDMA (100, 200, 400 e 800 μ M), α -MeDA (100, 200, 400 e 800 μ M), N-Me- α -MeDA (100, 200, 400 e 800 μ M) e/ou tiron (100 μ M), GBR 12909 (1 μ M), NAC (1 mM) e butionina sulfoximina (BSO) (25 μ M), durante 24 ou 48 h.

2.3. Determinação da viabilidade celular

As determinações da viabilidade celular foram realizadas 24 e 48 h após a adição de MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA. Após estes tempos o meio foi totalmente retirado e substituído por meio novo, tendo sido adicionado o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), o qual mede a actividade metabólica celular. Após a adição de 500 μ g de MTT/ml a cada poço e de incubar as placas a 37 °C durante 3 horas, a reacção foi parada pela adição de uma solução aquosa contendo 10 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,01 M de ácido clorídrico (HCL). A viabilidade celular foi então determinada pela detecção espectrofotométrica do formazan a 550 nm.

Como medida de crescimento e viabilidade celular foi avaliado o conteúdo proteico das culturas. Aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células foram recolhidas de cada poço de placas de 6 poços e tratadas com ácido perclórico (HClO₄) a 5 %. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry.

2.4. Morte celular por fragmentação do DNA

A fragmentação internucleossomal do DNA foi determinada quantitativamente usando o kit de detecção da Roche ("Cell Death Detection ELISA plus kit") de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As proteínas foram medidas usando o kit Bio-Rad ("Dc Protein Assay") de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

2.5. Determinação da actividade da caspase 3

Para determinação da actividade da caspase 3 foi realizado um ensaio colorimétrico previamente descrito (284). A hidrólise do substrato N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilina pela caspase 3, resulta na libertação de *p*-nitroanilina a qual apresenta elevada absorvância a 405 nm. Aproximadamente 1×10^6 células foram lisadas usando o tampão de lise [(50 mM HEPES, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,1 % CHAPS (pH=7,4)]. Ao lisado de células foi adicionado o tampão de ensaio [100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % Glicerol, 0,1 % CHAPS (pH=7,5)] e 16 μ M do substrato colorimétrico da caspase 3. Após a incubação a 37 °C durante 24 h, a absorvância foi medida espectrofotometricamente a 405 nm num leitor de placas. As proteínas foram medidas usando o kit Bio-Rad ("Dc Protein Assay") de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

2.6. Determinação da glutathiona reduzida e oxidada

A determinação da GSH intracelular foi realizada de acordo com um método previamente publicado (211). Aproximadamente $0,5 \times 10^6$ de células em cultura foram recolhidas de cada poço das placas de 6 poços e as proteínas precipitadas com HClO_4 com concentração final de 5 %. Após centrifugação, o sobrenadante foi neutralizado com uma solução equimolar de bicarbonato de potássio (KHCO_3). O conteúdo em GSH foi medido por colorimetria, a 415 nm, da cinética da redução de 600 μM de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), na presença de 1,4 U de glutathiona redutase e 0,22 mM de fosfato do dinucleótido de β -nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADPH), usando um leitor de placas. A determinação da glutathiona oxidada (GSSG) foi realizada, usando a 2-vinilpiridina para bloquear os grupos SH livres. No entanto, os níveis de GSSG intracelular encontravam-se abaixo do limite de detecção do método (0,25 μM). Como a GSSG não é quantificável no interior das células, os valores de GSH apresentados correspondem ao conteúdo de GSH reduzida. O sedimento proteico foi dissolvido em 0,3 M de hidróxido de sódio (NaOH) e as proteínas medidas pelo método de Lowry, usando soluções de albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O conteúdo de GSH foi normalizado de acordo com o conteúdo proteico.

2.7. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os resultados apresentados resultam da realização de pelo menos três experiências independentes. Foram usados testes não paramétricos para a análise estatística. O teste Kruskal-Wallis (análise da variância não paramétrica) foi usado para comparar as médias dos diferentes tratamentos entre grupos, seguido do teste post-hoc Student-Newman-Keuls, após obtenção de um valor de p significativo. Os detalhes de cada análise estatística estão apresentados na legenda de cada figura. Os valores de p inferiores a 0,05 são aceites como estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Neurotoxicidade da MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA nas células SH-SY5Y

A viabilidade das células dopaminérgicas diferenciadas, SH-SY5Y, foi testada adicionando a MDMA e os seus metabolitos, α -MeDA e N-Me- α -MeDA, usando diferentes concentrações dos compostos e após exposição das culturas por um período de 24 e 48 h. A MDMA (Figura 6A) é o composto que apresenta menor neurotoxicidade para as células SH-SY5Y. A neurotoxicidade da MDMA não é significativamente afectada pelo aumento da concentração e pelo tempo de exposição. Para o metabolito α -MeDA (Figura 6B) observam-se efeitos neurotóxicos para as concentrações de 400 e 800 μ M, sendo a toxicidade significativamente mais acentuada após exposição das células por um período de 48 h relativamente à exposição durante 24 h. O metabolito N-Me- α -MeDA (Figura 6C) demonstrou ser o mais neurotóxico dos 3 compostos, para as células SH-SY5Y. Para este composto observa-se uma toxicidade dependente da concentração e do tempo de exposição. Em todas as concentrações testadas houve diminuição da viabilidade celular de forma significativa. Com excepção da concentração de 800 μ M, a toxicidade da N-Me- α -MeDA aumenta de forma significativa com o tempo de exposição.

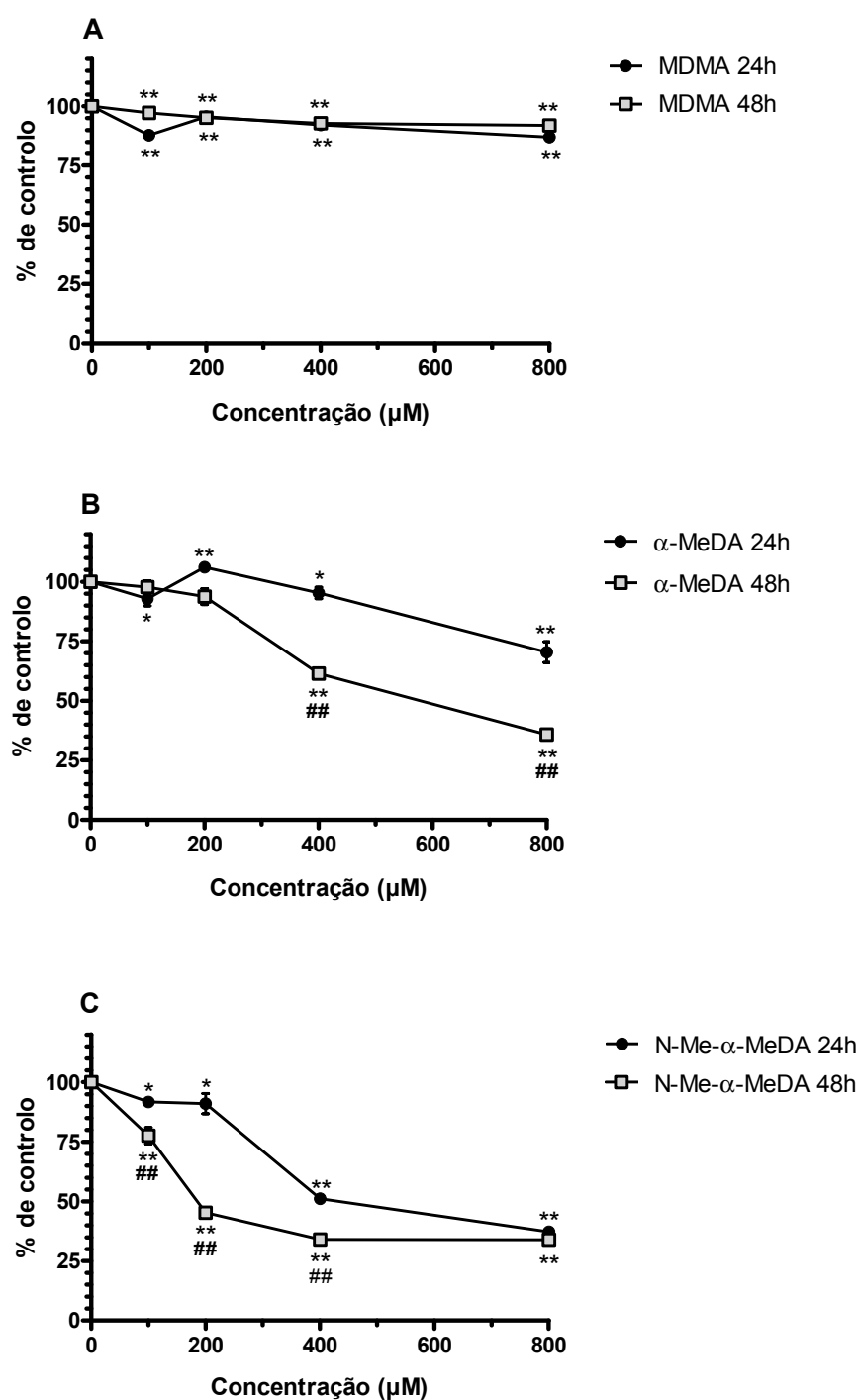


Figura 6. Neurotoxicidade da MDMA (A), α -MeDA (B) e N-Me- α -MeDA (C) avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT. As culturas celulares SH-SY5Y, foram expostas por um período de 24 e 48 h a diferentes concentrações (100, 200, 400 e 800 μ M). Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % ($n=24$ de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ concentração versus controlo; ## $p<0,01$ concentração às 48 h versus concentração às 24 h).

3.2. Efeito da NAC, tiron, GBR 12909 e BSO na neurotoxicidade induzida pela MDMA e metabolitos nas células SH-SY5Y

A adição de NAC (1 mM), tiron (100 μ M) e GBR 12909 (1 μ M) 30 minutos antes da adição de MDMA (400 μ M) por um período de 48 h, às culturas celulares neuronais, não previne a neurotoxicidade induzida pela MDMA (Figura 7). O tratamento com o GBR 12909 (1 μ M), por si só, afecta a viabilidade celular de uma forma significativa, provocando a sua diminuição em cerca de 10 %.

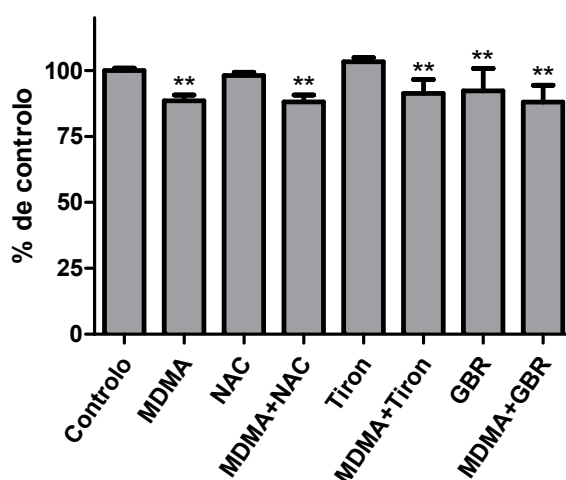


Figura 7. Efeito do pré-tratamento com NAC (1 mM), tiron (100 μ M) e GBR 12909 (1 μ M) na neurotoxicidade induzida pela MDMA, avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT. As células SH-SY5Y foram incubadas com MDMA na concentração de 400 μ M durante 48 h. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=18 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$ tratamento versus controlo).

O pré-tratamento das culturas celulares com tiron (100 μ M) e GBR 12909 (1 μ M), 30 minutos antes da exposição das células aos metabolitos, por um período de 48 h, não confere protecção significativa contra a neurotoxicidade induzida por 400 μ M de α -MeDA (Figura 8A) e por 400 μ M de N-Me- α -MeDA (Figura 8B).

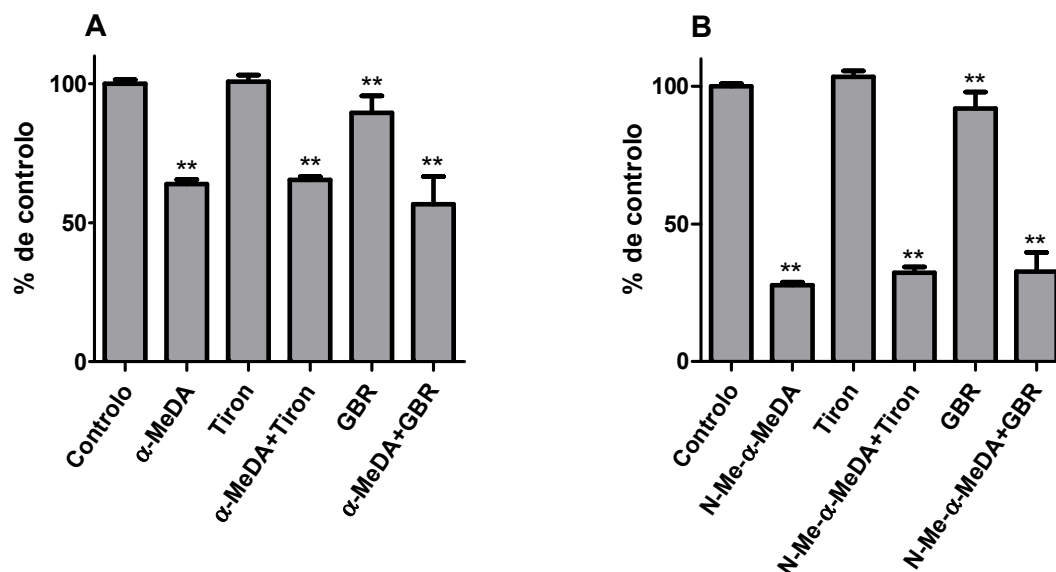


Figura 8. Efeito do pré-tratamento com tiron (100 μ M) e GBR 12909 (1 μ M) na neurotoxicidade induzida pela α -MeDA (400 μ M) (A) e pela N-Me- α -MeDA (400 μ M) (B), avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT, após um período de incubação de 48 h com os metabolitos. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=18 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p < 0,01$ tratamento versus controlo).

