

Márcia Cláudia Dias de Carvalho

**ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DA
3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA (“ECSTASY”)**

ENSAIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

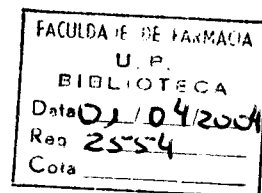


**Mestrado em Controlo de Qualidade
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
2000**

Márcia Cláudia Dias de Carvalho

**ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DA
3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA ("ECSTASY")**

ENSAIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*



FFM
CAR
2554



**Mestrado em Controlo de Qualidade
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

2000

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto para obtenção do grau de **Mestre em**
Controlo de Qualidade na especialidade de Medicamentos e
Plantas Medicinais

Orientador:

Professor Doutor Félix Dias Carvalho

Co-orientador:

Professora Doutora Maria de Lourdes Pinho de
Almeida Souteiro Bastos

Aos meus pais

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam da seguinte comunicação

M. Carvalho, F. Carvalho e M. L. Bastos. Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) potentiates hyperthermia-induced hepatotoxicity in freshly isolated Mouse hepatocytes. XXX Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia e XVIII Reunião de Farmacologia Clínica, Lisboa, 2 e 3 de Dezembro de 1999.

Índice Geral

Agradecimentos	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
Abreviaturas	XV

CAPÍTULO I Introdução

1.1. ENQUADRAMENTO	1
1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO	2
1.3. ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	3

CAPÍTULO II 3,4-Metilenodioximetanfetamina: Revisão Geral

2.1. ASPECTOS HISTÓRICOS	4
2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	6
2.3. RELAÇÃO ESTRUTURA-ACTIVIDADE	8
2.4. MECANISMO DE ACÇÃO FARMACOLÓGICA	11
2.5. EFEITOS FARMACOLÓGICOS	14
2.5.1. Efeitos periféricos	14
2.5.2. Efeitos sobre o Sistema Nervoso Central	14
2.6. FARMACOCINÉTICA	16
2.6.1. Absorção e distribuição	16
2.6.2. Metabolismo e excreção	17
2.7. TOXICIDADE DA 3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA	21
2.7.1. Toxicidade no Sistema Nervoso Central	22
2.7.1.1. Degeneração neuronal	22
2.7.1.2. Manifestações neuropsiquiátricas	29
2.7.2. Toxicidade no sistema cardiovascular	30

2.7.2.1. Cardiomiopatias, enfarte do miocárdio e morte súbita por arritmia	30
2.7.2.2. Acidente vascular cerebral	32
2.7.2.3. Arteriopatia tromboembólica pulmonar	33
2.7.3. Toxicidade hepática	35
2.7.4. Rabdomiólise e nefrotoxicidade	40
2.7.5. Hipertermia	43
2.7.6. Teratogenicidade	45
2.7.7. Imunotoxicidade	47
2.8. TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO	50
2.9. DEPENDÊNCIA	52

CAPÍTULO III *Estudo da Hepatotoxicidade da 3,4-Metilenodioximetanfetamina: Ensaios In Vivo*

3.1. INTRODUÇÃO	53
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.2.1. Materiais utilizados	54
3.2.2. Animais	54
3.2.3. Protocolo experimental	55
3.2.4. Administração da MDMA	56
3.2.5. Medição da temperatura corporal	56
3.2.6. Quantidade de ração ingerida	57
3.2.7. Relação peso do fígado/peso corporal	57
3.2.8. Quantificação dos níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina	57
3.2.9. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida	58
3.2.10. Determinação da extensão da peroxidação lipídica	61
3.2.11. Medição da actividade de enzimas antioxidantes	64
3.2.11.1. Catalase	66
3.2.11.2. Glutathiona redutase	67
3.2.11.3. Glutathiona-S-transferase	68
3.2.11.4. Glutathiona peroxidase	69

3.2.11.5. Superóxido dismutase	71
3.2.12. Histologia de cortes de fígado	73
3.2.13. Análise estatística	74
3.3. RESULTADOS	75
3.3.1. Efeito da MDMA na quantidade de ração ingerida	75
3.3.2. Efeito da MDMA na relação peso fígado/peso corporal	76
3.3.3. Efeito da MDMA nos níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina	77
3.3.4. Efeito da MDMA na temperatura corporal	78
3.3.5. Efeito da MDMA nos níveis de glutathione reduzida	80
3.3.6. Efeito da MDMA na extensão da peroxidação lipídica	81
3.3.7. Efeito da MDMA na actividade de enzimas antioxidantes	82
3.3.7.1. Catalase	82
3.3.7.2. Glutathione redutase	83
3.3.7.3. Glutathione-S-transferase	84
3.3.7.4. Glutathione peroxidase	85
3.3.7.5. Superóxido dismutase	86
3.3.8. Estudo histológico de cortes de fígado	87
3.4. DISCUSSÃO	89

CAPÍTULO IV *Estudo da Hepatotoxicidade da 3,4-Metilenodioximetanfetamina: Ensaios In Vitro*

4.1. INTRODUÇÃO	97
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	98
4.2.1. Materiais utilizados	98
4.2.2. Animais	98
4.2.3. Protocolo experimental	99
4.2.4. Isolamento de hepatócitos de ratinho	100
4.2.4.1. Técnica	101

4.2.4.2. Sistema de perfusão	103
4.2.5. Incubação dos hepatócitos	105
4.2.6. Determinação da viabilidade celular	106
4.2.6.1. Exclusão do corante azul de tripano	106
4.2.6.2. Libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular	107
4.2.7. Determinação dos níveis intracelulares de glutathiona reduzida e oxidada	109
4.2.8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica	110
4.2.9. Análise estatística	110
4.3. RESULTADOS	111
4.3.1. Características dos hepatócitos isolados obtidos	111
4.3.2. Efeito da hipertermia nas células controlo	113
4.3.3. Efeito da MDMA na viabilidade celular	116
4.3.4. Efeito da MDMA nos níveis intracelulares de glutathiona reduzida	118
4.3.5. Efeito da MDMA nos níveis intracelulares de glutathiona oxidada	120
4.3.6. Efeito da MDMA na extensão da peroxidação lipídica	122
4.4. DISCUSSÃO	124
<u>CAPÍTULO V</u> Conclusões Gerais	128
<u>CAPÍTULO VI</u> Referências Bibliográficas	130



Agradecimentos

Ao Professor Doutor Félix Dias Carvalho, meu orientador, são dirigidas as minhas primeiras palavras de agradecimento por todo o entusiasmo, confiança e profunda sabedoria com que sempre me orientou.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, minha co-orientadora, quero manifestar os meus sinceros agradecimentos pelo apoio científico e crítico, que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Dr. Fernando Remião, à Dra. Helena Carmo e à Engenheira Maria Elisa Soares os meus agradecimentos pelo apoio incondicional a nível científico, pelo estímulo e sincera amizade e pelo excelente ambiente humano que torna aprazível cada dia no Laboratório de Toxicologia.

À Dra. Gabriela Ramos os meus agradecimentos pelos ensinamentos da técnica de isolamento de hepatócitos de Rato e pela amizade.

À Dra. Laura Pereira agradeço a disponibilidade e ajuda proporcionada na quantificação de vários parâmetros bioquímicos no soro, realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira agradeço a colaboração concedida nos estudos de histologia, realizado no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Ao Professor Doutor José Alberto Duarte agradeço a ajuda na obtenção das fotografias de microscopia óptica de hepatócitos isolados de Ratinho, realizada no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

À Professora Doutora Maria Fernanda Borges e ao Dr. Nuno Milhazes agradeço a síntese do cloridrato de 3,4-metilenodioximetanfetamina, realizada no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e a amizade que sempre demonstraram.

À Professora Doutora Eduarda Fernandes agradeço o apoio e a sua amizade.

Às Técnicas Júlia Caraméz e Graziela Fernandes agradeço a disponibilidade que sempre demonstraram no Laboratório de Toxicologia.

À United Nations Drug Control Program agradeço a cedência da amostra de cloridrato de 3,4-metilenodioximetanfetamina.

À Sónia, Marco, Luís e amigos agradeço a amizade, apoio e paciência.

Desejo ainda expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de algum modo, incentivaram e contribuíram para a realização do trabalho apresentado nesta tese.

Aos meus pais, que sempre me acompanharam durante todos os anos de estudo que tornaram possível este trabalho, agradeço profundamente. A eles dedico este trabalho.

Resumo

Estudo da Hepatotoxicidade da 3,4-Metilenodioximetanfetamina

Ensaaios *in vivo* e *in vitro*

Este trabalho teve por objectivo o estudo dos efeitos hepatotóxicos da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; "ecstasy") através de ensaios realizados *in vivo*, em ratinhos Charles River, e *in vitro*, em suspensões de hepatócitos isolados da mesma estirpe de ratinhos. Foi dado particular relevo ao estudo da influência da hipertermia na hepatotoxicidade induzida pela MDMA dado ser um factor frequentemente associado ao seu consumo.

Os parâmetros estudados nos ensaios *in vivo* foram: (a) a temperatura corporal; (b) os níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina; (c) o conteúdo hepático em glutathione reduzida (GSH); (d) a peroxidação lipídica hepática; (e) a actividade hepática de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase, glutathione-S-transferase, cobre, zinco superóxido dismutase e manganês superóxido dismutase) e (f) o exame histológico de cortes de fígado.

Os parâmetros estudados nos ensaios *in vitro* foram: (i) a viabilidade celular, avaliada pela técnica de exclusão do azul de tripano e pela libertação de lactato desidrogenase; (ii) os níveis de glutathione reduzida e oxidada; (iii) e a peroxidação lipídica nos hepatócitos.

Nos ensaios *in vivo* verificou-se que a MDMA (5, 10 e 20 mg/Kg) induziu hipertermia em ratinhos, sendo este efeito dependente da dose administrada. Constatou-se um aumento deste efeito pela elevação da temperatura ambiente. Verificou-se igualmente depleção do conteúdo hepático em GSH e expressão de peroxidação lipídica, este último apenas observado na dose mais alta ensaiada e em animais privados de alimento durante o ensaio. Não se observaram diferenças significativas entre os valores plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina para os diferentes grupos estudados, o que está de acordo com o exame histológico que não revelou lesão hepática. A MDMA induziu uma diminuição da actividade da catalase e da glutathione peroxidase, embora não tenha modificado a actividade da glutathione transferase, glutathione redutase e superóxido dismutase hepáticas.