A adição de NAC (1 mM), 30 minutos antes da exposição das culturas celulares à α -MeDA (400 μ M), por um período de 48 h, previne em grande medida a neurotoxicidade promovida por este metabolito da MDMA (Figura 9). O tratamento apenas com NAC (1 mM) ou BSO (25 μ M) não altera a viabilidade celular (Figura 9). O tratamento das culturas celulares com BSO 30 minutos antes da adição da α -MeDA, pelo período de 48 h, não altera de forma significativa a viabilidade celular em relação à adição de α -MeDA sozinha (Figura 9). No entanto, o pré-tratamento das culturas celulares com BSO, impede a prevenção conferida pela NAC na neurotoxicidade induzida pela exposição durante 48 h a 400 μ M de α -MeDA, avaliada pelo teste de metabolização do MTT (Figura 9).

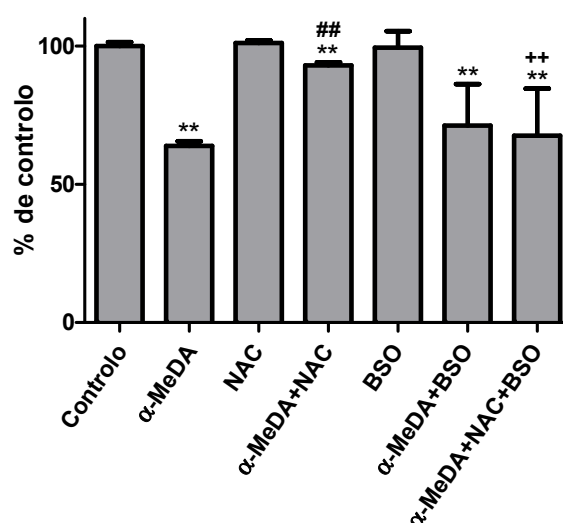


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com 1 mM de NAC e com 25 μ M de BSO na neurotoxicidade induzida por 400 μ M de α -MeDA, avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT, após um período de incubação das culturas celulares de 48 h. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % ($n=18$ de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p<0,01$ tratamento versus controlo; ## $p<0,01$ α -MeDA + NAC versus α -MeDA; ++ α -MeDA + NAC + BSO versus α -MeDA + NAC).

O pré-tratamento das culturas celulares com NAC (1 mM), 30 minutos antes da adição de N-Me- α -MeDA (400 μ M), por um período de 48 h, protege quase na totalidade contra a neurotoxicidade induzida por este metabolito, conforme avaliado pelo teste de viabilidade celular MTT (Figura 10). Pelo contrário, a adição de BSO (25 μ M) 30 minutos antes da adição de N-Me- α -MeDA, pelo período de 48 h, diminui significativamente a viabilidade das células em relação às células tratadas apenas com N-Me- α -MeDA (Figura 10). O pré-tratamento das culturas celulares com BSO diminui significativamente a protecção conferida pela NAC na neurotoxicidade induzida pela exposição durante 48 h a 400 μ M de N-Me- α -MeDA (Figura 10).

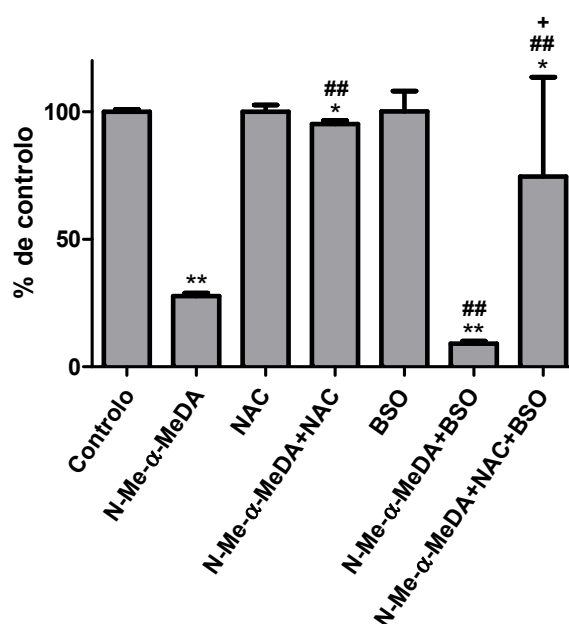


Figura 10. Efeito do pré-tratamento com 1 mM de NAC e com 25 μ M de BSO na neurotoxicidade induzida por 400 μ M de N-Me- α -MeDA, avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT, após um período de incubação das culturas celulares de 48 h. Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % ($n=18$ de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos, pelo teste de Student-Newman-Keuls, foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ tratamento versus controlo; ## $p<0,01$ N-Me- α -MeDA + NAC, N-Me- α -MeDA + BSO e N-Me- α -MeDA + NAC + BSO versus N-Me- α -MeDA; + $p<0,05$ N-Me- α -MeDA + NAC + BSO versus N-Me- α -MeDA + NAC).

A observação microscópica das células SH-SY5Y obtidas ao microscópio invertido binocular com contraste de fase, demonstra que o tipo de morte celular após a administração dos metabolitos da MDMA, α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M) por um período de 24 h, apresenta uma morfologia típica da morte por apoptose: desintegração das dendrites, fragmentação do núcleo, perda da integridade da membrana, encolhimento do citoplasma e processos neuríticos (Figura 11E e G). O pré-tratamento com NAC (1 mM) previne em larga medida estes efeitos tóxicos a nível morfológico (Figura 11F e H).

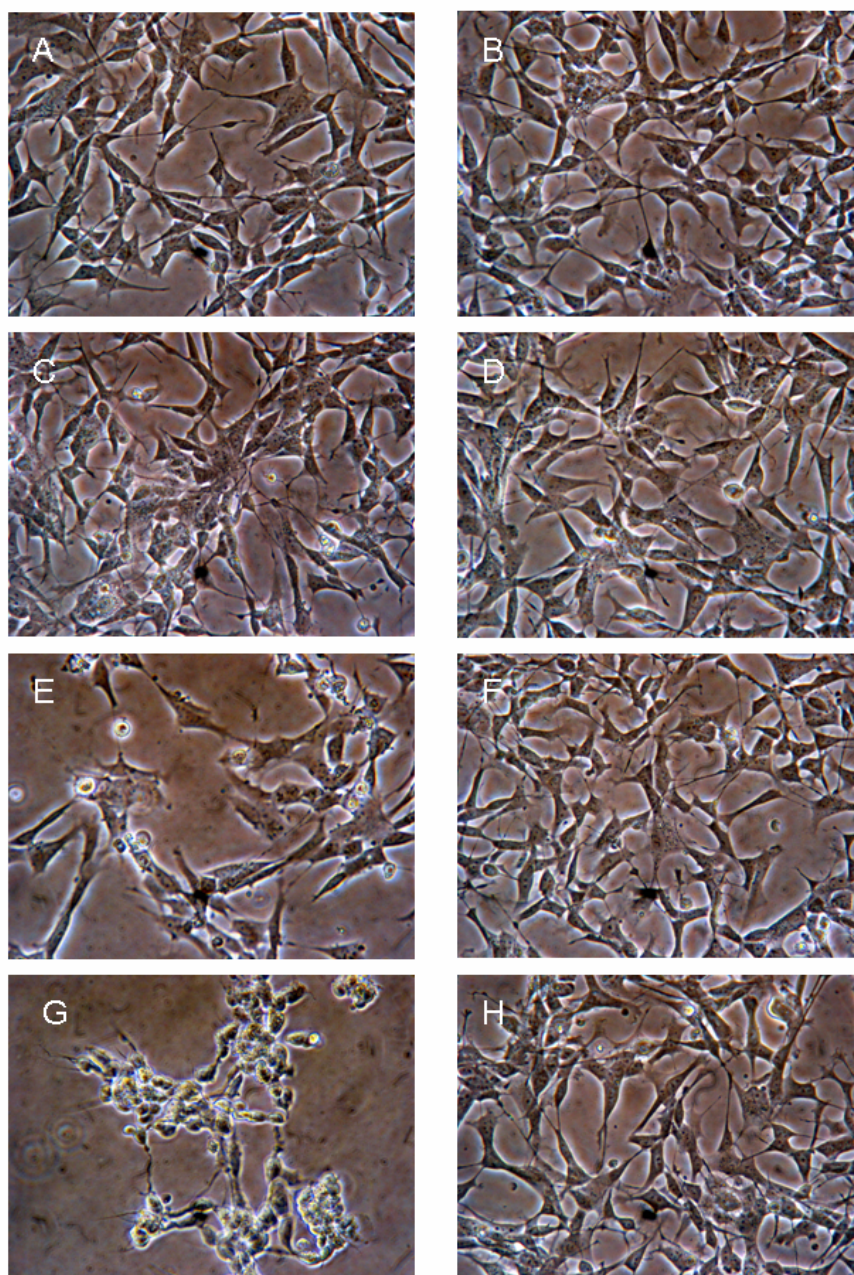


Figura 11. Fotografias das células SH-SY5Y obtidas ao microscópio invertido com contraste de fase (ampliação 400X) após 24 h de exposição: controlo (A), NAC (1 mM) (B), MDMA (400 μ M) (C), MDMA (400 μ M) + NAC (1 mM) (D), α -MeDA (400 μ M) (E), α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM) (F), N-Me- α -MeDA (400 μ M) (G), N-Me- α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM) (H).

3.3. Avaliação da fragmentação do DNA e da activação da caspase 3 em células SH-SY5Y expostas à MDMA e aos seus metabolitos

A fragmentação internucleossomal do DNA foi avaliada recorrendo ao kit de detecção da Roche “Cell death kit” de forma a estabelecer o mecanismo de morte celular apoptótico. Observa-se um ligeiro aumento da fragmentação internucleossomal do DNA nas culturas celulares com a adição de MDMA (400 μ M) e α -MeDA (400 μ M) durante um período de 48 h (Figura 12). Nas culturas celulares expostas à N-Me- α -MeDA (400 μ M) este aumento é mais acentuado (Figura 12). É possível também verificar que a fragmentação internucleossomal do DNA induzida pelos metabolitos é abolida na presença da NAC (1 mM) (Figura 12). No entanto, estes resultados não são estatisticamente significativos uma vez que o número de amostras testadas corresponde a um n de 3. Foi também avaliada a fragmentação do DNA pela técnica de migração em gel de electroforese marcada com brometo de etídio, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados e controlo.

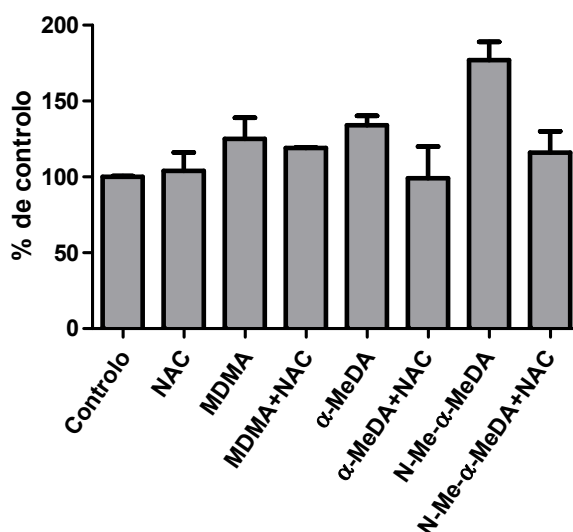


Figura 12. Fragmentação internucleossomal do DNA nas culturas celulares 48 h após a adição de NAC (1 mM), MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M), N-Me- α -MeDA (400 μ M), MDMA (400 μ M) + NAC (1 mM), α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM), N-Me- α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM). Os dados são apresentados como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 %. Médias obtidas com uma experiência representativa com n=3.

Para verificar se a morte neuronal envolveu a activação da caspase 3, foi medida a actividade da caspase 3 após a exposição das culturas celulares à MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M) (Figura 13). Foi também avaliada a actividade da caspase 3 após o pré-tratamento das células com NAC (1 mM) seguido da incubação

das culturas celulares com MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA (Figura 13). Para todas as condições o período de incubação foi de 48 h. As comparações entre grupos mostram que não existem diferenças estatisticamente significativas na actividade da caspase 3 entre os grupos tratados e o grupo controlo.

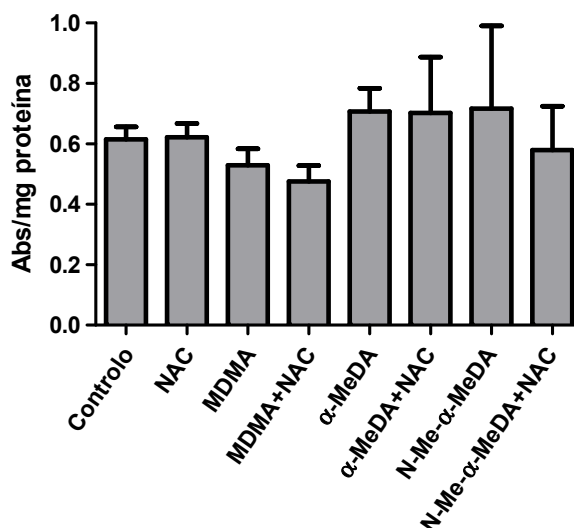


Figura 13. Actividade da caspase 3 nas culturas celulares 48 h após a incubação das células SH-SY5Y com NAC (1 mM), MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M), N-Me- α -MeDA (400 μ M), MDMA (400 μ M) + NAC (1 mM), α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM), N-Me- α -MeDA (400 μ M) + NAC (1 mM). Os dados são apresentados como absorvância (Abs) em função do conteúdo proteico ($n=6$ de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

3.4. Determinação da GSH

O estado redox das células foi avaliado através da medida dos níveis de GSH intracelular. Foi testada a capacidade da MDMA (400 μ M) e dos seus metabolitos α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M) interferirem com os níveis de GSH neuronal. O efeito neuroprotector de 1 mM de NAC nos níveis de GSH neuronal foi também avaliado. Inicialmente foram avaliados os níveis de GSH intracelular após um tratamento de 24 h com os compostos. Juntamente com a determinação da GSH intracelular foram avaliados os níveis proteicos das culturas celulares.

O conteúdo proteico das células é vulgarmente usado para determinar o material celular total. Para o metabolito que demonstrou ser mais tóxico nos testes da viabilidade celular, N-Me- α -MeDA, na concentração de 400 μ M observa-se uma redução do conteúdo proteico para cerca de 25 % do valor do controlo (Figura 14A). O pré-

tratamento com NAC (1 mM) previne este efeito da N-Me- α -MeDA no conteúdo proteico pelo período de exposição de 24 h (Figura 14A). A adição de MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M) ou dos restantes tratamentos não altera de forma significativa o conteúdo proteico das células contidas nos poços das placas de 6 poços (Figura 14A).

Os níveis de GSH intracelular foram normalizados ao conteúdo proteico recolhido em cada experiência (Figura 14B). Neste gráfico observa-se um aumento significativo dos níveis de GSH intracelular após a adição de NAC (1 mM) e de α -MeDA (400 μ M) às culturas celulares por um período de 24 h (Figura 14B). A exposição das culturas celulares, durante o mesmo período de tempo, à MDMA (400 μ M), MDMA + NAC, N-Me- α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA + NAC, não induz uma alteração significativa nos níveis de GSH intracelular relativamente ao controlo (Figura 14B). Pelo contrário, a incubação das culturas celulares, durante 24 h, com α -MeDA juntamente com NAC, conduz a uma depleção significativa dos níveis intracelulares de GSH (Figura 14B).

Apesar de avaliados, os níveis intracelulares de GSSG nas células manteve-se abaixo do limite de detecção do método, tanto às 24 h como às 48 h de exposição das células aos diversos tratamentos (dados não apresentados).

Foi também feita a avaliação do conteúdo de GSH após 48 h de tratamento. A exposição das culturas celulares à MDMA na concentração de 400 μ M por um período de 48 h, não causa alterações significativas nos níveis de GSH intracelular nem na quantidade de proteínas (dados não apresentados).

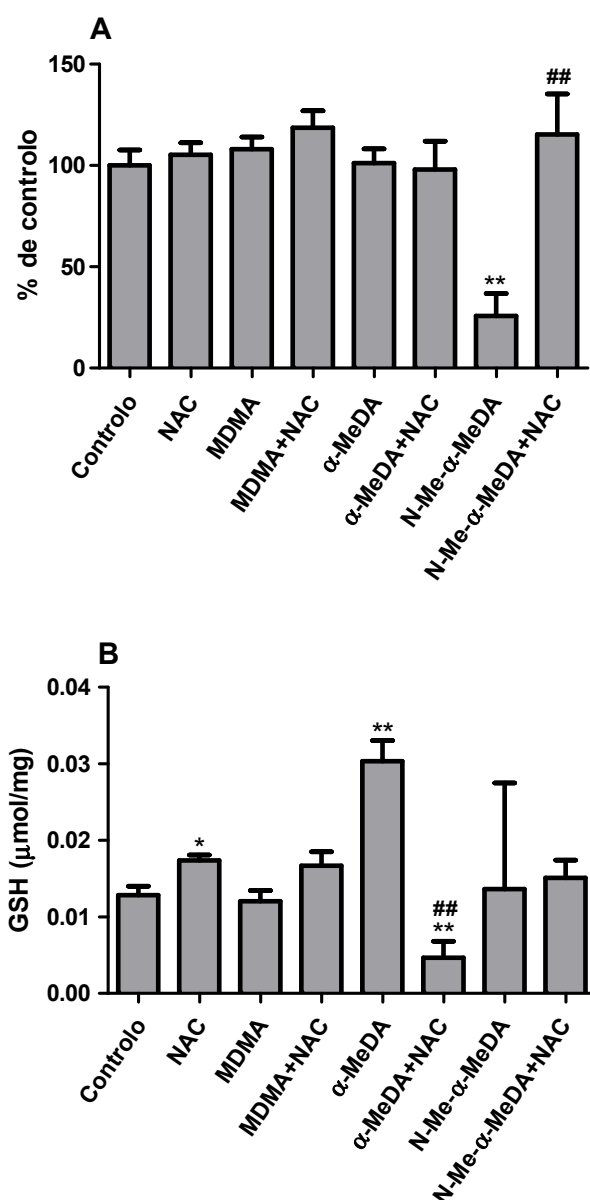


Figura 14. Efeito da exposição das células SH-SY5Y, por um período de 24 h, com MDMA (400 μM), α-MeDA (400 μM), N-Me-α-MeDA (400 μM) e do pré-tratamento com NAC (1 mM): na quantidade total de proteína apresentada como percentagem do controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (A) e nos níveis de GSH intracelular apresentado em μmol/mg de proteína (B) (n=9 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ tratamento versus controlo; ## $p < 0,01$ metabolito + NAC versus metabolito).

O conteúdo proteico das células foi determinado após exposição das culturas celulares à α-MeDA (400 μM), N-Me-α-MeDA (400 μM), assim como com outros agentes farmacológicos por um período de 48 h (Figura 15). A adição de α-MeDA às culturas celulares promove uma redução significativa do conteúdo proteico (Figura 15A). O tratamento apenas com NAC (1 mM) não altera o conteúdo proteico em relação ao

controlo. A BSO (25 μ M), por si só, também não altera o conteúdo proteico, mas a adição de BSO antes da α -MeDA produz uma redução no conteúdo proteico (Figura 15A). O tratamento prévio com BSO juntamente com NAC seguido do metabolito α -MeDA, reduz de forma significativa os níveis de proteína. O tratamento prévio com NAC seguido da exposição das células a 400 μ M de α -MeDA previne de forma total a perda proteica conferida pela exposição apenas à α -MeDA (Figura 15A).

A adição de N-Me- α -MeDA (400 μ M) às culturas celulares reduz drasticamente o valor da proteína, o mesmo acontecendo quando se faz o pré-tratamento com BSO (25 μ M) seguido do metabolito (Figura 15B). A adição de NAC (1 mM) 30 minutos antes da adição de N-Me- α -MeDA mantém o nível proteico semelhante ao da condição controlo (Figura 15B).

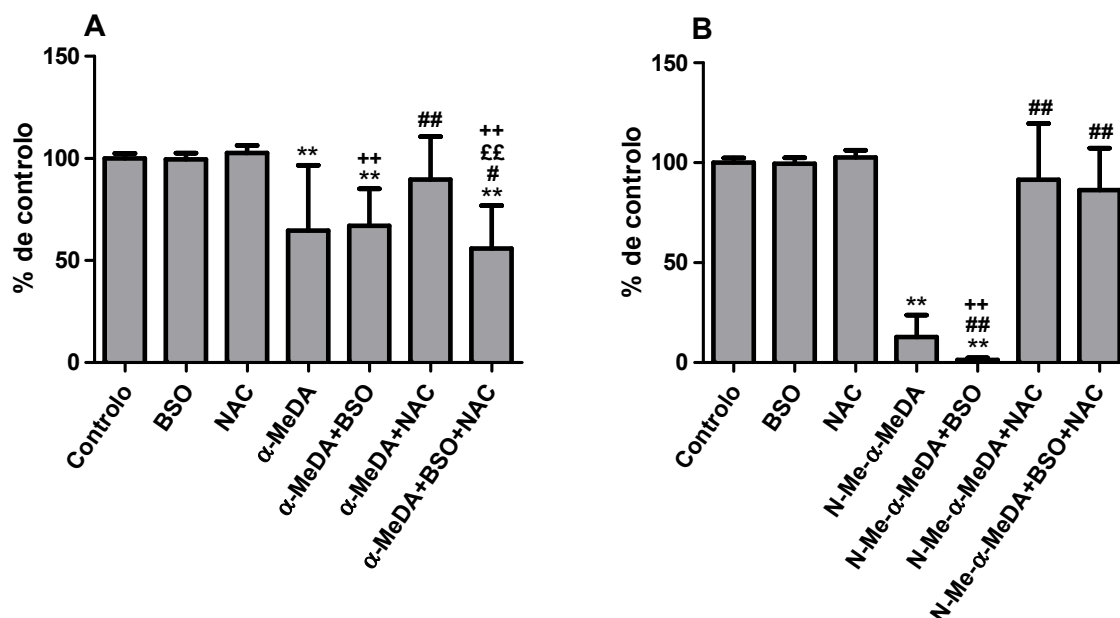


Figura 15. Determinação do conteúdo proteico nas culturas celulares expostas à α -MeDA (400 μ M) (A) e à N-Me- α -MeDA (400 μ M) (B), assim como com os agentes farmacológicos NAC (1 mM) e BSO (25 μ M), por um período de 48 h. O conteúdo em proteína total é apresentado como percentagem de controlo, ao qual foi atribuído o valor de 100 % (n=9 de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (** $p<0,01$ tratamento versus controlo; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + NAC, metabolito + BSO + NAC versus metabolito; ££ $p<0,01$ metabolito + BSO + NAC versus metabolito + NAC; ++ $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + BSO + NAC versus BSO).

Em relação aos níveis de GSH intracelular observa-se um aumento estatisticamente significativo com a adição de α -MeDA (400 μ M) às células SH-SY5Y, comparativamente ao controlo (Figura 16A). Pelo contrário, o pré-tratamento com NAC (1

mM) antes da adição do metabolito não altera os níveis de GSH em relação ao controlo (Figura 16A). A adição de BSO (25 μ M) às culturas celulares expostas à α -MeDA diminui os níveis de GSH relativamente ao controlo e à exposição das células apenas a α -MeDA (Figura 16A). O tratamento concomitante com BSO e NAC antes da adição do metabolito reduz os níveis de GSH intracelular comparativamente ao tratamento do metabolito com NAC (Figura 16A).

A adição de N-Me- α -MeDA na concentração de 400 μ M às células SH-SY5Y após 48 h de exposição, aumenta os níveis de GSH intracelular comparativamente ao controlo (Figura 16B). Com o pré-tratamento com NAC (1 mM) antes da adição do metabolito, o nível de GSH também aumenta em relação ao controlo (Figura 16B). Da mesma forma, o pré-tratamento com BSO (25 μ M) aumenta os níveis de GSH relativamente ao controlo (Figura 16B). O tratamento concomitante com BSO e NAC antes da adição do metabolito reduz os níveis de GSH intracelular comparativamente ao tratamento do metabolito com NAC (Figura 16B).

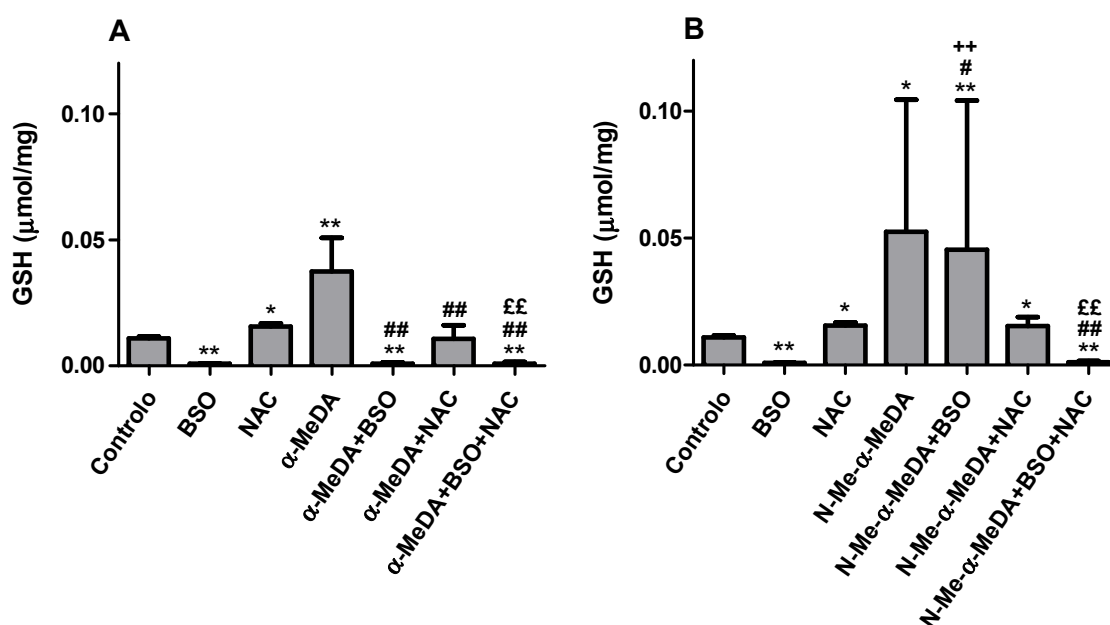


Figura 16. Efeito nos níveis de GSH intracelular da exposição das culturas celulares à α -MeDA (400 μ M) (A) e N-Me- α -MeDA (400 μ M) (B), assim como com os agentes farmacológicos NAC (1 mM) e BSO (25 μ M), por um período de 48 h. O conteúdo em GSH intracelular é apresentado em μ mol/mg de proteína ($n=8$ de 3 experiências independentes). As comparações entre grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls foram efectuadas após o teste de Kruskal-Wallis (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ tratamento versus controlo; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + NAC, metabolito + BSO + NAC versus metabolito; ££ $p<0,01$ metabolito + BSO + NAC versus metabolito + NAC; ** $p<0,01$ metabolito + BSO, metabolito + BSO + NAC versus BSO).

CAPÍTULO III

Discussão e Conclusões

1. DISCUSSÃO

O primeiro estudo publicado acerca da neurotoxicidade da MDMA demonstrou que esta é tóxica para os terminais nervosos serotoninérgicos do cérebro de ratos (116). Foi sugerido que o dano nos neurónios serotoninérgicos era selectivo e que os terminais nervosos de outros neurotransmissores não eram afectados (285). Consequentemente, a atenção da maioria dos investigadores tem recaído nos efeitos agudos e a longo prazo da MDMA na função serotoninérgica. No entanto, tem sido verificado que a administração da MDMA promove alterações agudas na libertação de 5-HT e de DA no tecido cerebral e foi já demonstrada a sua neurotoxicidade nos neurónios dopaminérgicos no cérebro de ratinhos (35). Além disso, a MDMA promove dano de outros sistemas cerebrais e outros tipos de células, como corticais (145, 146) ou da retina (147).