Nos ensaios *in vitro* verificou-se que a hipertermia é um factor determinante na toxicidade celular, visto que um aumento da temperatura de incubação de 37°C para 41°C causa *stress* oxidativo nos hepatócitos isolados de ratinho, traduzido por indução da peroxidação lipídica, de forma dependente do tempo de incubação e consequente perda da viabilidade celular (até cerca de 40% de mortalidade), embora a variação nos níveis de GSH e de GSSG seja semelhante à observada em condições de normotermia. A MDMA (100-1600 µM) a 37°C induziu depleção de GSH de forma dependente da concentração e do tempo de exposição mas praticamente não teve efeito a nível da peroxidação lipídica e viabilidade celular. Em condições de hipertermia (41°C) verificou-se potenciação da depleção de GSH induzida pela MDMA, peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular, atingindo os 90-100% de mortalidade após 3 horas de contacto com MDMA na concentração mais alta estudada. Podemos assim concluir que a hipertermia potencia a toxicidade induzida pela MDMA em hepatócitos isolados de ratinho.

Abstract

Study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced hepatotoxicity

In vivo and in vitro assays

The aim of this work was the evaluation of the hepatotoxic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") by performing *in vivo* studies in mice Charles Rivers and *in vitro* studies in freshly isolated Mouse hepatocytes. It was also studied the influence of hyperthermia in MDMA-induced hepatotoxicity since hyperthermia appears to be frequently associated to its consume.

The parameters under evaluation for the *in vivo* assays were: (a) body temperature; (b) plasmatic levels of transaminases and alkaline phosphatase; (c) hepatic glutathione (GSH) levels; (d) hepatic lipid peroxidation; (e) hepatic activity of antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, copper, zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase); (f) and histological examination of mice liver.

The parameters under evaluation for the *in vitro* assays were: (i) cell viability by the trypan blue exclusion technique and by the measurement of LDH leakage; (ii) quantification of reduced and oxidised glutathione; (iii) and lipid peroxidation.

In vivo studies showed an hyperthermic response to administration of MDMA (5, 10 and 20 mg/Kg) that was dose-related. This effect was potentiated by high ambient temperature. It was also observed a depletion of liver GSH levels and an increase of lipid peroxidation for the highest dose in animals prived of food. It was not observed any difference between the groups in what concerns to plasmatic levels of liver markers which is in accordance to histological data. The activity of most antioxidant enzymes studied was not altered, but there was a significant depletion of catalase activity and glutathione peroxidase.

In vitro studies showed that hyperthermia by itself was an important cause of cell toxicity: a rise in incubation temperature from 37°C to 41°C caused oxidative stress in freshly isolated Mouse hepatocytes, reflected by a time dependent induction of lipid peroxidation and consequent loss of cell viability (up to 40-45%), although the variation of GSH and GSSG levels was similar to normothermia conditions. MDMA (100-1600 µM)

induced a concentration and time dependent GSH depletion at 37°C but had a negligible effect on lipid peroxidation or cell viability at this temperature. Noteworthy, hyperthermia (41°C) potentiated MDMA-induced depletion of GSH, lipid peroxidation and loss of cell viability up to 90-100%. It is therefore concluded that hyperthermia potentiates MDMA-induced toxicity in freshly isolated Mouse hepatocytes.

Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Bomba dependente de ATP
AVC	Acidente vascular cerebral
CID	Coagulação intravascular disseminada
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CK	Creatina fosfoquinase
CuZnSOD	Cobre, zinco superóxido dismutase
DEA	"Drug Enforcement Administration"
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis (β -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetracético
<i>et al.</i>	e colaboradores
FNT	Factor de necrose tumoral
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione-S-transferase
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
5-HT	5-Hidroxitriptamina
IL	Interleucina
L $\cdot$	Radical lipídico
LDH	Desidrogenase láctica

LO [•]	Radical alcoxilo
LOO [•]	Radical peroxilo
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MAO	Monoamina oxidase
MDA	3,4-Metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
NK	“Natural Killer”
NMDA	N-metil-D-aspartato
O.E.D.T.	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
ROOH	Hidroperóxido orgânico
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
r.p.m.	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico
vs	<i>versus</i>

CAPÍTULO I

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO

Tem-se assistido, nas últimas décadas, ao aumento do consumo abusivo e generalizado de estimulantes de estrutura anfetamínica, principalmente no seio das classes etárias mais jovens. Este recrudescimento deve-se muito provavelmente ao aparecimento das chamadas “designer drugs” que não são mais que derivados sintéticos da anfetamina. Os produtores clandestinos conseguem ladear a legislação criando compostos novos, obtidos por ligeiras modificações na estrutura de uma substância ilícita controlada por lei (Barish e Tintinalli, 1990). Entre estas, destaca-se a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; “ecstasy”) por ser a segunda droga recreacional mais popular entre os jovens europeus, logo a seguir à *cannabis* (O.E.D.T., 1999). A sua popularidade deve-se à capacidade de aumentar a autoconfiança e autoestima e de induzir sentimentos de empatia (Schwartz e Miller, 1997). Os ritmos de produção e a amplitude do tráfico de MDMA têm vindo a aumentar consideravelmente dado a sua produção ser relativamente simples e as matérias primas necessárias ao seu fabrico serem baratas e amplamente disponíveis. É curioso notar a facilidade de acesso pela “internet” ao seu processo de síntese.

Também no nosso país o consumo de “ecstasy” tornou-se uma realidade, como nos é transmitido através da informação veiculada pelos órgãos de comunicação social. Esta situação é alarmante porque, apesar de algumas informações disponíveis para o público descreverem a MDMA como um composto inócuo, ela não é desprovida de toxicidade. Têm sido descritos na literatura vários efeitos tóxicos, nomeadamente cardiomiopatias, hipertermia, rabdomiólise, hiponatremia grave, coagulação intravascular disseminada, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, convulsões e morte, principalmente em jovens (Dowling *et al.*, 1987; Henry *et al.*, 1992; Maxwell *et al.*, 1993; White *et al.*, 1997; Holden e Jackson, 1996; Rochester e Kirchner, 1999; Walubo e Seger, 1999).

Este trabalho enquadra-se na área da Toxicologia Molecular na perspectiva da contribuição para um conhecimento mais aprofundado sobre os efeitos e mecanismos de hepatotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina.

1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

O objectivo deste trabalho consistiu no estudo *in vivo* e *in vitro* dos efeitos hepatotóxicos da metilenodioximetanfetamina. Com este fim, foram realizados ensaios *in vivo*, em ratinhos Charles River, e ensaios *in vitro*, em suspensões de hepatócitos isolados da mesma estirpe de ratinhos. Nestes ensaios, a indução da hepatotoxicidade foi estudada usando diferentes doses/concentrações de MDMA, com o objectivo de estudar a relação dose-efeito. Outro objectivo deste trabalho foi o estudo, *in vivo*, da influência da temperatura ambiente na hepatotoxicidade induzida pela MDMA. O estudo deste factor é relevante uma vez que a “ecstasy” é normalmente consumida em locais de temperatura ambiente elevada (como, por exemplo, festas “rave”). Por fim, com o objectivo de estudar a influência da hipertermia observada *in vivo* na hepatotoxicidade da MDMA realizaram-se ensaios, *in vitro*, a diferentes temperaturas de incubação, 37°C e 41°C.

- Os ensaios realizados *in vivo* foram:
 - 1ª SÉRIE : Administração de MDMA a ratinhos com livre acesso à ração padrão.
 - 2ª SÉRIE : Administração de MDMA a ratinhos mantidos em jejum.

Em ambas as séries, o estudo foi realizado à temperatura ambiente de $20\pm 2^\circ\text{C}$ e a $30\pm 2^\circ\text{C}$. A temperatura corporal foi determinada ao longo do ensaio. Ao fim de 24 horas, foram quantificados os níveis plasmáticos de marcadores de lise hepática e foram determinados no fígado vários parâmetros relacionados com o *stress* oxidativo, como peroxidação lipídica, níveis de glutathione reduzida e actividade de enzimas antioxidantes. Foi igualmente efectuado um exame histológico do fígado.

- Os ensaios realizados *in vitro* foram:
 - Incubação de hepatócitos isolados de ratinho com MDMA (100-1600 μM) a 37°C e a 41°C e determinação da viabilidade celular, peroxidação lipídica, glutathione reduzida e glutathione oxidada.

1.3. ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação encontra-se dividida em 6 capítulos:

- CAPÍTULO I : Introdução
- CAPÍTULO II : 3,4-Metilenodioximetanfetamina: revisão geral

Neste capítulo faz-se uma revisão histórica da MDMA, desde a sua síntese até ao seu uso inicial como auxiliar em psicoterapia e, mais recentemente, como droga de abuso. São ainda referidos outros aspectos importantes como a relação estrutura-actividade, a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), o mecanismo de acção farmacológica, o fenómeno da dependência, os efeitos tóxicos a vários níveis, nomeadamente sistema nervoso central, cardiovascular, muscular, renal, hepático, imunológico e teratogénico, e as possibilidades terapêuticas na reversão dos efeitos de intoxicações agudas.

- CAPÍTULO III : Estudo da hepatotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina: ensaios *in vivo*

Neste capítulo descrevem-se os protocolos experimentais utilizados nos estudos realizados *in vivo*, assim como os resultados obtidos e respectivas discussões.

- CAPÍTULO IV : Estudo da hepatotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina: ensaios *in vitro*

Neste capítulo descrevem-se os protocolos experimentais utilizados nos estudos realizados *in vitro*, assim como os resultados obtidos e respectivas discussões.

- CAPÍTULO V : Conclusões gerais
- CAPÍTULO VI : Referências bibliográficas

CAPÍTULO II

3,4-Metilenodioximetanfetamina: Revisão Geral

II. 3,4-Metilenodioximetanfetamina: Revisão Geral

2.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; “ecstasy”) foi sintetizada pela primeira vez em 1912 pela firma química alemã Merck, tendo sido patenteada como anorética (ver Hegadoren *et al.*, 1999). No entanto, nunca chegou a ser comercializada como tal e caiu no esquecimento. Nos anos 50, foi utilizada pelo exército dos Estados Unidos em experiências destinadas a encontrar uma “droga da verdade” para os interrogatórios em tempo de Guerra. Os resultados destes ensaios foram infrutíferos e tornou a cair no esquecimento. Só voltou a surgir mais tarde, em 1965, quando o químico californiano Alexander Shulgin a sintetizou no seu laboratório. Shulgin era, nessa altura, um químico promissor da Dow Chemicals, que havia descoberto um insecticida lucrativo. A companhia, na esperança de outras descobertas lucrativas, montou-lhe um laboratório próprio, embora Shulgin se interessasse mais por substâncias psicoactivas do que por insecticidas. Shulgin procurava compostos para uso em psicoterapia e testava as drogas que sintetizava em si próprio. A firma despediu-o quando teve conhecimento de que sintetizava drogas de abuso no seu laboratório. No entanto, Shulgin continuou os seus estudos e na sua obra “Phenethylamines I Have Known And Loved” descreve a composição química e o efeito de 179 drogas psicoactivas, entre as quais a MDMA. Posteriormente, e com a ajuda de um amigo psiquiatra, divulgou o potencial da MDMA como adjuvante na psicoterapia (ver Walder e Amendt, 1999). Durante os anos 70 e início dos anos 80 a MDMA gozou de alguma popularidade entre a comunidade psiquiátrica. Os seus defensores afirmam que a sua utilização num esquema terapêutico controlado aumenta a capacidade de introspecção e induz sentimentos de confiança e empatia entre pacientes e terapeutas (ver Grob *et al.*, 1992; Karch, 1993; Burnat *et al.*, 1996; Velea *et al.*, 1999). Estas propriedades levaram a que Nichols *et al.* (1986) sugerissem uma nova classe farmacológica para a MDMA e compostos análogos: os “entactogénios”. O conceito, derivado do grego, significa que estas drogas permitem um contacto com o íntimo.

No final da década de 70, o seu consumo como droga de abuso encontrava-se generalizado nos Estados Unidos (ver Burnat *et al.*, 1996; Hegadoren *et al.*, 1999; Rochester e Kirchner, 1999). A neurotoxicidade observada em animais de experiência após a administração de um composto relacionado, a metilenodioxianfetamina (MDA), levou a que a “Drug Enforcement Administration” (DEA), em 1985, classificasse a MDMA como substância de grau I (substâncias com elevado potencial de abuso, sem utilizações clínicas reconhecidas e sem segurança aceitável mesmo sob supervisão médica). No entanto, a grande controvérsia gerada à volta do seu valor terapêutico levou a que a jurisprudência decidisse aceitar a MDMA para uso sob supervisão médica, tendo sido colocada numa classe menos restritiva de grau III. Esta reclassificação foi apenas temporária e, em Março de 1988, foi novamente classificada como substância de grau I (ver Liester *et al.*, 1992; Burnat, 1996).

Apesar destas restrições, a “ecstasy” propagou-se muito rapidamente como droga recreacional. Tornou-se bastante popular, principalmente no Reino Unido e nos Estados Unidos, sendo consumida de forma despreocupada pelos jovens nas chamadas festas “rave” (ver McCann e Ricaurte, 1994a; Schwartz e Miller, 1997; Rochester e Kirchner, 1999). O relatório publicado pelo “Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência” (O.E.D.T.), datado de 1999, revela que 0,5% a 3% da população adulta europeia e 1% a 5% da população jovem havia consumido “ecstasy”. Estas taxas são significativamente mais elevadas no Reino Unido, onde se estima que cerca de 31% da população, com idades compreendidas entre os 16 e 25 anos, já consumiram “ecstasy” (ver Hegadoren *et al.*, 1999). Um estudo realizado para averiguar a prevalência de drogas ilícitas nas escolas secundárias da Austrália revelou que 3,6 % dos estudantes (12-17 anos) haviam consumido “ecstasy” (Lynskey *et al.*, 1999). No nosso país, o consumo de “ecstasy” teve início em finais dos anos 80 e, à semelhança dos restantes países da Europa, esta ganhou rapidamente popularidade entre os jovens portugueses, como nos sugere a informação veiculada pelos órgãos de comunicação social (ver, a título de exemplo, revista “Visão” de 24 de Março de 1994; jornal “Público” de 7 de Novembro e 7 de Dezembro de 1995; jornal “Expresso” de 1 de Novembro de 1996, revista “A Capital” de 22 de Fevereiro de 2000).

2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS (Garrett *et al.*, 1991; Budaravi *et al.*, 1996)

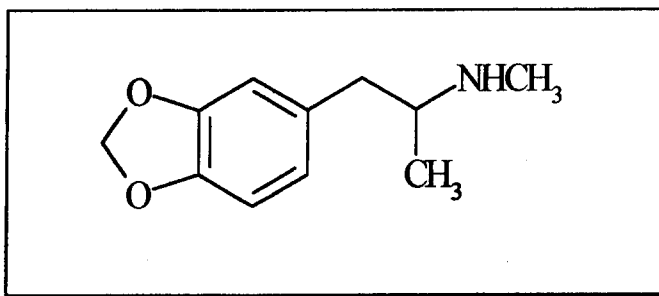


Figura 1. Estrutura química da MDMA.

NOME QUÍMICO: N,α-Dimetil-1,3-benzodioxol-5-etanamina

OUTRAS DESIGNAÇÕES: 3,4-Metilenodioximetanfetamina, N-Metil-3,4-metilenodioxifenilisopropilamina; “Ecstasy”; “E”; “XTC”; “Adam”

FÓRMULA MOLECULAR: C₁₁H₁₅NO₂

MASSA RELATIVA: 193,25

PONTO DE EBULIÇÃO: 100-110 °C (0,4 mmHg)

A MDMA encontra-se na forma de óleo.

Para realizar o trabalho desta dissertação foi usado o **cloridrato de MDMA** (forma racémica). As características físicas e químicas do sal da MDMA usado são:

FÓRMULA MOLECULAR: C₁₁H₁₅NO₂.HCl

MASSA RELATIVA: 229,72

CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO (pKa): 10,38

PONTO DE FUSÃO: 152-153 °C (isopropanol/éter)

O cloridrato de MDMA é um pó cristalino branco. É inodoro e tem um sabor intenso e amargo.

2.3. RELAÇÃO ESTRUTURA-ACTIVIDADE

A MDMA é uma feniletilamina com estrutura química semelhante à anfetamina e à mescalina (Figura 2), o que lhe confere propriedades estimulantes e alucinogénicas. No entanto, a MDMA não se enquadra plenamente em nenhuma destas categorias (Glennon, 1999). De facto, a molécula da MDMA possui uma actividade estimulante central moderada e os efeitos alucinogénicos associados são observados apenas para doses muito elevadas. Nichols *et al.* (1986) com base nos resultados de estudos da relação estrutura-actividade concluíram que a MDMA possui propriedades particulares, que a tornam distinta dos compostos anfetamínicos e alucinogénios. Estes autores propuseram uma nova classe farmacológica, para incluir a MDMA, que designaram de “entactogénios”, o que significa, como já foi referido, “contacto com o íntimo”.

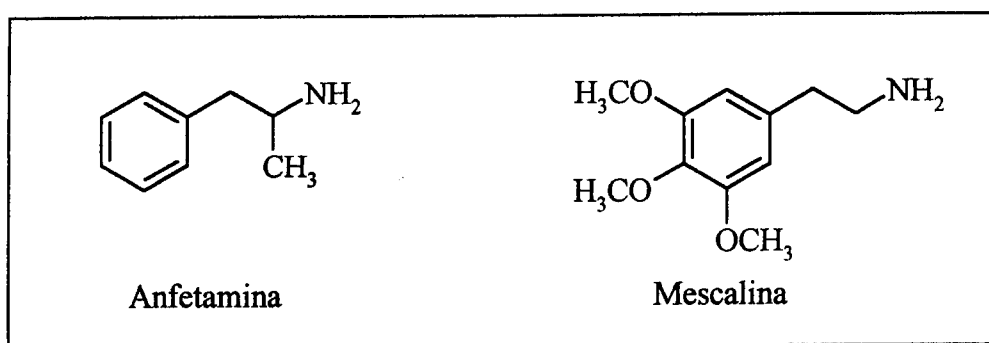
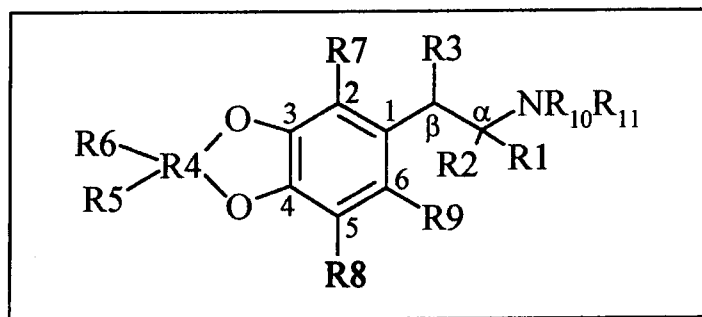


Figura 2. Estrutura química da anfetamina e da mescalina.

O estudo da relação estrutura-actividade da MDMA permitiu as seguintes conclusões (Oberlender e Nichols, 1988; Nichols e Oberlender, 1989 e 1990; Dal Cason, 1990; Parker *et al.*, 1998):



- **Estereoquímica**

- O isómero S-(+)-MDMA é o alucinogénio mais activo. Regra geral, nos compostos de estrutura anfetamínica com actividade alucinogénica o isómero R é o alucinogénio mais potente. A molécula da MDMA constitui assim uma excepção.