No estudo realizado no âmbito desta dissertação de mestrado, foi avaliado o potencial neurotóxico da MDMA e dos seus metabolitos, α -MeDA e N-Me- α -MeDA nas células dopaminérgicas SH-SY5Y de um neuroblastoma humano, após um período de incubação de 24 e 48 h. Neste estudo demonstra-se que a α -MeDA e a N-Me- α -MeDA são neurotóxicas para estas células e que a neurotoxicidade aumenta com o tempo de exposição. Também se observa que a neurotoxicidade promovida pelos metabolitos é dependente da concentração usada. A neurotoxicidade do metabolito N-Me- α -MeDA nas células SH-SY5Y é maior do que a neurotoxicidade induzida pelo α -MeDA. A N-Me- α -MeDA apresenta características mais lipofílicas do que a α -MeDA, dada a presença do grupo metilo na amina da cadeia lateral, o que pode justificar a sua maior toxicidade. O facto de ser um composto mais lipofílico permite-lhe atravessar mais facilmente a membrana celular e desta forma exercer a sua neurotoxicidade no interior da célula. Apesar de não ser tão pronunciada, observa-se que a MDMA também é neurotóxica para as células SH-SY5Y. Comprova-se assim que os metabolitos catecóis da MDMA são mais tóxicos que a própria MDMA.

O potencial neurotóxico da MDMA e dos seus metabolitos, α -MeDA e N-Me- α -MeDA, foi já demonstrado em alguns estudos. Foram realizados dois estudos em que se usaram culturas neuronais de ratos para avaliar a neurotoxicidade promovida pela MDMA e pelos seus metabolitos (α -MeDA, N-Me- α -MeDA e metabolitos tioéter da MDMA) (211, 212). Nestes estudos demonstrou-se que a MDMA e os seus metabolitos induzem neurotoxicidade em culturas de neurónios corticais de rato e que a morte neuronal segue uma via apoptótica. A neurotoxicidade observada foi dependente do tempo, da concentração e da temperatura de exposição. Ficou também demonstrado que os metabolitos eram mais neurotóxicos do que a MDMA.

A α -MeDA e a N-Me- α -MeDA são importantes metabolitos resultantes do metabolismo hepático (206). A importância do estudo da neurotoxicidade destes metabolitos da MDMA baseia-se no facto da principal via metabólica da MDMA em humanos incluir a formação do catecol N-Me- α -MeDA, havendo também formação em menor percentagem do catecol α -MeDA (50). Carvalho e colaboradores demonstraram, *in vitro*, que as concentrações de α -MeDA e de N-Me- α -MeDA diminuem, com o passar do tempo, nos meios biológicos, devido à sua oxidação aos correspondentes aminocromos e à conjugação com a GSH (286, 287). Os intermediários reactivos produzidos durante a oxidação destas catecolaminas em *orto*-quinonas reactivas e/ou aminocromos, podem ser conjugados com a GSH e formar os correspondentes aductos glutathionil. Os aminocromos podem ainda ser oxidados, o que conduz à formação de um polímero do tipo melanina (288). De facto, o meio neuronal das células SH-SY5Y após a incubação com α -MeDA e N-Me- α -MeDA, apresenta uma cor preta/acastanhada, característica da presença destes polímeros.

Foi realizado, neste trabalho, o pré-tratamento das culturas celulares com três compostos, de forma a avaliar o seu potencial efeito neuroprotector: tiron (100 μ M), GBR 12909 (1 μ M) e NAC (1 mM).

O tiron é um análogo da vitamina E, reconhecido por ser uma substância antioxidante capaz de inibir a apoptose induzida por ROS (289). O tiron é um sequestrador de ROS, que capta principalmente o $O_2^{\bullet-}$ (289). Uma vez que o tiron reage com espécies intracelulares potencialmente tóxicas, foi avaliado o seu efeito protector nas células SH-SY5Y sujeitas a stresse oxidativo devido à adição de MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M). O pré-tratamento das culturas celulares com tiron, 30 minutos antes da adição da MDMA e dos seus metabolitos por um período de 48 h, não resultou em protecção contra a neurotoxicidade. Devido à afinidade do tiron para o $O_2^{\bullet-}$, a neurotoxicidade observada nas culturas celulares após a adição dos compostos pode ser devida à presença de outras espécies reactivas, para além da referida inicialmente.

Como já foi referido neste texto, a linha celular SH-SY5Y exhibe propriedades neuronais e um fenótipo catecolaminérgico que inclui o DAT. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o pré-tratamento com o GBR 12909, um inibidor selectivo e específico do DAT, não resulta em protecção contra a toxicidade da MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA, nas células SH-SY5Y expostas por um período de 48 h. Estes resultados indicam que, tal como a MDMA, os seus metabolitos poderão entrar nas células por difusão, em detrimento do DAT. Este facto pode também explicar a maior toxicidade da N-Me- α -MeDA em relação à α -MeDA. A N-Me- α -MeDA possui um grupo amina secundária, o que aumenta a sua lipofilia, o que por sua vez explicaria a maior facilidade

em entrar na célula por difusão e exercer os seus efeitos tóxicos a nível intracelular. Além deste facto, as células SH-SY5Y podem possuir NET, dado o seu fenótipo catecolaminérgico e isso levar à entrada destes compostos por este transportador. A administração de GBR 12909 (1 μ M) às culturas celulares, diminui a viabilidade das células em relação ao controlo. Esta toxicidade para as células SH-SY5Y do GBR 12909 pode estar relacionada com o impedimento da reentrada de DA na célula. Ao inibir o DAT, o GBR 12909 promove a acumulação de DA no exterior. A DA sendo um catecol pode entrar em auto-oxidação e gerar radicais livres, os quais podem danificar as células (239).

Os resultados obtidos com o GBR 12909 estão de acordo com um estudo realizado no estriado de ratinhos usando a microdiálise *in vivo* (155). Este estudo pretendia determinar o efeito do GBR 12909 na libertação de DA induzida pela MDMA. O facto do pré-tratamento com o GBR 12909 não reduzir o aumento da concentração extracelular de DA induzida pela MDMA, sugere que a libertação observada não ocorre através do DAT, como resultado da entrada de MDMA no terminal nervoso via sistema de recaptção de DA. Os resultados deste estudo indicam que o GBR 12909 não previne a entrada de MDMA no terminal nervoso, o que suporta a ideia de que a MDMA provavelmente penetra por difusão passiva, como havia sido anteriormente sugerido (40).

A NAC é habitualmente usada na clínica como agente mucolítico na doença respiratória e também no tratamento da intoxicação com paracetamol, como precursor da síntese de GSH nos hepatócitos (1). A NAC tem propriedades antioxidantes e pode actuar como dador de cisteína. Funcionando como dador de cisteína, a NAC mantém o nível intracelular de GSH e tem um efeito neuroprotector para uma grande variedade de células neuronais (1). Neste trabalho experimental observou-se que o pré-tratamento com NAC na concentração de 1 mM, protege as células do dano neuronal induzido pela incubação das células SH-SY5Y durante 48 h com α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M). O pré-tratamento com o antioxidante e precursor da síntese de GSH, NAC (1 mM), previne o dano neuronal induzido pelas metabolitos catecólicos da MDMA, provavelmente captando espécies reactivas e aumentando os níveis de GSH intracelular nos neurónios. Além deste facto, observa-se que o pré-tratamento com NAC previne a formação da cor preta/acastanhada no meio neuronal, o que indica que previne a formação dos polímeros de melanina (212).

O stresse oxidativo ocorre como consequência da alteração no equilíbrio entre a produção de ROS e os processos antioxidantes, a favor da produção de ROS. De forma a evitar os danos promovidos pelas ROS, tais como peroxidação lipídica, modificação de proteínas e dano no DNA, existem mecanismos que removem as ROS ou previnem a sua formação (290). O stresse oxidativo gerado pelas ROS parece estar relacionado com a

perda de neurónios observada durante a progressão de doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Parkinson (290). A GSH desempenha um papel importante na destoxificação de ROS no cérebro. A deficiência em GSH induzida em ratos recém-nascidos através da aplicação de BSO, um inibidor da enzima limitante na síntese de GSH, conduz a danos mitocondriais no cérebro (291). Além disso, a redução da GSH cerebral promovida pela BSO aumenta os efeitos tóxicos dos danos associados com o aumento da produção de ROS (290). A α -MeDA e a N-Me- α -MeDA são catecóis que podem ser oxidados às correspondentes *orto*-quinonas. A oxidação dos metabolitos catecólicos da MDMA resulta na formação de aminocromos e de aductos com a GSH e/ou NAC (61). A reactividade dos compostos formados (quinonas, semiquinonas, aminocromos e tioéteres) e o seu envolvimento no ciclo redox levando à formação de ROS e RNS (210) com capacidade de produzir fenómenos de stresse oxidativo, levam ao esgotamento das defesas antioxidantes intracelulares. O stresse oxidativo gerado é um mecanismo provável para a ocorrência de toxicidade celular.

O pré-tratamento das culturas celulares com NAC (1 mM), expostas por um período de 48 h à MDMA (400 μ M), não protege contra a perda de viabilidade celular. Após tratamento das culturas celulares com MDMA (400 μ M) durante 24 e 48 h, não se observa alteração da GSH intracelular. Da mesma forma, o pré-tratamento com NAC (1 mM) antes da adição de 400 μ M de MDMA não altera o nível de GSH intracelular. O facto da adição de NAC não proteger contra a toxicidade induzida pela MDMA indica que outros mecanismos poderão estar envolvidos na neurotoxicidade da MDMA nas células dopaminérgicas. Uma provável explicação é o agonismo da MDMA nos receptores 5-HT_{2A}. Capela e colaboradores demonstraram que a estimulação directa do receptor 5-HT_{2A} em culturas neuronais provenientes do córtex do rato pela MDMA conduz à apoptose neuronal, acompanhada da activação da caspase 3 (145, 146).

Surpreendentemente, a adição de α -MeDA (400 μ M) por um período de 24 ou 48 h às culturas celulares promove um aumento dos níveis de GSH intracelular comparativamente com o controlo. Neste trabalho observa-se que o metabolito principal da MDMA em humanos, a N-Me- α -MeDA apresenta maior potencial neurotóxico para as células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y. Após 24 h de exposição das culturas celulares à N-Me- α -MeDA (400 μ M) não há alteração significativa dos níveis de GSH intracelular. No entanto, após 48 h de exposição ocorre um aumento significativo relativamente aos níveis do controlo. Estes dados podem indicar que após a morte inicial de uma porção substancial de células, as células sobreviventes aumentam o seu conteúdo em GSH, como resposta ao aumento de stresse oxidativo. Este mecanismo protector das células SH-SY5Y já foi observado noutros estudos. No estudo elaborado por Aguirre e colaboradores, demonstrou-se que nas células SH-SY5Y expostas ao ferro,

ocorre a activação da síntese de GSH (292). Os autores sugerem que o aumento da síntese de GSH com o tempo corresponde a uma resposta adaptativa contra o aumento de ferro na célula. Nesta resposta adaptativa ao stresse oxidativo, as células aumentam o seu conteúdo em GSH activando a síntese *de novo* de GSH. A enzima limitante na síntese de GSH é a γ -glutamylcisteína (γ -GluCis) sintetase, um heterodímero composto por uma subunidade catalítica e por uma subunidade alostérica, codificadas por diferentes genes (292). Os autores verificaram que há aumento da expressão proteica destas subunidades após a adição de ferro às células SH-SY5Y, o que corresponde a uma resposta das células SH-SY5Y ao stresse oxidativo (292). Estes resultados são consistentes com a estratégia das células dopaminérgicas estabilizarem o stresse oxidativo através do aumento da síntese de GSH (293).

Para verificar o envolvimento da γ -GluCis sintetase nas células SH-SY5Y, foi testado o papel do inibidor desta enzima (BSO) nos níveis de GSH e na viabilidade celular, após exposição aos metabolitos da MDMA.

A adição de BSO diminui os níveis de GSH intracelular, havendo portanto uma diminuição das defesas antioxidantes, sem alterar a viabilidade celular. Na presença dos metabolitos da MDMA e da BSO as defesas antioxidantes das células vão ser ainda mais reduzidas. A adição de BSO (25 μ M) às culturas celulares, antes da exposição durante 48 h, à α -MeDA (400 μ M), não altera a viabilidade celular no teste do MTT, mas diminui o nível de GSH intracelular relativamente à exposição apenas com α -MeDA. Por outro lado, é possível verificar que a adição de BSO às culturas celulares também anula a protecção conferida pela NAC contra a neurotoxicidade deste metabolito. Em relação à exposição apenas ao metabolito N-Me- α -MeDA, observa-se que a adição prévia de BSO (25 μ M) diminui ainda mais a viabilidade das células expostas à N-Me- α -MeDA na concentração de 400 μ M, assim como também diminui a protecção conferida pela NAC. Neste caso, a inibição da γ -GluCis sintetase pela BSO aumenta de uma forma estatisticamente significativa a toxicidade da N-Me- α -MeDA. A adição de BSO às culturas celulares aumenta o stresse oxidativo e potencia a morte celular após a exposição ao metabolito N-Me- α -MeDA. No entanto, observa-se que nas poucas células remanescentes após a exposição conjunta a BSO e N-Me- α -MeDA, o conteúdo em GSH está aumentado em relação ao controlo, o que significa que, provavelmente, houve indução da síntese de nova enzima tal como foi verificado no estudo de Aguirre e colaboradores (292).