- **Substituição na cadeia alifática**

- A ausência do grupo α -metilo ($R_1=R_2=H$) reduz drasticamente a actividade.
- A substituição do grupo α -metilo ($R_1=CH_3$; $R_2=H$) pelo seu homólogo α -etilo ($R_1=C_2H_5$; $R_2=H$) origina um composto com actividade “entactogénica” semelhante à da MDMA, mas desprovido de actividade estimulante e alucinogénica.
- A introdução de um segundo grupo metilo no carbono α ($R_1=R_2=CH_3$) diminui a actividade estimulante e inibe a actividade “entactogénica” da MDMA.

- **Substituição no grupo amina**

- A N-metilação da MDA ($R_{10}=R_{11}=H$) leva à obtenção da MDMA ($R_{10}=H$; $R_{11}=CH_3$) originando uma diminuição dos efeitos alucinogénicos do enantiómero R-MDMA, mantendo, no entanto, a actividade do enantiómero S-MDMA. É de salientar que a N-metilação de compostos de estrutura anfetamínica com propriedades alucinogénicas resulta numa diminuição significativa da sua actividade alucinogénica.
- A substituição do grupo N-metilo pelo seu homólogo N-etilo ($R_{10}=H$; $R_{11}=C_2H_5$) ou por grupos substituintes volumosos origina uma diminuição da actividade estimulante e alucinogénica da MDMA.

- **Substituição no anel aromático**

- A introdução de um grupo metilo nas posições 2 ($R7=CH_3$) ou 5 ($R8=CH_3$) do anel aromático não conduz à alteração da actividade alucinogénica, enquanto que a presença de um substituinte na posição 6 ($R9=CH_3$) diminui esta actividade.
- A introdução de um grupo metoxilo nas posições 2 ($R7=OCH_3$) ou 6 ($R9=OCH_3$) não conduz à alteração da actividade alucinogénica, enquanto que na posição 5 ($R8=CH_3$) diminui a actividade estimulante e alucinogénica.

- **Substituição no anel dioxol**

- A substituição do grupo metileno ($R4=CH_2$) por um grupo etileno ($R4=CH_2CH_2$) ou propileno ($R4=CH_2CH_2CH_2$) origina uma diminuição da actividade estimulante e “entactogénica”.
- A introdução de um grupo metilo no anel dioxol ($R5=CH_3$; $R6=H$) diminui a actividade e a introdução de dois grupos metilo ($R5=R6=CH_3$) inibe a actividade alucinogénica e “entactogénica” da MDMA.

2.4. MECANISMO DE ACÇÃO FARMACOLÓGICA

A MDMA, à semelhança das restantes anfetaminas, é um composto simpaticomimético de acção indirecta. A sua acção ocorre por libertação dos neurotransmissores simpáticos das vesículas dos terminais nervosos e da medula suprarrenal, nomeadamente da serotonina (ou 5-hidroxitriptamina (5-HT)) e das catecolaminas noradrenalina, adrenalina e dopamina. As aminas libertadas activam os respectivos receptores levando a um estado de estimulação simpática com intensidade e duração proporcional à dose e via de administração.

No entanto, a MDMA liberta preferencialmente serotonina, tanto *in vivo* (Steranka e Sanders-Bush, 1980) como *in vitro* (Pletscher *et al.*, 1964; Tseng *et al.*, 1976; Nichols *et al.*, 1982; Schmidt *et al.*, 1987; Fuller e Henderson, 1994). A afinidade da MDMA para o local de captação serotoninérgico é cerca de 40 vezes superior à sua afinidade para o local de captação dopaminérgico (Battaglia *et al.*, 1987; Schmid, 1994). A MDMA promove a libertação de serotonina por permuta com esta, a nível do seu transportador membranar, segundo um processo designado por difusão por permuta (ver Figura 3). Em consequência do transporte da MDMA para o interior do neurónio pelo sistema de captação neuronal, o transportador fica disponível na superfície interna da membrana para se ligar à serotonina livre e transportá-la para o espaço sináptico (Rudnick e Wall, 1992; Kuczenski e Segal, 1994; Huether *et al.*, 1997). Este processo, ao contrário da libertação exocítica das catecolaminas induzida por impulsos nervosos, é Ca^{2+} -independente (Johnson *et al.*, 1986) e pode ser bloqueado pela fluoxetina ou imipramina, que são inibidores dos sistemas de captação neuronal de 5-HT (Schmidt, 1987; Fitzgerald e Reid, 1990; Rudnick e Wall, 1992; Gudelsky e Nash, 1996).

Em doses baixas, verifica-se que para além deste processo, a MDMA possui uma acção inibidora da captação vesicular de 5-HT e facilita a sua libertação das vesículas por interacção directa com o transportador. Estes efeitos são estereoselectivos, sendo o enantiómero S-(+)-MDMA mais potente (Rudnick e Wall, 1992). Em doses elevadas, a MDMA pode penetrar nas vesículas sinápticas por difusão passiva e, sendo uma base fraca, promover o aumento do pH vesicular e, consequentemente, o efluxo de 5-HT, uma

vez que esta amina é mantida no interior das vesículas através de um gradiente de iões H^+ mantido por uma bomba de prótons dependente do ATP (Rudnick e Wall, 1992; Seiden *et al.*, 1993; Kuczenski e Segal, 1994).

Assim, a MDMA, além de promover a libertação de catecolaminas, inibe a sua recaptação neuronal (Kuczenski e Segal, 1994), aumentando assim o tempo de permanência destas aminas na fenda sináptica, e diminui o seu metabolismo pela monoamina oxidase (Leonardi e Azmitia, 1994), o que leva ao prolongamento da estimulação simpática.

Por fim, a MDMA estimula a síntese de dopamina por um processo mediado por receptores $5-HT_{2A/2C}$ localizados nos neurónios GABAérgicos. A activação destes receptores pós-sinápticos pela 5-hidroxitriptamina libertada é responsável pela diminuição dos níveis de GABA (Yamamoto *et al.*, 1995) e consequente estimulação da síntese e libertação de dopamina (Nash, 1990). A administração de antagonistas dos receptores $5-HT_2$ previne este processo (Nash, 1990; Schmidt *et al.*, 1991).

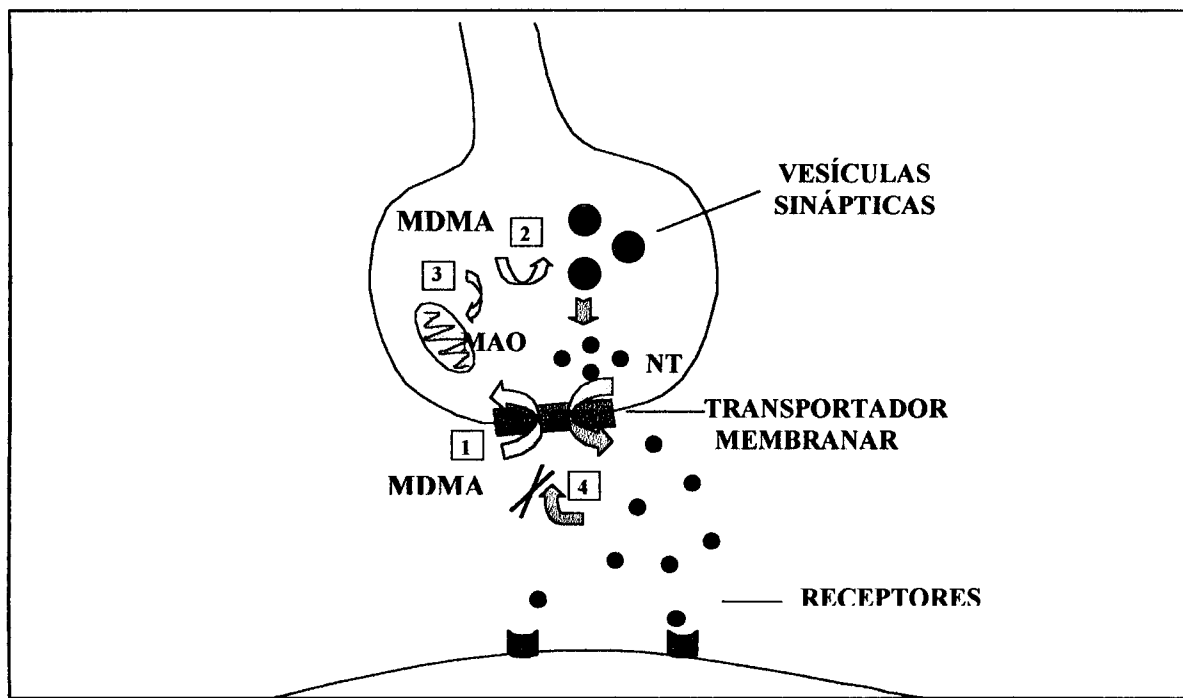


Figura 3. Mecanismo de ação farmacológica da metilenodioximetanfetamina (MDMA). (1) A MDMA promove a liberação do neurotransmissor (NT) por permuta com este, a nível do seu transportador. (2) Pode também deslocar o NT das vesículas sinápticas e (3) diminuir o seu metabolismo pela monoamina oxidase (MAO). (4) A MDMA também inibe a captação neuronal do NT por impedimento da sua ligação e transporte pelo transportador membranar.

2.5. EFEITOS FARMACOLÓGICOS

As doses recreacionais de MDMA são normalmente de 100 a 200 mg (1,4-2,8 mg/Kg). Os efeitos dependem da dose, frequência e duração do consumo. O início dos efeitos ocorre em 30 a 45 minutos. A duração do efeito é de aproximadamente 4 a 6 horas, mas uma diminuição evidente deste efeito ocorre em 2 a 3 horas (ver Hegadoren *et al.*, 1999).

A tolerância para os efeitos procurados desenvolve-se rapidamente com o uso regular e frequente de MDMA (Baudot *et al.*, 1998).

2.5.1. Efeitos periféricos

Os efeitos periféricos da MDMA resultam da sua acção simpaticomimética indirecta sobre os receptores adrenérgicos α e β . Para doses recreacionais, os efeitos normalmente observados são o aumento da pressão sanguínea sistólica e diastólica, aumento da frequência e do débito cardíaco, taquicardia, palpitações, dilatação das pupilas (midríase), tremor e dilatação brônquica (ver Henry *et al.*, 1992; Grob *et al.*, 1996; Vollenweider *et al.*, 1998; Hegadoren *et al.*, 1999).

2.5.2. Efeitos sobre o Sistema Nervoso Central

A MDMA possui uma acção estimulante central menos potente que a anfetamina. Os principais efeitos observados são o aumento do estado de vigília e alerta, euforia, sensação de bem-estar, aumento da capacidade de introspecção, sentimentos de confiança e empatia, hiperactividade motora, hipertermia, perda de apetite, sede e diminuição da capacidade visual e auditiva (Vollenweider *et al.*, 1998; Hegadoren *et al.*, 1999).

Estes efeitos parecem ser mediados pela estimulação dos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos induzida pela MDMA (Schechter, 1988). A estimulação dos receptores dopaminérgicos centrais parece ser responsável pelos efeitos estimulantes no Sistema

Nervoso Central (SNC). No entanto, outros sistemas de neurotransmissores também podem contribuir de forma significativa para o efeito final, quer modulando a acção dopaminérgica, quer originando acções que competem com os seus efeitos (Segal e Kuckenski, 1994). Os efeitos alucinogénicos parecem resultar da elevação no cérebro dos níveis extracelulares de 5-hidroxitriptamina e activação dos respectivos receptores, entre os quais, o 5-HT_{2A} (Huerther *et al.*, 1997).

A hiperactividade motora induzida pela MDMA parece resultar da estimulação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₁ (Callaway *et al.*, 1992; Burnat *et al.*, 1996; Bengel *et al.*, 1998). Esta acção é estereoselectiva, sendo o isómero S-(+)-MDMA o mais potente (Callaway *et al.*, 1992).

A estimulação do centro respiratório medular aumenta a frequência e o volume respiratório (Hoffman e Lefkowitz, 1996).

A estimulação do centro de recompensa no cérebro anterior pode resultar em euforia e aumento da libido (Shields, 1990).

A acção da MDMA sobre o centro do apetite no hipotálamo lateral leva à diminuição do apetite. Esta acção anoréctica parece ser mediada pela estimulação do sistema serotoninérgico (Schmidt *et al.*, 1990).

2.6. FARMACOCINÉTICA

2.6.1. Absorção e distribuição

É importante salientar que até ao momento foram realizados poucos estudos de farmacocinética da MDMA em humanos.

A administração oral é a via normalmente usada pelos consumidores de MDMA, sendo esta bem absorvida a nível gastrointestinal (Lapostolle *et al.*, 1997), embora não existam dados sobre a % de absorção da dose oral de MDMA no Homem (Ferigolo *et al.*, 1998). Os picos plasmáticos ocorrem entre 1 a 3 horas após a ingestão da droga (Ramcharan *et al.*, 1998).

Alguns estudos realizados em indivíduos saudáveis permitiram determinar os níveis plasmáticos a vários intervalos de tempo após a ingestão de uma dose baixa de 50 mg (Verebey *et al.*, 1988) e de doses superiores de 75 e 125 mg de MDMA (Cami *et al.*, 1997). O nível plasmático máximo foi de 106 µg/L para a dose de 50 mg, 126 µg/L para a dose de 75 mg e 226 µg/L para a dose de 125 mg. Ao fim de 24 horas o nível de MDMA encontrado era de 5 µg/L.

Muito recentemente, De la Torre *et al.* (2000) realizaram um estudo em 14 voluntários saudáveis que receberam doses compreendidas entre 50 e 150 mg (50 n=2, 75 n=4, 100 n=2, 125 n=4, 150 n=2). Os níveis plasmáticos encontrados neste estudo estão de acordo com os anteriores, sendo de 236,4 µg/L para a dose de 125 mg e de 464,5 µg/L para a dose de 150 mg. Uma constatação importante deste estudo foi a inexistência de proporcionalidade directa entre a dose de MDMA ingerida e os níveis plasmáticos encontrados, sendo que doses mais elevadas produziram níveis plasmáticos desproporcionalmente mais elevados. Estes resultados sugerem que a farmacocinética da MDMA não é linear, sendo no entanto necessário realizar outros estudos para o comprovar.

Na literatura aparecem descritos vários casos de intoxicações agudas pela MDMA cujos valores plasmáticos são bastante superiores, da ordem dos 7000-8000 µg/L (Brown e Osterloh, 1987; Henry *et al.*, 1992), e alguns casos fatais em que os níveis determinados chegam a ser 70 vezes superiores ao valor referido (Randall, 1992).

Existem poucos dados sobre a distribuição da MDMA nos tecidos humanos (Rohrig e Prouty, 1992). No entanto, é bem conhecido o facto das fenilisopropilaminas se distribuírem largamente por todos os tecidos, passando facilmente a barreira hematoencefálica. Não existem ainda dados sobre a percentagem de ligação às proteínas plasmáticas humanas. A semi-vida plasmática da MDMA é cerca de 6 a 7 horas (Ramcharan *et al.*, 1998).

2.6.2. Metabolismo e excreção

Os primeiros estudos do metabolismo *in vivo* e *in vitro* da MDMA foram realizados no Rato por Lim e Foltz, em 1988. Estes e outros estudos realizados posteriormente em animais (Lim *et al.*, 1992) e no Homem (Helmlin *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 2000) permitiram identificar as principais etapas envolvidas no metabolismo da MDMA. As diferenças encontradas entre as espécies estudadas até ao momento são de ordem quantitativa (Lim *et al.*, 1992).

A MDMA sofre N-desmetilação com formação da 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), sendo esta etapa catalizada predominantemente pelo citocromo P450 1A2 (Maurer *et al.*, 2000) (Figura 4). A MDMA e seu metabolito (MDA) sofrem O-desmetilenação, por acção do sistema enzimático citocromo P450 (*CYP2D6* ou *CYP3A2/4*), com formação dos catecóis 3,4-diidroxiometanfetamina (HHMA; N-metil- α -metildopamina) e 3,4-diidroxiianfetamina (HMA; α -metildopamina), respectivamente. Esta é a principal via metabólica no Homem e no Rato. A HHMA e a HMA são posteriormente O-metiladas pela enzima catecol-o-metiltransferase (COMT) com formação predominante de 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) e de 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA), respectivamente. Estes 4 metabolitos, e em particular a HMMA e a HMA, são excretadas

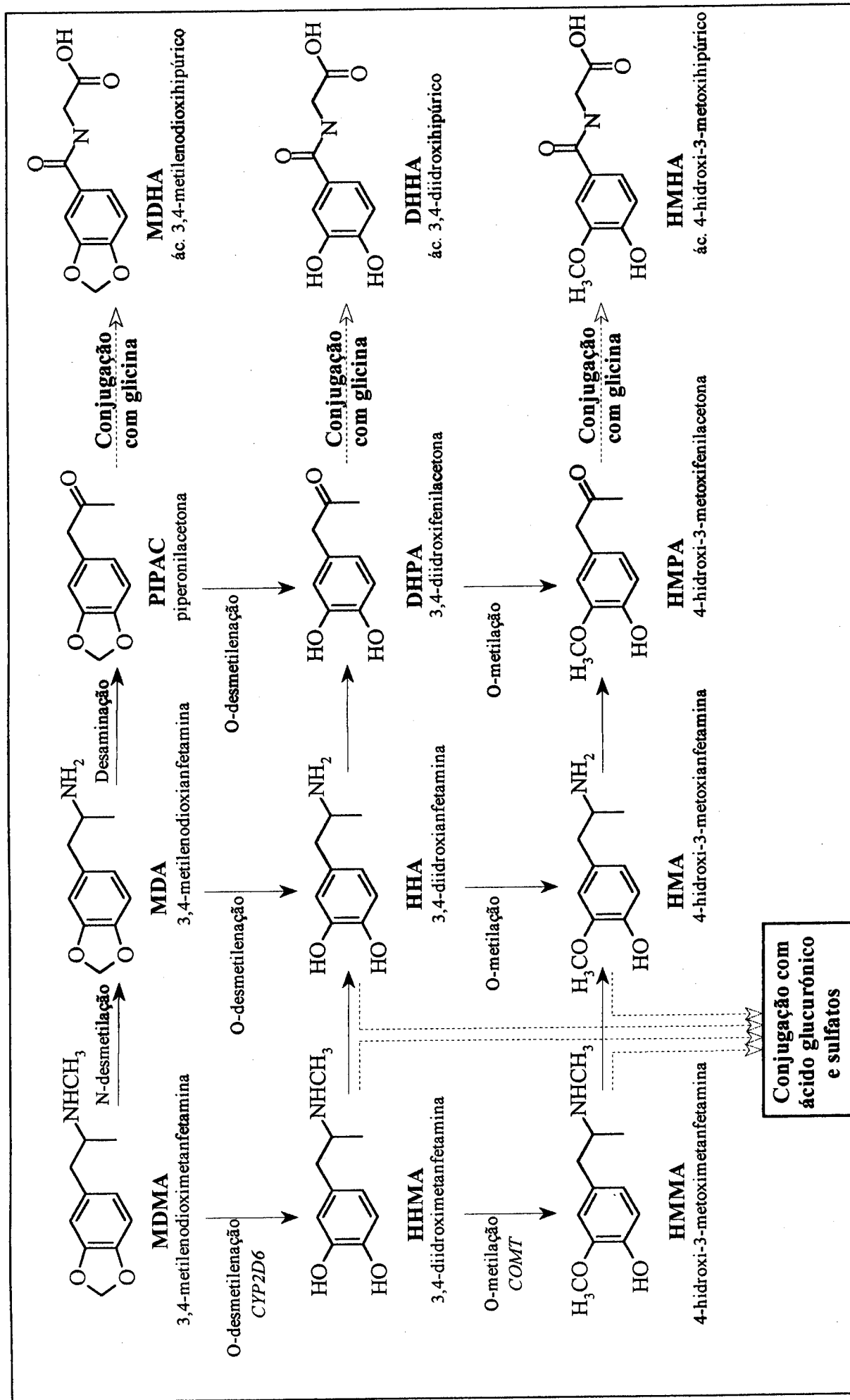


Figura 4. Metabolismo da metilenodioximetanfetamina no Homem (adaptado de Helmlin *et al.*, 1996 e Maurer *et al.*, 2000)

na urina na forma de conjugados com o ácido glucurónico ou com o ião sulfato (Lim e Foltz, 1988; Helmlin *et al.*, 1996).