Estes factos ajudam a explicar o mecanismo de protecção da NAC. A neuroprotecção conferida pela NAC deve-se, pelo menos em parte, ao facto de esta ser um dador de cisteína e promover a síntese de GSH. Concordando com este facto, nas culturas celulares tratadas apenas com a NAC (1 mM) durante 24 ou 48 h, regista-se um aumento dos níveis de GSH em relação ao controlo, sem que haja alteração da

viabilidade celular e da quantidade de proteína. Podemos então prever que, nas culturas celulares expostas por um período de 24 ou 48 h à α -MeDA (400 μ M) e à N-Me- α -MeDA (400 μ M), após a perda de viabilidade de algumas células, as células remanescentes aumentam a capacidade de se protegerem contra o dano neurotóxico promovido pela adição dos metabolitos, aumentando a síntese *de novo* de GSH. Na presença de substâncias protectoras e antioxidantes como a NAC, é possível que o insulto pró-oxidante conferido pela presença dos metabolitos não seja tão elevado e não se verifique a indução da síntese de nova enzima e de mais GSH. Talvez seja este o mecanismo pelo qual o nível de GSH intracelular seja inferior aquando da exposição ao metabolito juntamente com a NAC.

Estes resultados estão de acordo com estudos em que se observa a existência de substâncias capazes de aumentar os níveis de GSH e a actividade da enzima γ -GluCis sintetase (294, 295). A adição de curcumina (polifenol), quercetina (flavonóide) e tert-butilhidroquinona a culturas primárias de astrócitos corticais de ratinho, promove o aumento dos níveis de GSH e da actividade da γ -GluCis sintetase. O mesmo efeito foi observado em culturas primárias de neurónios corticais de ratinhos após a adição de curcumina (295). Foi observado *in vivo*, que o NO induz o aumento da síntese de GSH nas células do tecido adiposo castanho de ratos (294). Nesse estudo, demonstra-se que o NO promove a síntese de GSH através da indução da expressão da γ -GluCis sintetase.

Apesar de avaliados, os níveis intracelulares de GSSG nas células manteve-se abaixo do limite de detecção do método, tanto às 24 h como às 48 h de exposição aos diversos tratamentos. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Aguirre e colaboradores nas células SH-SY5Y expostas ao ferro (292). Os autores concluem que a manutenção de GSSG a níveis basais é dependente da actividade da GSSG redutase e da proteína de multirresistência a fármacos 1, a qual promove a extrusão de GSSG das células.

Estudos recentes revelam que a morte celular induzida pela MDMA em culturas de neurónios corticais de ratos é acompanhada pela activação de vias apoptóticas neuronais, nomeadamente pelo aumento da actividade da caspase 3 (146). Num outro estudo foi observado que a neurotoxicidade em culturas de neurónios corticais de ratos, induzida pela α -MeDA e pela N-Me- α -MeDA é típica da morte celular por apoptose (212). Neste trabalho, as fotografias das células SH-SY5Y, obtidas ao microscópio óptico após um período de exposição de 24 h à MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M) demonstram que a morte celular ocorre com uma morfologia típica da morte celular por apoptose. A fragmentação do DNA internucleossomal é característica das vias apoptóticas. Neste trabalho foi realizada uma experiência representativa com o objectivo de verificar a existência da fragmentação do DNA nas culturas celulares expostas 48 h à

MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M). Apesar dos resultados não apresentarem significado estatístico devido ao reduzido número de amostras testadas, é possível observar que existe um aumento da fragmentação internucleossomal do DNA, sendo este efeito mais acentuado para o metabolito mais neurotóxico (N-Me- α -MeDA). Este efeito é revertido na presença da NAC (1 mM), o que pode servir de indicativo do papel protector deste composto na morte das células SH-SY5Y, induzida pelos metabolitos da MDMA. Com o objectivo de saber se a morte das células SH-SY5Y segue uma via apoptótica acompanhada pela activação da caspase 3, foi determinada a actividade da caspase 3 nas culturas expostas por um período de 48 h à MDMA (400 μ M), α -MeDA (400 μ M) e N-Me- α -MeDA (400 μ M). Os dados obtidos com esta experiência indicam que a via apoptótica não é acompanhada pela activação da caspase 3, pelo que a activação das caspases parece não estar envolvida neste processo de morte celular.

2. CONCLUSÕES

A partir da década de 80 o consumo de “ecstasy” generalizou-se entre os jovens como droga de abuso, pelo que se tornou um grave problema de saúde pública. Determinar como e em que circunstâncias o consumo de MDMA pode conduzir a alterações crónicas no cérebro humano assume particular importância para o conhecimento e tratamento clínico. Existem evidências que demonstram que a administração de uma ou mais doses de MDMA a animais de experiência, promove disfunções agudas em ratos e ratinhos em diversos sistemas neuronais incluindo o dopaminérgico. O objectivo da presente dissertação foi determinar a existência de neurotoxicidade em células humanas dopaminérgicas, após a exposição à MDMA e aos seus metabolitos catecólicos. Com os resultados obtidos podemos concluir que:

- A exposição à MDMA e aos seus metabolitos, α -MeDA e N-Me- α -MeDA, promove neurotoxicidade nas células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y, de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição;
- Os metabolitos da MDMA são mais neurotóxicos para as células dopaminérgicas do que a própria MDMA. Nomeadamente, o metabolito N-Me- α -MeDA, promove uma acentuada neurotoxicidade nas células dopaminérgicas humanas. Estes resultados são relevantes para a extrapolação para os humanos, uma vez que a N-Me- α -MeDA é o principal metabolito humano da MDMA;
- A neurotoxicidade dos metabolitos catecólicos da MDMA é dependente da formação de ROS/RNS e de produtos da oxidação. O pré-tratamento com NAC protege contra a neurotoxicidade dos metabolitos da MDMA;
- A adição de α -MeDA e de N-Me- α -MeDA às células dopaminérgicas induz o aumento da síntese de GSH como resposta adaptativa ao stress oxidativo;
- A morte celular promovida pelos metabolitos catecólicos da MDMA apresenta uma morfologia típica da morte por apoptose. A morte celular não é acompanhada pela activação da caspase 3.

CAPÍTULO IV

Referências

REFERÊNCIAS

1. Capela JP, Carmo H, Remiao F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F. Molecular and Cellular Mechanisms of Ecstasy-Induced Neurotoxicity: An Overview. *Mol Neurobiol*. 2009 Apr 17.
2. Freudenmann RW, Oxler F, Bernschneider-Reif S. The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents. *Addiction*. 2006 Sep;101(9):1241-5.
3. Pentney AR. An exploration of the history and controversies surrounding MDMA and MDA. *J Psychoactive Drugs*. 2001 Jul-Sep;33(3):213-21.
4. Shulgin AT, Nichols DE. Characterization of three new psychotomimetics.: The Pharmacology of hallucinogens (Stillman RC and Willette RE Eds) Pergamon Press, Oxford; 1978.
5. Greer G, Strassman RJ. Information on "Ecstasy". *Am J Psychiatry*. 1985;142:1391.
6. Grinspoon L, Bakalar JB. Can drugs be used to enhance the psychotherapeutic process? *Am J Psychotherapy*. 1986;40:393-404.
7. Ricaurte GA, Bryan G, Strauss L, Seiden LS, Schuster CR. Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science*. 1985;229:986-8.
8. de Almeida SP, Silva MT. [History, effects and mechanisms of action of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine): review of the literature]. *Rev Panam Salud Publica*. 2000 Dec;8(6):393-402.
9. Green AR, Mehan AO, Elliot JM, O'Shea E, Colado MI. The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacol Rev*. 2003;55:463-508.
10. EMCDDA. Annual report 2008: the state of the drugs problem in the European Union and Norway. Lisbon: European Monitoring Centre on Drugs and Drug Addiction; 2008.
11. McCambridge J, Mitcheson L, Winstock A, Hunt N. Five-year trends in patterns of drug use among people who use stimulants in dance contexts in the United Kingdom. *Addiction*. 2005 Aug;100(8):1140-9.
12. Scholey AB, Parrott AC, Buchanan T, Heffernan TM, Ling J, Rodgers J. Increased intensity of Ecstasy and polydrug usage in the more experienced recreational Ecstasy/MDMA users: a WWW study. *Addict Behav*. 2004 Jun;29(4):743-52.
13. IDT. Relatório Anual 2007 - A Situação do País em Matéria de Drogas e Toxicodependências. Lisboa: Instituto da Droga e da Toxicodependência; 2008.
14. Schmidt CJ, Levin JA, Lovenberg W. In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol*. 1987;36:747-55.
15. Nichols DE, Lloyd DH, Hoffman AJ, Nichols MB, Yim GK. Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [3H]serotonin from rat brain synaptosomes. *J Med Chem*. 1982 May;25(5):530-5.
16. Johnson MP, Hoffman AJ, Nichols DE. Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [³H] serotonin and [³H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur J Pharmacol*. 1986;132:269-76.
17. Berger UV, Gu XF, Azmitia EC. The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, pchloroamphetamine and fenfluramine

induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *Eur J Pharmacol*; 1992. p. 153-60.

18. Crespi D, Mennini T, Gobbi M. Carrier-dependent and Ca^{2+} -dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, pchloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *Br J Pharmacol*. 1997;121:1735-43.

19. Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, et al. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*. 2001;39(1):32-41.

20. Montgomery T, Buon C, Eibauer S, Guiry PJ, Keenan AK, McBean GJ. Comparative potencies of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) analogues as inhibitors of [3H]noradrenaline and [3H]5-HT transport in mammalian cell lines. *Br J Pharmacol*. 2007 Dec;152(7):1121-30.

21. Han D, Gu H. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol*. 2006;6(1):6.

22. Baumann MH, Clark RD, Budzynski AG, Partilla JS, Blough BE, Rothman RB. N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or "Ecstasy"). *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:550-60.

23. Yamamoto BK, Spanos LJ. The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur J Pharmacol*. 1988;148:195-203.

24. Gudelsky GA, Nash JF. Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J Neurochem*. 1996;66:243-9.

25. Azmitia EC, Murphy RB, Whitaker-Azmitia PM. MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca^{2+} -dependent toxicity linked to release. *Brain Res*. 1990;26:97-103.

26. Partilla JS, Dempsey AG, Nagpal AS, Blough BE, Baumann MH, Rothman RB. Interaction of Amphetamines and Related Compounds at the Vesicular Monoamine Transporter. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 October 1, 2006;319(1):237-46.

27. Wichems CH, Hollingsworth CK, Bennett BA. Release of serotonin induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and other substituted amphetamines in cultured fetal raphe neurons: further evidence for calcium-independent mechanisms of release. *Brain Research*. 1995;695:10-8.

28. Fleckenstein AE, Hanson GR. Impact of psychostimulants on vesicular monoamine transporter function. *Eur J Pharmacol*. 2003;479:283-9.

29. Gough B, Ali SF, Slikker W, Jr., Holson RR. Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991 Jul;39(3):619-23.

30. Schmidt CJ, Taylor VL. Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochem Pharmacol*. 1987;36:4095-102.

31. Leonardi ET, Azmitia EC. MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology*. 1994;10:231-8.

32. Colado MI, O'Shea E, Granados R, Esteban B, Martin AB, Green AR. Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') administration. *Br J Pharmacol.* 1999 Feb;126(4):911-24.
33. Sabol KE, Seiden LS. Reserpine attenuates D-amphetamine and MDMA-induced transmitter release in vivo: a consideration of dose, core temperature and dopamine synthesis. *Brain Res.* 1998 Sep 21;806(1):69-78.
34. Gudelsky GA, Yamamoto BK, Nash JF. Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by 5-HT₂ receptor agonists. *Eur J Pharmacol.* 1994 Nov 3;264(3):325-30.
35. Colado MI, O'Shea E, Green AR. Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacology (Berl).* 2004 May;173(3-4):249-63.
36. Koch S, Galloway MP. MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. *J Neural Transm.* 1997;104(2-3):135-46.
37. Nash JF, Brodtkin J. Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 Nov;259(2):820-5.
38. Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA. Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum. *J Neurochem.* 1999;72:2516-22.
39. Mechan AO, Esteban B, O'Shea E, Elliot JM, Colado MI, Green AR. The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA "ecstasy") to rats. *Br J Pharmacol.* 2002;135:170-80.
40. O'Shea E, Esteban B, Camarero J, Green AR, Colado MI. Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ('ecstasy') on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology.* 2001;40(1):65-74.
41. Colado MI, Camarero J, Mechan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, et al. A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2001;134:1711-23.
42. Sadzot B, Baraban JM, Glennon RA, Lyon RA, Leonhardt S, Jan CR, et al. Hallucinogenic drug interactions at human brain 5-HT₂ receptors: implications for treating LSD-induced hallucinogenesis. *Psychopharmacology.* 1989;98:495-9.
43. Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther.* 2004;101:131-81.
44. Battaglia G, Brooks BP, Kulsakdinun C, De Souza EB. Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur J Pharmacol.* 1988;149(1-2):159-63.
45. Nash JF, Roth BL, Brodtkin JD, Nichols DE, Gudelsky GA. Effect of the R(2) and S(1) isomers of MDA and MDMA on phosphatidyl inositol turnover in cultured cells expressing 5-HT_{2A} or 5-HT_{2C} receptors. *Neurosci Lett.* 1994;177:111-5.
46. Chu T, Kumagai Y, DiStefano EW, Cho AK. Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem Pharmacol.* 1996;51:789-96.
47. Johnson EA, O'Callaghan JP, Miller DB. Brain concentrations of d-MDMA are increased after stress. *Psychopharmacology.* 2004;173:278-86.

48. de la Torre R, Farré M, Navarro M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S. Clinical Pharmacokinetics of Amphetamine and Related Substances Monitoring in Conventional and Non-Conventional Matrices. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43:157-85.
49. Verebey K, Alrazi J, Jaffe JH. The complications of 'ecstasy' (MDMA). *JAMA*. 1988 Mar 18;259(11):1649-50.
50. de la Torre R, Farre M, Ortuno J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, et al. Non-linear pharmacokinetics of MDMA ("ecstasy") in humans. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;49(2):104-9.
51. Farré M, Torre R, Mathúna B, Roset PN, Peiró AM, Torrens M, et al. Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology*. 2004;173(3):364-75.
52. Wu D, Otton SV, Inaba T, Kalow W, Sellers EM. Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem Pharmacol*. 1997;53(11):1605-12.
53. Heydari A, Yeo KR, Lennard MS, Ellis SW, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Mechanism-based inactivation of CYP2D6 by methylenedioxymethamphetamine. *Drug Metab Dispos*. 2004 November 1; 2004;32(11):1213-7.
54. Delaforge M, Jaouen M, Bouille G. Inhibitory metabolite complex formation of methylenedioxymethamphetamine with rat and human cytochrome P450: particular involvement of CYP2D. *Environ Pharmacol Toxicol*. 1999;7:153-8.
55. Carmo H, Brulport M, Hermes M, Oesch F, Silva R, Ferreira LM, et al. Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") cytotoxicity. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(11):789-99.
56. de la Torre R, Farre M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, et al. Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. *Ther Drug Monit*. 2004 Apr;26(2):137-44.
57. Fallon JK, Kicman AT, Henry JA, et al. Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in humans. *Clin Chem*. 1999;45:1058-69.
58. Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T, Peters FT. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ("ecstasy"). *Toxicol Lett*. 2000;113:133-42.
59. Segura M, Ortuño J, Farré M, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, et al. 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol*. 2001;14:1203-8.
60. de la Torre R, Farre M, Mathuna BO, Roset PN, Pizarro N, Segura M, et al. MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61(7):551-4.
61. Hiramatsu M, Kumagai Y, Unger SE, Cho AK. Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;254:521-7.
62. Jones DC, Duvauchelle C, Ikegami A, Olsen CM, Lau SS, de la Torre R, et al. Serotonergic Neurotoxic Metabolites of Ecstasy Identified in Rat Brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 April 1; 2005;313(1):422-31.
63. Kreth K, Kovar K, Schwab M, Zanger UM. Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy"-related designer drugs. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:1563-71.

64. Farre M, Abanades S, Roset PN, Peiro AM, Torrens M, O'Mathuna B, et al. Pharmacological interaction between 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and paroxetine: pharmacological effects and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Dec;323(3):954-62.
65. de la Torre R, Farre M. Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(10):505-8.
66. Fitzgerald RL, Blanke RV, Poklis A. Stereoselective pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the rat. *Chirality*. 1990;2(4):241-8.
67. Tucker GT, Lennard MS, Ellis SW, Woods HF, Cho AK, Lin LY, et al. The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem Pharmacol*. 1994 Mar 29;47(7):1151-6.
68. Meyer MR, Peters FT, Maurer HH. The role of human hepatic cytochrome P450 isozymes in the metabolism of racemic 3,4-methylenedioxy-methamphetamine and its enantiomers. *Drug Metab Dispos*. 2008 Nov;36(11):2345-54.
69. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2004;369:23-37.
70. O'Mathuna B, Farre M, Rostami-Hodjegan A, Yang J, Cuyas E, Torrens M, et al. The consequences of 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced CYP2D6 inhibition in humans. *J Clin Psychopharmacol*. 2008 Oct;28(5):523-9.
71. Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Feb;53(2):111-22.
72. Colado M, Williams J, Green A. The hyperthermic and neurotoxic effects of "Ecstasy" (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br J Pharmacol*. 1995;115:1281-9.
73. Malpass A, White JM, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F. Acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and Dark Agouti rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999 Sep;64(1):29-34.
74. Fonsart J, Menet MC, Decleves X, Galons H, Crete D, Debray M, et al. Sprague-Dawley rats display metabolism-mediated sex differences in the acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Jul 1;230(1):117-25.
75. Nash JF, Jr., Meltzer HY, Gudelsky GA. Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988 Jun;245(3):873-9.
76. Colado MI, Murray TK, Green AR. 5-HT loss in rat brain following 3,4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br J Pharmacol* 1993;108:583-9.
77. Schmidt C, Abbate G, Black C, Taylor V. Selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;255:478-83.
78. Broening HW, Bowyer JF, Slikker WJ. Age dependent sensitivity of rats to the long term effects of the serotonergic neurotoxicant (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:325-33.

79. Malberg JE, Sabol KE, Seiden LS. Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;278:258-67.
80. O'Shea E, Granados R, Esteban B, Colado MI, Green AR. The relationship between the degree of neurodegeneration of rat brain 5-HT nerve terminals and the dose and frequency of administration of MDMA ("ecstasy"). *Neuropharmacology*. 1998;37(7):919-26.
81. Malberg JE, Seiden LS. Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci*. 1998 Jul 1;18(13):5086-94.
82. Miller DB, O'Callaghan JP. Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Aug;270(2):752-60.
83. Gordon CJ, Watkinson WP, O'Callaghan JP, Miller DB. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;38(2):339-44.
84. Sprague JE, Banks ML, Cook VJ, Mills EM. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and sympathetic nervous system involvement in hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Apr;305(1):159-66.
85. Mills EM, Banks ML, Sprague JE, Finkel T. Uncoupling the agony from ecstasy. *Nature*. 2003;426(6965):403-4.
86. McNamara MG, Kelly JP, Leonard BE. Some behavioural and neurochemical aspects of subacute (6)3,4-methylenedioxymethamphetamine administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;52:479-84.
87. De Souza I, Kelly JP, Harkin AJ, Leonard BE. An appraisal of the pharmacological and toxicological effects of a single oral administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the rat. *Pharmacol Toxicol*. 1997;80:207-10.
88. Shankaran M, Gudelsky GA. A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacology*. 1999;147:66-72.
89. Gillman PK. Serotonin syndrome: history and risk. *Fundam Clin Pharmacol*. 1998;12(5):482-91.
90. Callaway CW, Wing LL, Geyer MA. Serotonin release contributes to the locomotor stimulant effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 Aug;254(2):456-64.
91. Fitzgerald JL, Reid JJ. Sympathomimetic actions of methylenedioxymethamphetamine in rat and rabbit isolated cardiovascular tissues. *J Pharm Pharmacol*. 1994;46:826-32.
92. O'Cain PA, Hletko SB, Ogden BA, Varner KJ. Cardiovascular and sympathetic responses and reflex changes elicited by MDMA. *Physiol Behav*. 2000;70:141-8.
93. Hall AP, Henry JA. Acute toxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. *Br J Anaesth*. 2006 June 1, 2006;96(6):678-85.
94. Cohen RS, Cocores J. Neuropsychiatric manifestations following the use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA: "Ecstasy"). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1997;21:727-34.

95. Vollenweider FX, Gamma A, Liechti ME, Huber T. Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naive healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 1998;19:241–51.
96. Liechti ME, Saur MR, Gamma A, Hell D, Vollenweider FX. Psychological and physiological effects of MDMA ("Ecstasy") after pre-treatment with the 5-HT₂ antagonist ketanserin in healthy humans. *Neuropsychopharmacology*. 2000;23:396–404.
97. Irvine RJ, Keane M, Felgate P, McCann UD, Callaghan PD, White JM. Plasma drug concentrations and physiological measures in "dance party" participants. *Neuropsychopharmacology*. 2005;31(2):424–30.
98. Liechti ME, Vollenweider FX. The serotonin uptake inhibitor citalopram reduces acute cardiovascular and vegetative effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in healthy volunteers. *J Psychopharmacol*. 2000;14:269–74.
99. Liechti ME, Vollenweider FX. Acute psychological and physiological effects of MDMA ("Ecstasy") after haloperidol pretreatment in healthy humans. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2000 Jul;10(4):289–95.
100. Henry J. Ecstasy and the dance of death. *Br Med J* 1992;350:5–6.
101. Logan SC, Stickle B, O'Keefe N, Hewitson H. Survival following "Ecstasy" ingestion with a peak temperature of 42°C. *Anaesthesia*. 1993;48:1017–8.
102. Henry JA, Fallon JK, Kicman AT, Hutt AJ, Cowan DA, Forsling M. Low-dose MDMA ("ecstasy") induces vasopressin secretion. *Lancet*. 1998;351:1784.
103. Wolff K, Tsapakis EM, Winstock AR, Hartley D, Holt D, Forsling ML, et al. Vasopressin and oxytocin secretion in response to the consumption of ecstasy in a clubbing population. *J Psychopharmacol*. 2006 May;20(3):400–10.
104. McCann UD, Slate SO, Ricaurte GA. Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy"). *Drug Saf*. 1996;15:107–15.
105. Davison D, Parrott AC. Ecstasy (MDMA) in recreational users: self-reported psychological and physiological effects. *Hum Psychopharmacol*. 1997;12:221–6.
106. Cole JC, Sumnall HR. Altered states: the clinical effects of Ecstasy. *Pharmacol Ther*. 2003;98(1):35–58.
107. Battaglia G, Yeh SY, O'Hearn E, Molliver ME, Kuhar MJ, De Souza EB. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;242:911–6.
108. Commins DL, Vosmer G, Virus RM, Woolverton WL, Schuster CR, Seiden LS. Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;241:338–45.
109. Schmidt CJ. Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;240:1–7.
110. Stone DM, Merchant KM, Hanson GR, Gibb JW. Immediate and long-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on serotonin pathways in brain of rat. *Neuropharmacology*. 1987 Dec;26(12):1677–83.
111. Mann H, Ladenheim B, Hirata H, Moran TH, Cadet JL. Differential toxic effects of methamphetamine (METH) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in multidrug-resistant (mdr1a) knockout mice. *Brain Res*. 1997 Sep 26;769(2):340–6.

112. Jayanthi S, Ladenheim B, Andrews AM, Cadet JL. Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *Neuroscience*. 1999;91(4):1379-87.
113. Johnson EA, O'Callaghan JP, Miller DB. Chronic treatment with supraphysiological levels of corticosterone enhances D-MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the C57BL/6J female mouse. *Brain Res*. 2002 Apr 19;933(2):130-8.
114. Molliver ME, Berger UV, Mamounas LA, Molliver DC, O'Hearn E, Wilson MA. Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;600:649-64.
115. O'Shea E, Orio L, Escobedo I, Sanchez V, Camarero J, Green AR, et al. MDMA-induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature. *Br J Pharmacol*. 2006;148:778-85.
116. Stone DM, Stahl DC, Hanson GR, Gibb JW. The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1986;128:41-8.
117. Scanzello CR, Hatzidimitriou G, Martello AL, Katz JL, Ricaurte GA. Serotonergic recovery after (+)-3,4-(methylenedioxy) methamphetamine injury: observations in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;264:1484-91.
118. Lew R, Sabol KE, Chou C, Vosmer GL, Richards J, Seiden LS. Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part II: radioligand binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;276:855-65.
119. Sabol KE, Lew R, Richards JB, Vosmer GL, Seiden LS. Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part I: synaptosomal uptake and tissue concentrations. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;276:846-54.
120. O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, Kuhar MJ, Molliver ME. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci*. 1988;8:2788-803.
121. Paris JM, Cunningham K. Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res Bull*. 1992;28:115-9.
122. Esteban B, O'Shea E, Camarero J, Sanchez V, Green AR, Colado MI. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology*. 2001;154:251-60.
123. Colado MI, Granados R, O'Shea E, Esteban B, Green AR. Role of hyperthermia in the protective action of chlormethiazole against MDMA ("ecstasy")- induced neurodegeneration, comparison with the novel NMDA channel blocker AR-R15896AR. *Br J Pharmacol*. 1998;124:479-84.
124. Globus M, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg M. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intranscemic brain temperature modulation. *J Neurochem*. 1995;65:1250-6.
125. Kil H, Zhang J, Piantadosi C. Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:100-6.

126. Sanchez V, Camarero J, Esteban B, Peter MJ, Green AR, Colado MI. The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ("ecstasy")-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. *Br J Pharmacol*. 2001;134(1):46-57.
127. Dafters RI, Emily L. Persistent loss of thermoregulation in the rat induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy") but not by fenfluramine. *Psychopharmacology*. 1998;138(2):207-12.
128. Mechan AO, O'Shea E, Elliot JM, Colado MI, Green AR. A neurotoxic dose of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) to rats results in a long-term defect in thermoregulation. *Psychopharmacology*. 2001;155:413-8.
129. Spanos LJ, Yamamoto BK. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(-/+MDMA)] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989;32:835-40.
130. Marston HM, Reid ME, Lawrence JA, Olverman HJ, Butcher SP. Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. *Psychopharmacology*. 1999;144(1):67-76.
131. Bull EJ, Hutson PH, Fone KCF. Reduced social interaction following 3,4-methylenedioxymethamphetamine is not associated with enhanced 5-HT_{2C} receptor responsivity. *Neuropharmacology*. 2003;44(4):439-48.
132. Clemens KJ, Van Nieuwenhuyzen PS, Li KM, Cornish JL, Hunt GE, McGregor IS. MDMA ("ecstasy"), methamphetamine and their combination: long-term changes in social interaction and neurochemistry in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 May;173(3-4):318-25.
133. Fone KC, Beckett SR, Topham IA, Swettenham J, Ball M, Maddocks L. Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Feb;159(4):437-44.
134. Bull EJ, Hutson PH, Fone KCF. Decreased social behaviour following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is accompanied by changes in 5-HT_{2A} receptor responsivity. *Neuropharmacology*. 2004;46(2):202-10.
135. Aguirre N, Ballaz S, Lasheras B, Del Río J. MDMA ("Ecstasy") enhances 5-HT_{1A} receptor density and 8-OH-DPAT-induced hypothermia: blockade by drugs preventing 5-hydroxytryptamine depletion. *Eur J Pharmacol*. 1998;346:181-8.
136. Commins DL, Vosmer G, Virus RM, Woolverton WL, Schuster CR, Seiden LS. Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987 Apr;241(1):338-45.
137. Yuan J, Cord BJ, McCann UD, Callahan BT, Ricaurte GA. Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *J Neurochem*. 2002;80(6):960-9.
138. Sanchez V, Camarero J, O'Shea E, Green AR, Colado MI. Differential effect of dietary selenium on the long-term neurotoxicity induced by MDMA in mice and rats. *Neuropharmacology*. 2003 Mar;44(4):449-61.
139. Jensen KF, Olin J, Haykal-Coates N, O'Callaghan J, Miller DB, de Olmos JS. Mapping toxicant-induced nervous system damage with a cupric silver stain: a quantitative analysis of neural degeneration induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *NIDA Res Monogr*. 1993;136:133-49 (discussion 50-54).
140. Schmued L. Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA. *Brain Res*. 2003;974:127-33.