Paralelamente, a MDMA e os seus metabolitos podem sofrer desaminação com formação de fenilacetonas, que são, em seguida, oxidadas originando os respectivos ácidos benzóicos. Estes são excretados na urina após conjugação com a glicina e formação dos respectivos hipuratos (Lim e Foltz, 1988; Maurer *et al.*, 2000).

É importante salientar a existência de diferentes fenótipos para a debrisoquina 4-hidroxilase (*CYP2D6* ou citocromo P450 2D6). Esta enzima integra a superfamília de enzimas do sistema enzimático citocromo P450 e é a principal enzima envolvida na desmetilação da MDMA. A actividade metabólica da *CYP2D6* está diminuída em cerca de 5-9% da população caucasiana (Tucker *et al.*, 1994). Estes indivíduos poderão ser mais susceptíveis aos efeitos agudos da MDMA, uma vez que esta não sofre metabolização, mas em contrapartida menos vulneráveis aos seus efeitos por administração repetida, uma vez que a produção de metabolitos tóxicos está diminuída. Este facto poderá explicar as diferenças observadas na susceptibilidade aos efeitos tóxicos da MDMA em diferentes indivíduos (ver Kovar, 1998).

A MDMA é excretada essencialmente por via urinária, embora também tenha sido detectada em amostras de bile, suor, saliva, humor vítreo e cabelo (Kintz e Samyn, 1999). Cerca de 65% da dose ingerida de MDMA é eliminada intacta pelos rins (Verebey *et al.*, 1988; Lapostolle *et al.*, 1997). A maior parte da dose ingerida é excretada nas primeiras 24 horas (Lapostolle *et al.*, 1997; Fallon *et al.*, 1999). Os metabolitos resultantes da desmetilação são excretados predominantemente na forma de glucuronatos ou sulfatos. A 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (na forma conjugada) é o metabolito predominante na urina (Helmlin *et al.*, 1996).

De la Torre *et al.* (2000) observaram que a excreção urinária do metabolito 3,4-diidroximetanfetamina (HMMA) era constante independentemente da dose administrada, enquanto que para a MDMA era dose-dependente. Estes resultados apontam para uma possível saturação ou inibição do metabolismo da MDMA (etapa da desmetilação). Em

concordância com esta hipótese, verificou-se recentemente, usando microsomas hepáticos humanos, que a MDMA actua como um inibidor competitivo da CYP2D6, parecendo haver formação de um complexo metabolito-enzima responsável pela inibição do metabolismo (Wu *et al.*, 1997). No entanto, são ainda necessários outros estudos para o comprovar.

Os estudos realizados por Lim *et al.* (1992) demonstraram haver diferenças na disposição da MDMA no Rato e Ratinho. Apenas 36% da dose administrada de MDMA foi eliminada na urina e fezes de Rato ao fim de 96 horas, contrastando com 72% para o Ratinho. As diferenças observadas devem-se unicamente a diferenças na % de excreção da MDMA na forma intacta, uma vez que não se encontraram diferenças significativas na quantidade eliminada de outros metabolitos. Em ambas as espécies, o principal metabolito urinário encontrado foi a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (na forma conjugada). Estes resultados são importantes dado que diferenças no metabolismo dos xenobióticos entre as diferentes espécies são factores fundamentais para compreender as diferentes susceptibilidades aos seus efeitos tóxicos. No entanto, são ainda necessários outros ensaios para averiguar a espécie cujo perfil metabólico mais se aproxima da espécie humana.

Por fim, foi demonstrado que a farmacocinética da MDMA nos humanos é estereoselectiva. De facto, o isómero farmacologicamente mais activo S-(+)-MDMA é metabolizado e eliminado mais rapidamente que o isómero R-(-)-MDMA (Moore *et al.*, 1996; Fallon *et al.*, 1999).

2.7. TOXICIDADE DA 3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA

A dose letal 50 (LD₅₀) da MDMA foi estudada em várias espécies e para diferentes vias de administração. No rato, a LD₅₀ é de 49 mg/Kg, após administração intraperitoneal, e de 325 mg/Kg, após administração por via oral. Nos estudos em primatas não humanos o valor de LD₅₀ encontrado foi de 22 mg/Kg (i.v.) (ver Budaravi *et al.*, 1996).

A dose tóxica de MDMA para o Homem é variável. É conhecido o caso de um indivíduo que após a ingestão 150 mg de MDMA, com uma concentração plasmática de 0,424 mg/L, desenvolveu hipertermia grave e morte, enquanto que num outro caso a ingestão de 42 comprimidos, com uma concentração plasmática de 7,72 mg/L, foi assintomática (Henry *et al.*, 1992). É de salientar que o nível plasmático encontrado em alguns indivíduos intoxicados com MDMA é próximo e, em muitos casos, excede o correspondente à dose LD₅₀ para primatas não humanos (Rochester e Kirchner, 1999).

O consumo de “ecstasy” está associado ao aparecimento de vários casos descritos na literatura de morbilidade e mortalidade, principalmente em jovens. Entre os seus efeitos tóxicos citam-se a hipertermia, rabdomiólise, hiponatremia grave, coagulação intravascular disseminada, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e complicações cardiovasculares, nomeadamente hipertensão, taquicardia e arritmias cardíacas. A morte pode ocorrer por insuficiência cardíaca aguda ou acidente vascular cerebral. O uso crónico destes compostos pode levar ao aparecimento de psicoses semelhantes às observadas na esquizofrenia paranóide.

2.7.1. TOXICIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

2.7.1.1. Degeneração neuronal

O potencial neurotóxico das anfetaminas tem sido alvo de estudo intenso nas últimas duas décadas. Este efeito tóxico parece ser comum a todos os compostos de estrutura anfetamínica, embora o perfil neurotóxico não seja idêntico. A MDMA quando usada em doses moderadas é selectiva para os neurónios serotoninérgicos, enquanto que a metanfetamina é neurotóxica para ambos os neurónios dopaminérgicos e serotoninérgicos e a *d*-anfetamina moderadamente selectiva para os neurónios dopaminérgicos (Battaglia *et al.*, 1988; Axt *et al.*, 1994; Ricaurte *et al.*, 1994).

A administração em animais de experiência de doses elevadas ou repetidas de MDMA produz depleção a longo-termo de marcadores neuronais serotoninérgicos, nomeadamente dos níveis de serotonina e da actividade da triptofano hidroxilase, que é a enzima limitante da síntese de serotonina, e perda dos locais de captação da serotonina MDMA (Schmidt *et al.*, 1987; Battaglia *et al.*, 1987 e 1988; Commins *et al.*, 1987; Stone *et al.*, 1988; McKenna e Peroutka, 1990; Hewitt e Green, 1994). Estes dados, juntamente com as evidências histológicas encontradas de degeneração neuronal (Commins *et al.*, 1987; O'Hearn *et al.*, 1988; Molliver *et al.*, 1990), permitiram concluir que a MDMA possui uma acção neurotóxica serotoninérgica. A degeneração a longo-termo foi observada em muitas espécies, incluindo primatas (Insel *et al.*, 1989; Ricaurte e McCann, 1992). Os efeitos neurotóxicos da MDMA nos primatas são mais pronunciados que em ratos. De facto, a depleção de 5-HT e perda dos locais de captação de 5-HT no córtex cerebral do macaco ocorre após a administração de uma dose 10 vezes inferior à necessária para produzir neurotoxicidade em ratos (Ricaurte e McCann, 1992). Estes resultados são relevantes dado que o primata é o modelo animal cujo metabolismo mais se assemelha ao do homem. Além disso, a dose neurotóxica de MDMA ensaiada (5 mg/Kg) é muito próxima da dose normalmente consumida para fins recreacionais (Ricaurte *et al.*, 1988; Ricaurte e McCann, 1992).

Apesar dos efeitos neurotóxicos da MDMA estarem bem descritos em animais de experiência, só muito recentemente apareceram as primeiras evidências de degeneração neuronal no Homem. Técnicas inovadoras na área da neuroimagiologia, como por exemplo a tomografia de emissão de positrões (PET), permitiram verificar a diminuição do número de transportadores serotoninérgicos ligados a um marcador específico em indivíduos consumidores crónicos de MDMA (McCann *et al.*, 1998; Ricaurte *et al.*, 2000). Estes resultados em conjunto com os obtidos em estudos prévios, nos quais se observou uma diminuição no líquido cefalorraquidiano de consumidores de MDMA da concentração de ácido 5-hidroxiindoleacético (metabolito da 5-HT) (McCann *et al.*, 1994; Bolla *et al.*, 1998), constituem os primeiros indiciadores da neurotoxicidade da MDMA em humanos.

Embora o mecanismo de neurotoxicidade não esteja ainda esclarecido, tem-se verificado que o aumento prolongado e excessivo de dopamina após a administração de MDMA pode resultar em neurotoxicidade (Nash e Brodtkin, 1991). A depleção de dopamina por pré-tratamento com α -metil-*p*-tirosina (inibidor da tirosina hidroxilase) ou a destruição selectiva dos neurónios nigroestriados dopaminérgicos pela 6-hidroxidopamina atenuam a depleção a longo-termo dos níveis cerebrais de 5-HT e a subsequente degeneração serotoninérgica, decorrente da administração de MDMA (Stone *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1990; Brodtkin *et al.*, 1993). Também a administração de antagonistas dos receptores 5-HT_{2A} previne a estimulação da síntese de dopamina induzida pela MDMA e a depleção a longo-termo dos níveis de 5-HT cerebrais (Nash *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). Por outro lado, a administração concomitante de MDMA e agonistas dos receptores 5-HT_{2A} potenciou o efluxo de dopamina induzido pela MDMA e o efeito tóxico nos neurónios serotoninérgicos (Gudelsky *et al.*, 1994).