141. Armstrong BD, Noguchi KK. The Neurotoxic Effects of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and Methamphetamine on Serotonin, Dopamine, and GABA-ergic Terminals: An In-Vitro Autoradiographic Study In Rats. *Neurotoxicology*. 2004;25(6):905-14.
142. Meyer JS, Grande M, Johnson K, Ali SF. Neurotoxic effects of MDMA ("ecstasy") administration to neonatal rats. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22(5-6):261-71.
143. Tamburini I, Blandini F, Gesi M, Frenzilli G, Nigro M, Giusiani M, et al. MDMA Induces Caspase-3 Activation in the Limbic System but not in Striatum. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1074:377-81.
144. Hernandez-Rabaza V, Dominguez-Escriba L, Barcia JA, Rosel JF, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM, et al. Binge administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") impairs the survival of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Neuropharmacology*. 2006;51(5):967-73.
145. Capela JP, Ruscher K, Lautenschlager M, Freyer D, Dirnagl U, Gaio AR, et al. Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia. *Neuroscience*. 2006;139(3):1069-81.
146. Capela JP, Fernandes E, Remiao F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F. Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons. *Neurotoxicology*. 2007 Jul;28(4):868-75.
147. Alvaro AR, Martins J, Costa AC, Fernandes E, Carvalho F, Ambrosio AF, et al. Neuropeptide Y protects retinal neural cells against cell death induced by ecstasy. *Neuroscience*. 2008 Mar 3;152(1):97-105.
148. Krasnova IN, Ladenheim B, Cadet JL. Amphetamine induces apoptosis of medium spiny striatal projection neurons via the mitochondria-dependent pathway. *FASEB J*. 2005;19:851-3.
149. Ádori C, Andó RD, Kovács GG, Bagdy G. Damage of serotonergic axons and immunolocalization of Hsp27, Hsp72, and Hsp90 molecular chaperones after a single dose of MDMA administration in Dark Agouti rat: Temporal, spatial, and cellular patterns. *J Comp Neurol*. 2006;497(2):251-69.
150. Stone DM, Hanson GR, Gibb JW. Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology*. 1987;26:1657-61.
151. Battaglia G, Yeh SY, De Souza EB. MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988;29:269-74.
152. O'Callaghan JP, Miller DB. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;270:741-51.
153. Cadet JL, Ladenheim B, Hirata H, Rothman RB, Ali S, Carlson E, et al. Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA): evidence from using CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Synapse*. 1995 Oct;21(2):169-76.
154. Zaczek R, Culp S, De Souza EB. Intrasyaptosomal sequestration of [3H]amphetamine and [3H]methylenedioxymphetamine: characterization suggests the presence of a factor responsible for maintaining sequestration. *J Neurochem*. 1990 Jan;54(1):195-204.
155. Camarero J, Sanchez V, O'Shea E, Green AR, Colado MI. Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. *J Neurochem*. 2002 Jun;81(5):961-72.

156. Fornai F, Giorgi FS, Gesi M, Chen K, Alessri MG, Shih JC. Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-4 and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse*. 2001;39:213-21.
157. Itzhak Y, Ali SF, Achat CN, Anderson KL. Relevance of MDMA ("Ecstasy")-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology*. 2003;166:241-8.
158. Fornai F, Lenzi P, Frenzilli G, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, et al. DNA damage and ubiquitinated neuronal inclusions in the substantia nigra and striatum of mice following MDMA (ecstasy). *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 May;173(3-4):353-63.
159. Ricaurte GA, DeLanney LE, Wiener SG, Irwin I, Langston JW. 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res*. 1988 Dec 6;474(2):359-63.
160. Ricaurte GA, Forno LS, Wilson MA, DeLanney LE, Irwin I, Molliver ME, et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *J Am Med Assoc*. 1988;260:51-5.
161. Ricaurte GA, Martello AL, Katz JL, Martello MB. Lasting effects of (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on central serotonergic neurons in nonhuman primates: neurochemical observations. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;261:616-22.
162. Fischer C, Hatzidimitriou G, Wlos J, Katz J, Ricaurte G. Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J Neurosci*. 1995;15:5476-85.
163. Slikker WJ, Ali SF, Scallet AC, Frith CH, Newport GD, Bailey JR. Neurochemical and neurohistological alterations in the rat and monkey produced by orally administered methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988;96:448-57.
164. Insel TR, Battaglia G, Johannessen JN, Marra S, De Souza EB. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") selectively destroys brain serotonin terminals in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;249:713-20.
165. Hatzidimitriou G, McCann UD, Ricaurte GA. Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery. *J Neurosci*. 1999;15:5096-107.
166. Ricaurte GA, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration. *Brain Res*. 1988;446:165-8.
167. Chang L, Ernst T, Grob CS, Poland RE. Cerebral (1)H MRS alterations in recreational 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") users. *J Magn Reson Imaging*. 1999 Oct;10(4):521-6.
168. Bowyer JF, Harris AJ, Delongchamp RR, Jakab RL, Miller DB, Little AR, et al. Selective changes in gene expression in cortical regions sensitive to amphetamine during the neurodegenerative process. *Neurotoxicology*. 2004 Jun;25(4):555-72.
169. Kish SJ, Furukawa Y, Ang L, Vorce SP, Kalasinsky KS. Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user. *Neurology*. 2000;55:294-6.
170. McCann UD, Szabo Z, Scheffel U, Dannals RF, Ricaurte GA. Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurones in human beings. *Lancet*. 1998;352:1433-7.

171. Obrocki J, Buchert R, Vaterlein O, Thomasius R, Beyer W, Schiemann T. Ecstasy--long-term effects on the human central nervous system revealed by positron emission tomography. *Br J Psychiatry*. 1999 Aug;175:186-8.
172. Semple DM, Ebmeier KP, Glabus MF, O'Carroll RE, Johnstone EC. Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA ("ecstasy") users. *Br J Psychiatry*. 1999;175:63-9.
173. Reneman L, Booij J, de Bruin K, Reitsma JB, de Wolff FA, Gunning WB, et al. Effects of dose, sex, and long-term abstinence from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons. *Lancet*. 2001;358(9296):1864-9.
174. Szabo Z, McCann UD, Wilson AA, Scheffel U, Owonikoko T, Mathews WB, et al. Comparison of (+)-(11)C-McN5652 and (11)C-DASB as serotonin transporter radioligands under various experimental conditions. *J Nucl Med*. 2002 May;43(5):678-92.
175. Reneman L, Endert E, Bruin Kd, Lavalaye J, Feenstra M, Wolff Fd, et al. The acute and chronic effects of MDMA ("Ecstasy") on cortical 5-HT_{2A} receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology*. 2002;26:387-96.
176. Kish SJ. How strong is the evidence that brain serotonin neurons are damaged in human users of ecstasy? *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71:845-55.
177. Reneman L, Booij J, Habraken JB, De Bruin K, Hatzidimitriou G, Den Heeten GJ, et al. Validity of [123I]beta-CIT SPECT in detecting MDMA-induced serotonergic neurotoxicity. *Synapse*. 2002;46:199-205.
178. Cowan RL. Neuroimaging research in human MDMA users: a review. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 Jan;189(4):539-56.
179. McCann UD, Ridenour A, Shaham Y, Ricaurte GA. Serotonin neurotoxicity after (+-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "Ecstasy"): a controlled study in humans. *Neuropsychopharmacology*. 1994;10:129-38.
180. McCann U, Mertl M, Eligulashvili V, Ricaurte G. Cognitive performance in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) users: a controlled study. *Psychopharmacology*. 1999;143:417-25.
181. Bolla KI, McCann UD, Ricaurte GA. Memory impairment in abstinent MDMA ("Ecstasy") users. *Neurology*. 1998;51:1532-7.
182. Creighton FJ, Black DL, Hyde CE. "Ecstasy" psychosis and flashbacks. *Br J Psychiatry*. 1991;159:713-5.
183. McGuire P. Long-term psychiatric and cognitive effects of MDMA use. *Toxicol Lett*. 2000;112:153-6.
184. Easton N, Marsden CA. Ecstasy: are animal data consistent between species and can they translate to humans? *J Psychopharmacol*. 2006 Mar;20(2):194-210.
185. Fox HC, McLean A, Turner JJ, Parrott AC, Rogers R, Sahakian BJ. Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA ('ecstasy') polydrug users. *Psychopharmacology*. 2002;162:203-14.
186. Gouzoulis-Mayfrank E, Thimm B, Rezk M, Hensen G, Daumann J. Memory impairment suggests hippocampal dysfunction in abstinent ecstasy users. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:819-27.
187. Moeller FG, Steinberg JL, Dougherty DM, Narayana PA, Kramer LA, Renshaw PF. Functional MRI study of working memory in MDMA users. *Psychopharmacology*. 2004;177:185-94.

188. Morgan M, McFie L, Fleetwood L, Robinson J. Ecstasy (MDMA): are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence? *Psychopharmacology*. 2002;159(3):294-303.
189. Rodgers J. Cognitive performance amongst recreational users of "ecstasy". *Psychopharmacology*. 2000;151:19-24.
190. Quednow BB, Jessen F, Kuhn K-U, Maier W, Daum I, Wagner M. Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. *J Psychopharmacol*. 2006 May 1, 2006;20(3):373-84.
191. Butler GKL, Montgomery AMJ. Impulsivity, risk taking and recreational "ecstasy" (MDMA) use. *Drug Alcohol Depend*. 2004;76(1):55-62.
192. Morgan MJ, Impallomeni LC, Pirona A, Rogers RD. Elevated Impulsivity and Impaired Decision-Making in Abstinent Ecstasy (MDMA) Users Compared to Polydrug and Drug-Naïve Controls. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:1562-73.
193. Krystal JH, Price LH, Opsahl C, Ricaurte GA, Heninger GR. Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) use: effects on mood and neuropsychological function? *Am J Drug Alcohol Abuse*. 1992;18(3):331-41.
194. Parrott AC, Lees A, Garnham NJ, Jones M, Wesnes K. Cognitive performance in recreational users of MDMA of 'ecstasy': evidence for memory deficits. *J Psychopharmacol*. 1998;12(1):79-83.
195. Parrott AC, Lasky J. Ecstasy (MDMA) effects upon mood and cognition: before, during and after a Saturday night dance. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998 Oct;139(3):261-8.
196. Morgan M. Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology*. 2000;152:230-48.
197. Wareing M, Fisk JE, Murphy PN. Working memory deficits in current and previous users of MDMA ('ecstasy'). *Br J Psychol*. 2000 May;91 (Pt 2):181-8.
198. Wareing M, Fisk JE, Murphy P, Montgomery C. Visuo-spatial working memory deficits in current and former users of MDMA ('ecstasy'). *Hum Psychopharmacol*. 2005 Mar;20(2):115-23.
199. Jacobsen LK, Mencil WE, Pugh KR, Skudlarski P, Krystal JH. Preliminary evidence of hippocampal dysfunction in adolescent MDMA ("ecstasy") users: possible relationship to neurotoxic effects. *Psychopharmacology*. 2004;173:383-90.
200. Veryheyden SL, Hadfield J, Calin T, Curran HV. Sub-acute effects of MDMA (+/-3,4-methylenedioxymethamphetamine "ecstasy") on mood: evidence of gender differences. *Psychopharmacology*. 2002;161:23-31.
201. Gerra G, Zaimovic A, Moi G, Giusti F, Gardini S, Delsignore R, et al. Effects of (+/-) 3,4-methylene-dioxymethamphetamine (ecstasy) on dopamine system function in humans. *Behav Brain Res*. 2002 Aug 21;134(1-2):403-10.
202. McCann UD, Szabo Z, Vranesic M, Palermo M, Mathews WB, Ravert HT, et al. Positron emission tomographic studies of brain dopamine and serotonin transporters in abstinent (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") users: relationship to cognitive performance. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Oct;200(3):439-50.
203. Reneman L, Booij J, Lavalaye J, de Bruin K, Reitsma JB, Gunning B, et al. Use of amphetamine by recreational users of ecstasy (MDMA) is associated with reduced striatal dopamine transporter densities: a [123I]beta-CIT SPECT study--preliminary report. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Jan;159(3):335-40.

204. McElhatton PR, Bateman DN, Evans C, Pughe KR, Thomas SH. Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure. *Lancet*. 1999;354:1441-2.
205. Ho E, Karimi-Tabesh L, Koren G. Characteristics of pregnant women who use Ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine). *Neurotoxicol Teratol*. 2001;23(6):561-7.
206. Monks TJ, Jones DC, Fengju B, Lau SS. The role of metabolism in 3,4-Methylenedioxymethamphetamine 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) toxicity. *Ther Drug Monit*. 2004;26:132-6.
207. Miller RT, Lau SS, Monks TJ. Effects of Intracerebroventricular Administration of 5-(Glutathion-S-yl)- α -methyldopamine on Brain Dopamine, Serotonin, and Norepinephrine Concentrations in Male Sprague-Dawley Rats. *Chem Res Toxicol*. 1996 February 29, 1996;9(2):457-65.
208. Escobedo I, O'Shea E, Orio L, Sanchez V, Segura M, de la Torre R, et al. A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol*. 2005;144:231-41.
209. Yeh SY, Hsu F-L. The neurochemical and stimulatory effects of putative metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;39(3):787-90.
210. Monks TJ, Lau SS. Biological Reactivity of Polyphenolic-Glutathione Conjugates. *Chem Res Toxicol*. 1997 December 16, 1997;10(12):1296-313.
211. Capela JP, Macedo C, Branco PS, Ferreira LM, Lobo AM, Fernandes E, et al. Neurotoxicity mechanisms of thioether ecstasy metabolites. *Neuroscience*. 2007 Jun 8;146(4):1743-57.
212. Capela JP, Meisel A, Abreu AR, Branco PS, Ferreira LM, Lobo AM, et al. Neurotoxicity of Ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jan;316(1):53-61.
213. Bai F, Lau SS, Monks TJ. Glutathione and *N*-Acetylcysteine Conjugates of α -Methyldopamine Produce Serotonergic Neurotoxicity: Possible Role in Methylenedioxymethamphetamine-Mediated Neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 1999 December 20, 1999;12(12):1150-7.
214. Kleiner HE, Rivera MI, Pumford NR, Monks TJ, Lau SS. Immunochemical detection of quinol-thioether derived covalent protein adducts. *Chem Res Toxicol*. 1998;11:1283-90.
215. Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Fukuda M, Kitaichi K, Miyoshi K, et al. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone formation-related molecules. *FASEB J*. 2006 January 10, 2006;20:571-3.
216. Colado MI, Green AR. The spin trap reagent α -phenyl-N-tert-butyl nitron prevents "ecstasy"-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1995;280:343-6.
217. Aguirre N, Barrionuevo M, Ramirez MJ, Del Rio J, Lasheras B. Alpha-lipoic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity. *NeuroReport*. 1999;10:3675-80.
218. Alves E, Summavielle T, Alves CJ, Gomes-da-Silva J, Barata JC, Fernandes E, et al. Monoamine oxidase-B mediates ecstasy-induced neurotoxic effects to adolescent rat brain mitochondria. *J Neurosci*. 2007 Sep 19;27(38):10203-10.

219. O'Shea E, Escobedo I, Orio L, Sanchez V, Navarro M, Green AR, et al. Elevation of Ambient Room Temperature has Differential Effects on MDMA-Induced 5-HT and Dopamine Release in Striatum and Nucleus Accumbens of Rats. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(7):1312-23.
220. Robert RF, Chris-Ellyn J, Manuel ET. Thermoregulatory effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. *Psychopharmacology*. 2005;183(2):248-56.
221. Farfel GM, Seiden LS. Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. Experiments using 3,4-methylenedioxymethamphetamine, dizocilpine, CGS 19755 and NBQX. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272:860-7.
222. Baumann MH, Wang X, Rothman RB. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacology*. 2007;189:407-24.
223. Stone DM, Johnson M, Hanson GR, Gibb JW. Role of endogenous dopamine in the central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;247:79-87.
224. Schmidt CJ, Black CK, Taylor VL. L-DOPA potentiation of the serotonergic deficits due to a single administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine or methamphetamine to rats. *Eur J Pharmacol*. 1991 Oct 2;203(1):41-9.
225. Schmidt CJ, Black CK, Taylor VL. Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of methylenedioxymethamphetamine. *Eur J Pharmacol*. 1990;181:59-70.
226. Hewitt K, Green A. Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA ("Ecstasy") to rats. *Neuropharmacology*. 1994;33:1589-95.
227. Sprague JE, Nichols DE. The monoamine oxidase-B inhibitor L-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;273:667-73.
228. Sprague JE, Nichols DE. Inhibition of MAO-B protects against MDMA-induced neurotoxicity in the striatum. *Psychopharmacology*. 1995;118:357-9.
229. Falk EM, Cook VJ, Nichols DE, Sprague JE. An antisense oligonucleotide targeted at MAO-B attenuates rat striatal serotonergic neurotoxicity induced by MDMA. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;72(3):617-22.
230. Nash JF, Meltzer HY, Gudelsky GA. Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem*. 1990 Mar;54(3):1062-7.
231. White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ. The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1996 Aug;49(5):455-79.
232. Yamamoto BK, Nash JF, Gudelsky GA. Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;273:1063-70.
233. Breier JM, Bankson MG, Yamamoto BK. L-Tyrosine Contributes to (+)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Serotonin Depletions. *J Neurosci*. 2006 January 4, 2006;26(1):290-9.

234. Goni-Allo B, Puerta E, Mathuna BO, Hervias I, Lasheras B, de la Torre R, et al. On the role of tyrosine and peripheral metabolism in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology*. 2008 Apr;54(5):885-900.
235. Sprague JE, Everman SL, Nichols DE. An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology*. 1998;19:427-41.
236. Shankaran M, Gudelsky GA. Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on hippocampal dopamine and serotonin. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998 Dec;61(4):361-6.
237. Yuan J, Callahan BT, McCann UD, Ricaurte GA. Evidence against an essential role of endogenous brain dopamine in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J Neurochem*. 2001;77(5):1338-47.
238. Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE, Jr., Ford PC. The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 5;91(14):6604-8.
239. Cadet JL, Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int*. 1998 Feb;32(2):117-31.
240. Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem*. 1998 Nov;71(5):2112-22.
241. Spencer JP, Whiteman M, Jenner P, Halliwell B. 5-s-Cysteiny-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *J Neurochem*. 2002 Apr;81(1):122-9.
242. Commins DL, Axt KJ, Vosmer G, Seiden LS. 5,6-Dihydroxytryptamine, a serotonergic neurotoxin, is formed endogenously in the rat brain. *Brain Res*. 1987 Feb 10;403(1):7-14.
243. Crino PB, Vogt BA, Chen JC, Volicer L. Neurotoxic effects of partially oxidized serotonin: tryptamine-4,5-dione. *Brain Res*. 1989 Dec 18;504(2):247-57.
244. Kramer HK, Poblete JC, Azmitia EC. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") promotes the translocation of protein kinase C (PKC): requirement of viable serotonin nerve terminals. *Brain Res*. 1995;680:1-8.
245. Farfel GM, Vosmer GL, Seiden LS. The antagonist MK-801 protects against serotonin depletions induced by methamphetamine 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine. *Brain Res*. 1992;595(1):121-7.
246. Schmidt CJ, Taylor VL. Direct central effects of acute methylenedioxymethamphetamine on serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol*. 1988 Oct 26;156(1):121-31.
247. Stone DM, Johnson M, Hanson GR, Gibb JW. Acute inactivation of tryptophan hydroxylase by amphetamine analogs involves the oxidation of sulfhydryl sites. *Eur J Pharmacol*. 1989;7:93-7.
248. Elayan I, Gibb JW, Hanson GR, Lim HK, Foltz RL, Johnson M. Short-term effects of 2,4,5-trihydroxyamphetamine, 2,4,5-trihydroxymethamphetamine and 3,4-dihydroxymethamphetamine on central tryptophan hydroxylase activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;265:813-8.
249. Kuhn DM, Jr. RA. Molecular Mechanism of the Inactivation of Tryptophan Hydroxylase by Nitric Oxide: Attack on Critical Sulfhydryls that Spare the Enzyme Iron Center. *J Neurosci*. 1997 October 1, 1997;17(19):7245-51.
250. Schmidt CJ, Taylor VL. Reversal of the acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine by 5-HT uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 1990;181:133-6.

251. Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA. Involvement of the SERT in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Eur J Pharmacol.* 1999;385:103-10.
252. Hemeryck A, Belpaire FM. Selective serotonin reuptake inhibitors and cytochrome P-450 mediated drug-drug interactions: an update. *Curr Drug Metab.* 2002;3:13-37.
253. Renoir T, Paizanis E, Yacoubi ME, Saurini F, Hanoun N, Melfort M, et al. Differential long-term effects of MDMA on the serotonergic system and hippocampal cell proliferation in 5-HTT knock-out vs. wild-type mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008 Dec;11(8):1149-62.
254. Ramamoorthy S, Blakely RD. Phosphorylation and Sequestration of Serotonin Transporters Differentially Modulated by Psychostimulants. *Science.* 1999 July 30, 1999;285(5428):763-6.
255. Ramamoorthy S, Giovanetti E, Qian Y, Blakely RD. Phosphorylation and Regulation of Antidepressant-sensitive Serotonin Transporters. *J Biol Chem.* 1998 January 23, 1998;273(4):2458-66.
256. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med.* 2000;78(1):3-13.
257. Nash JF, Yamamoto BK. Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine. *Brain Res.* 1992;581(2):237-43.
258. White SR, Duffy P, Kalivas PW. Methylenedioxymethamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens in vivo. *Neuroscience.* 1994;62(1):41-50.
259. Obradovic T, Imel KM, White SR. Methylenedioxymethamphetamine-induced inhibition of neuronal firing in the nucleus accumbens is mediated by both serotonin and dopamine. *Neuroscience.* 1996;74:469-81.
260. Pannu R, Singh I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: Neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem Int.* 2006;49(2):170-82.
261. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat.* 1996 Jun;10(3-4):179-90.
262. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:1620-4.
263. Zheng Y, Lavery R. Role of brain nitric oxide in (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res.* 1998;795(1-2):257-63.
264. Darvesh AS, Yamamoto BK, Gudelsky GA. Evidence for the Involvement of Nitric Oxide in 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Serotonin Depletion in the Rat Brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 February 1, 2005;312(2):694-701.
265. Johnson M, Bush LG, Hanson GR, Gibb JW. Effects of ritanserin on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced decrease in striatal serotonin concentration and on the increase in striatal neurotensin and dynorphin A concentrations. *Biochem Pharmacol.* 1993;46(4):770-2.
266. Blessing W, Seaman B. 5-Hidroxitriptamine_{2A} receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *Neuroscience.* 2003;117:939-48.

267. Stumm G, Schlegel J, Schafer T, Wurz C, Mennel H, Krieg J, et al. Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *FASEB J*. 1999;13:1065-72.
268. Freshney I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. John Wiley & Sons, Inc 2005; 2005.
269. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983 Oct;71(4):741-7.
270. Oyarce AM, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 1991 Nov 1;290(2):503-10.
271. Richards ML, Sadee W. Human neuroblastoma cell lines as models of catechol uptake. *Brain Res*. 1986 Oct 1;384(1):132-7.
272. Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, et al. Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*. 1998 Dec;54(6):1046-54.
273. Fang J, Zuo D, Yu PH. Comparison of cytotoxicity of a quaternary pyridinium metabolite of haloperidol (HP+) with neurotoxin N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) towards cultured dopaminergic neuroblastoma cells. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995 Oct;121(3):373-8.
274. Sheehan JP, Palmer PE, Helm GA, Tuttle JB. MPP+ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: an electron microscope study. *J Neurosci Res*. 1997 May 1;48(3):226-37.
275. Song X, Perkins S, Jortner BS, Ehrich M. Cytotoxic effects of MPTP on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*. 1997;18(2):341-53.
276. Wu CW, Ping YH, Yen JC, Chang CY, Wang SF, Yeh CL, et al. Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 May 1;220(3):243-51.
277. Bachmann RF, Wang Y, Yuan P, Zhou R, Li X, Alesci S, et al. Common effects of lithium and valproate on mitochondrial functions: protection against methamphetamine-induced mitochondrial damage. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 Jul;12(6):805-22.
278. Brown JM, Gouty S, Iyer V, Rosenberger J, Cox BM. Differential protection against MPTP or methamphetamine toxicity in dopamine neurons by deletion of ppN/OFQ expression. *J Neurochem*. 2006 Jul;98(2):495-505.
279. Chae M, Rhee GS, Jang IS, Kim K, Lee JH, Lee SY, et al. ATG5 expression induced by MDMA (ecstasy), interferes with neuronal differentiation of neuroblastoma cells. *Mol Cells*. 2009 May;27(5):571-5.
280. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res*. 2004;5(8):579-98.
281. Pennypacker KR, Kuhn DM, Billingsley ML. Changes in expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in human SMS-KCNR neuroblastoma following retinoic acid or phorbol ester-induced differentiation. *Brain Res Mol Brain Res*. 1989 Jun;5(4):251-8.
282. Farooqui SM. Induction of adenylate cyclase sensitive dopamine D2-receptors in retinoic acid induced differentiated human neuroblastoma SHSY-5Y cells. *Life Sci*. 1994;55(24):1887-93.

283. Ammer H, Schulz R. Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with changes in the abundance of G proteins. *J Neurochem.* 1994 Apr;62(4):1310-8.
284. Jimenez A, Jorda EG, Verdaguer E, Pubill D, Sureda FX, Canudas AM, et al. Neurotoxicity of amphetamine derivatives is mediated by caspase pathway activation in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;196(2):223-34.
285. Gibb JW, Johnson M, Stone D, Hanson GR. MDMA: historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:601-11; discussion 11-2.
286. Carvalho M, Remião F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Monteiro MC, et al. Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chem Res Toxicol.* 2004;17:623-32.
287. Carvalho M, Milhazes N, Remiao F, Borges F, Fernandes E, Amado F, et al. Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch Toxicol.* 2004;78(1):16-24.
288. Zhang F, Dryhurst G. Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *J Med Chem.* 1994 Apr 15;37(8):1084-98.
289. Krishna CM, Liebmann JE, Kaufman D, DeGraff W, Hahn SM, McMurphy T, et al. The catecholic metal sequestering agent 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage. *Arch Biochem Biophys.* 1992 Apr;294(1):98-106.
290. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000 Dec;62(6):649-71.
291. Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 1;88(5):1913-7.
292. Aguirre P, Valdes P, Aracena-Parks P, Tapia V, Nunez MT. Upregulation of gamma-glutamate-cysteine ligase as part of the long-term adaptation process to iron accumulation in neuronal SH-SY5Y cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jun;292(6):C2197-203.
293. Adams JD, Jr., Klaidman LK, Odunze IN, Shen HC, Miller CA. Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. *Mol Chem Neuropathol.* 1991 Jun;14(3):213-26.
294. Petrovic V, Buzadzic B, Korac A, Vasilijevic A, Jankovic A, Korac B. L-Arginine supplementation induces glutathione synthesis in interscapular brown adipose tissue through activation of glutamate-cysteine ligase expression: The role of nitric oxide. *Chem Biol Interact.* 2009 Jul 22.
295. Lavoie S, Chen Y, Dalton TP, Gysin R, Cuenod M, Steullet P, et al. Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *J Neurochem.* 2009 Mar;108(6):1410-22.