A libertação de 5-HT induzida pela MDMA leva à activação dos receptores 5-HT_{2A/2C} e, consequentemente, à diminuição dos níveis extracelulares de GABA com aumento dos níveis de dopamina (Yamamoto *et al.*, 1995). O mecanismo proposto para a degeneração dos neurónios serotoninérgicos induzida pela MDMA envolve a captação da dopamina em excesso no espaço sináptico para o interior dos neurónios (depletados em 5-HT) e a sua oxidação com formação de espécies reactivas com potencial citotóxico (Figura 5). Este é o mecanismo aceite pela maioria dos autores (Sprague e Nichols, 1995;

Gudelsky, 1996; Huether *et al.*, 1997). A desaminação oxidativa da dopamina pela monoamina oxidase leva à formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Figura 6) (Sinet *et al.*, 1980; Maker *et al.*, 1981). O H_2O_2 é susceptível de originar radicais hidroxilo ($OH\cdot$) altamente reactivos via reacção de Fenton. Assim, as elevadas quantidades de dopamina presentes no interior dos neurónios podem originar espécies reactivas suficientes para provocar o esgotamento dos mecanismos de defesa endógenos (antioxidantes). Nestas condições, a dopamina é auto-oxidada, com formação de espécies reactivas de oxigénio, como H_2O_2 , radicais superóxido e hidroxilo, e de quinonas e semi-quinonas altamente reactivas (Figura 7). Os radicais livres podem danificar componentes celulares como os lípidos, proteínas e DNA (Hastings *et al.*, 1996) e as quinonas podem reagir covalentemente com os locais nucleofílicos intracelulares (Tse *et al.*, 1976; Hastings *et al.*, 1996), formando tioéteres potencialmente citotóxicos (Monks e Lau, 1992). As semi-quinonas podem entrar num “ciclo redox” e ser re-oxidadas a quinonas, na presença de oxigénio molecular, contribuindo para a formação de quantidades acrescidas de anião superóxido (Baez e Segura-Aguilar, 1994).

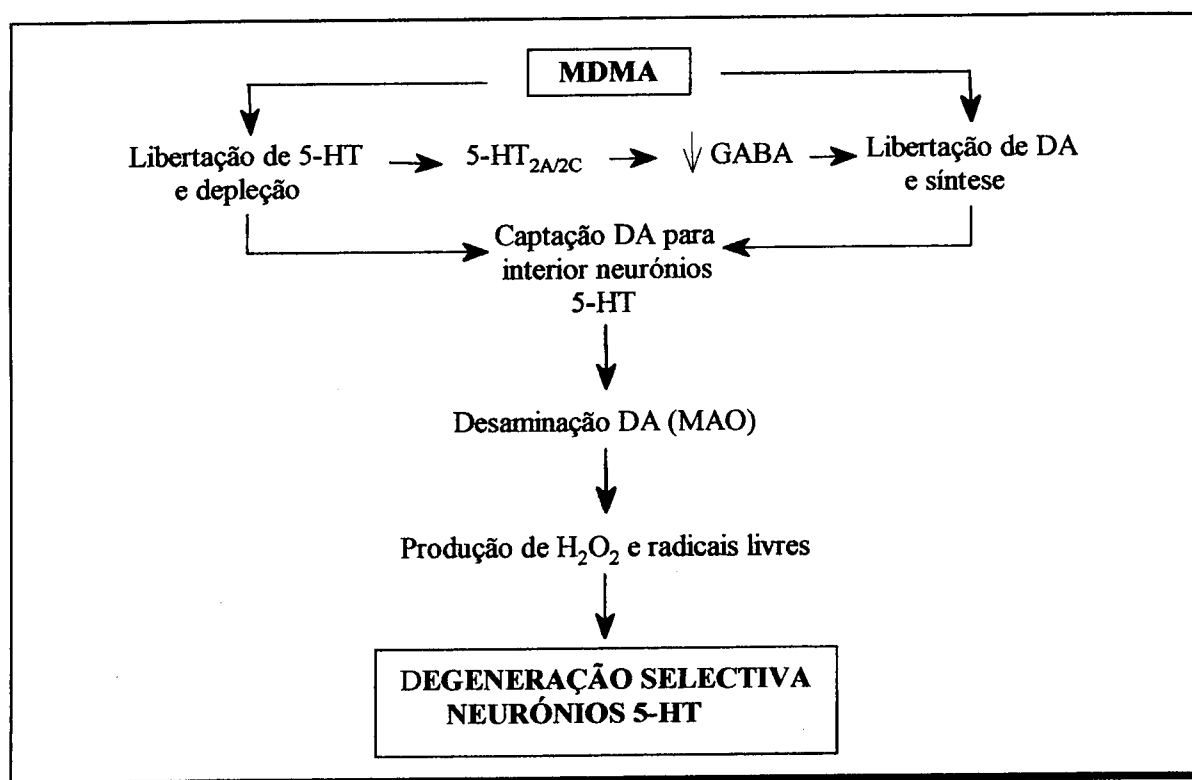


Figura 5. Mecanismo proposto para a degeneração dos neurónios serotoninérgicos pela MDMA (adaptado de Sprague *et al.*, 1998).

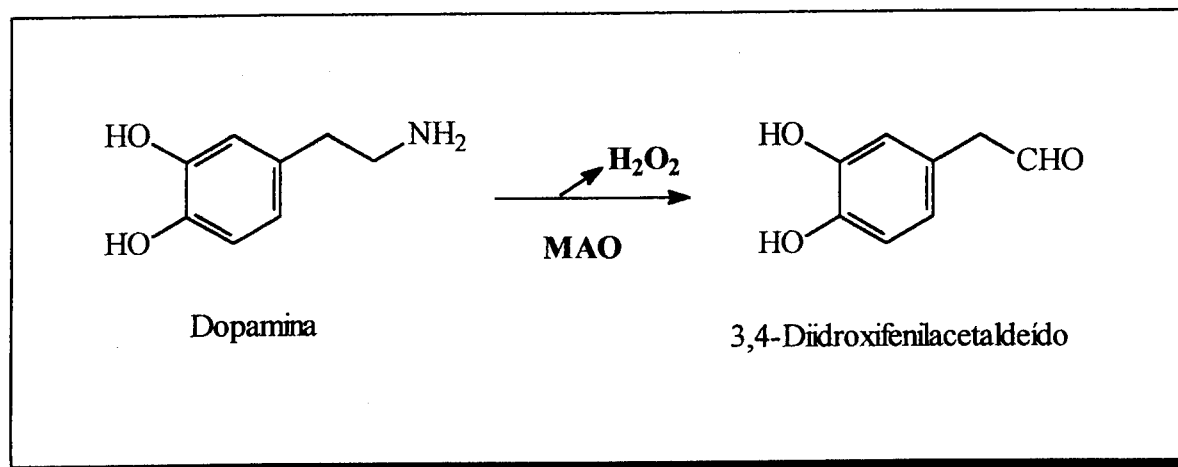


Figura 6. Desaminação oxidativa da dopamina pela monoamino oxidase (MAO).

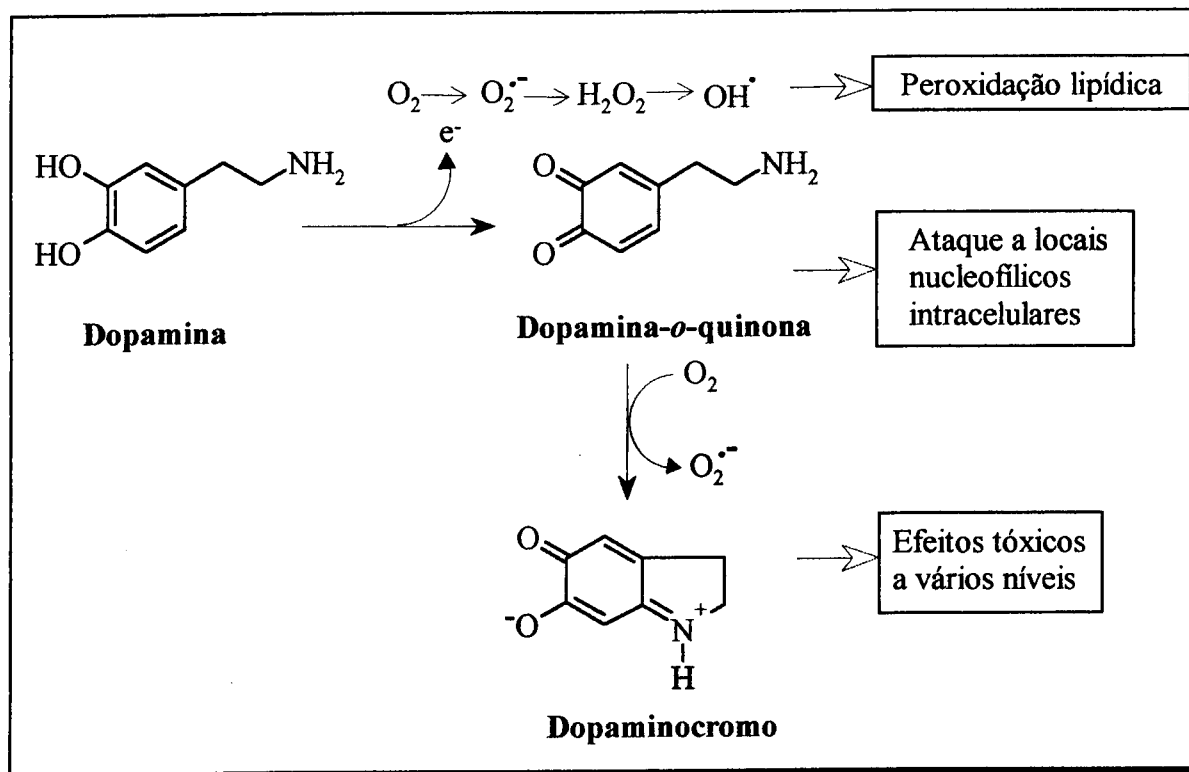


Figura 7. Mecanismo de degradação oxidativa da dopamina (adaptado de Rupp *et al.*, 1994 e Dhalla *et al.*, 1996).

Este mecanismo é suportado pelas evidências de stress oxidativo e lesões mediadas por espécies reactivas de oxigénio (Stone *et al.*, 1988; Hirata *et al.*, 1995; Colado *et al.*, 1997b e 1999; Shankaran *et al.*, 1999a) e pelo efeito protector de antioxidantes e sequestradores de radicais livres (Colado e Green, 1995; Hirata *et al.*, 1995; Gudelsky, 1996). Cadet *et al.* (1994) e mais recentemente Jahanthi *et al.* (1999) verificaram que ratinhos transgénicos capazes de expressar a enzima CuZn-superóxido dismutase (CuZnSOD) humana são mais resistentes aos efeitos neurotóxicos da MDMA. Esta enzima intracelular humana constitui a primeira linha de defesa contra o radical superóxido. Sprague e Nichols (1995) verificaram que a administração de inibidores da MAO-B (*l*-deprenil) em ratos preveniu a peroxidação lipídica e a depleção a longo-termo de 5-HT induzida pela MDMA. Por outro lado, a administração de antioxidantes, nomeadamente cisteína e ácido ascórbico ou de um sequestrador de radicais livres, como α -fenil-N-*terc*-butilnitrona, atenua a neurotoxicidade induzida pela MDMA (Colado e Green, 1995; Gudelsky, 1996). Recentemente, vários autores evidenciaram a formação *in vivo* de radicais hidroxilo após a administração intracerebroventricular de MDMA (Colado *et al.*, 1997b e 1999c; Shankaran *et al.*, 1999a e b).

No entanto, foi também proposto que a danificação oxidativa induzida pela MDMA possa resultar da formação de catecois e quinonas reactivas por oxidação da própria molécula de MDMA e/ou do seu metabolito (MDA) (Hiramatsu *et al.*, 1990; Monks e Lau, 1992; Tucker *et al.*, 1994; Gudelsky, 1996). A MDMA sofre desmetilenação, por acção do sistema enzimático citocromo P450 2D6, com formação de um catecol, o qual após oxidação a quinona, reage rapidamente com grupos tióis intracelulares (Figura 8). Os catecóis e as quinonas podem igualmente sofrer oxidação, na presença de oxigénio molecular, com formação de espécies reactivas de oxigénio ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $OH^{\cdot}$), podendo resultar em peroxidação lipídica e degeneração neuronal.

Os tioéteres formados por adição da GSH são intervenientes importantes nos efeitos tóxicos resultantes (Monks e Lau, 1992). De facto, sabe-se que estes compostos não são desprovidos de reactividade e por vezes esta reactividade é aumentada após conjugação com a glutathione ou cisteína. Os conjugados polifenólicos com a glutathione podem ainda ser oxidados com formação de quinonas-tioéteres que dada a sua reactividade podem ligar-se a uma nova molécula de glutathione. Verificou-se recentemente que os conjugados da α -

metildopamina com a glutatona (5-(glutation-S-il)- α -metildopamina e 2,5-bis(glutation-S-il)- α -metildopamina) e com a N-acetilcisteína (5-(N-acetilcistein-S-il)- α -metildopamina) quando injectados directamente no cérebro induzem depleção a longo-termo dos níveis de serotonina cerebral (Bai *et al.*, 1999).

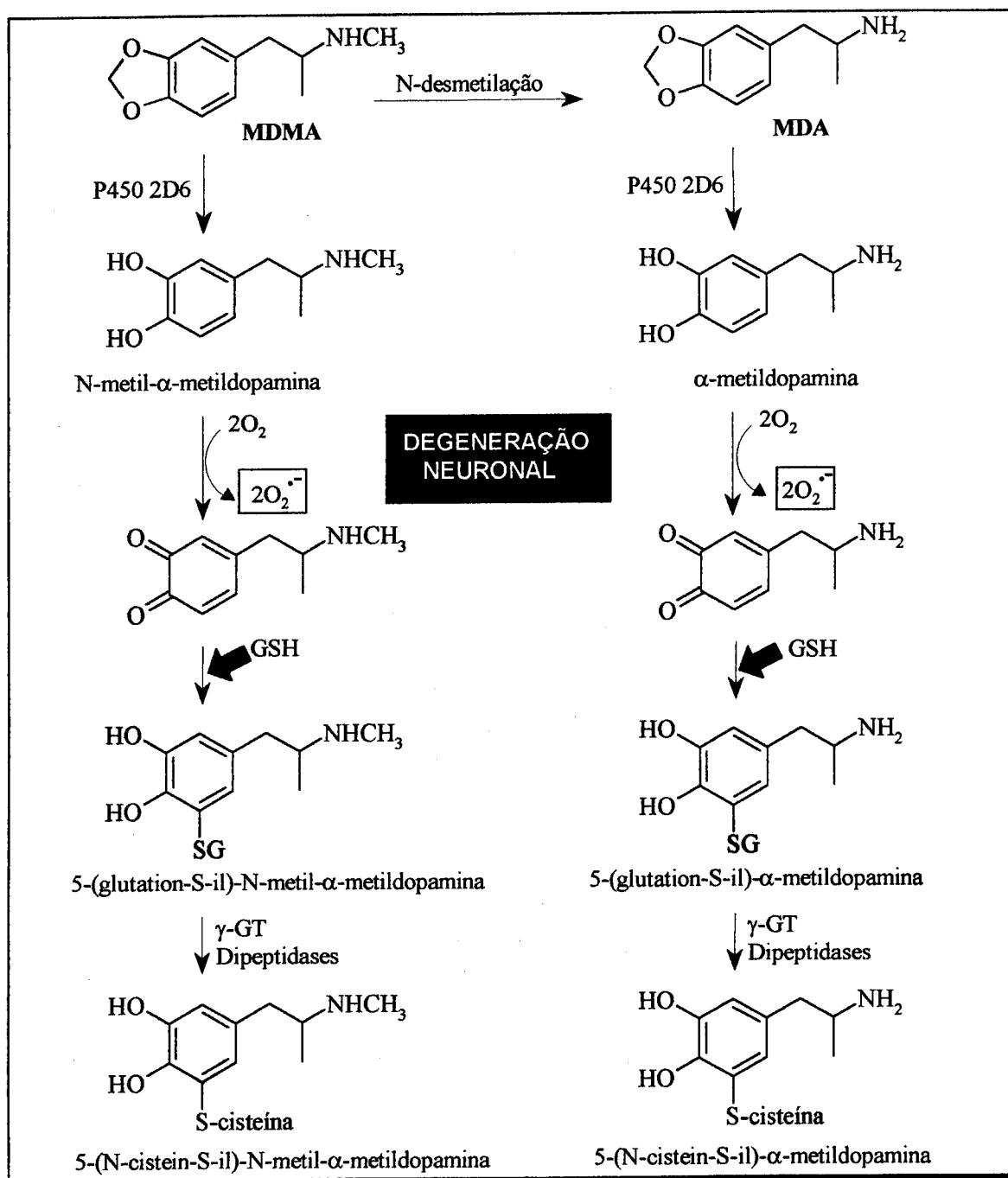


Figura 8. Mecanismo proposto para a formação de metabólitos neurotóxicos a partir da MDMA (adaptado de Monks e Lau, 1992 e 1997).

A neurotoxicidade da MDMA parece estar associada à sua metabolização a nível cerebral dado que os metabolitos potencialmente neurotóxicos são catecóis e quinonas com pouca capacidade para atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) (Hiramatsu *et al.*, 1999). A corroborar com esta hipótese verificou-se a existência a nível cerebral do sistema enzimático citocromo P450 2D6 (Lin, 1992).

Em alternativa, Monks e Lau (1997) propuseram um mecanismo que permite a passagem do conjugado catecol-GSH através da BHE baseado no seu transporte por intermédio dos transportadores de glutathione localizados na membrana endotelial. Uma vez no cérebro, este conjugado sofre acção de peptidases (γ -glutamyltranspeptidase e dipeptidases) originando o conjugado cisteína-polifenol potencialmente neurotóxico.

A temperatura corporal parece ter também um papel importante na neurotoxicidade. Vários estudos demonstraram que a supressão do efeito hipertérmico da MDMA, quer pelo uso de compostos que induzem hipotermia (por exemplo, haloperidol e dizocilpine) quer por abaixamento da temperatura ambiente, previne o seu efeito neurotóxico (Broening *et al.*, 1995; Farfel e Seiden, 1995; Malberg *et al.*, 1996; Colado *et al.*, 1998 e 1999a e b). No entanto, é importante salientar que a neurotoxicidade pode ocorrer mesmo na ausência de hipertermia (Farfel e Seiden, 1995; O'Shea *et al.*, 1998).

Por fim, os aminoácidos excitatórios também têm sido implicados na neurotoxicidade induzida pelas anfetaminas, uma vez que a administração de antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) destes aminoácidos protege dos efeitos neurotóxicos (Sonsalla *et al.*, 1991; Colado *et al.*, 1993; Farfel e Seiden, 1995). O efluxo de dopamina induzido pela anfetamina e metanfetamina estimula a libertação de glutamato (Nash e Yamamoto, 1993; Stephans e Yamamoto, 1994; Del Arco *et al.*, 1999), cuja presença em quantidades excessivas na fenda sináptica leva à morte neuronal. No entanto, ao contrário destas anfetaminas, a MDMA não induz o aumento dos níveis deste aminoácido. O efeito protector conferido por alguns antagonistas dos receptores NMDA contra a neurotoxicidade da MDMA parece estar associado à hipotermia induzida por aqueles antagonistas (Farfel e Seiden, 1995; Colado *et al.*, 1998).

2.7.1.2. Manifestações neuropsiquiátricas

O abuso de “ecstasy” como droga recreacional levou ao aparecimento de vários casos de distúrbios neuropsiquiátricos. McCann e Ricaurte (1992) descreveram dois casos de pacientes com antecedentes psiquiátricos que desenvolveram quadros psiquiátricos precipitados pelo consumo de “ecstasy”. Um dos pacientes manifestou ansiedade e depressão persistentes por mais de 4 meses e o outro apresentou alterações da percepção, perturbações de memória, ansiedade e paranóia que ainda se encontravam presentes ao fim de 2 anos de abstinência da droga. São igualmente conhecidos casos de manifestações psicóticas associadas ao consumo de MDMA em indivíduos sem história anterior de distúrbios do foro psiquiátrico (Creighton *et al.*, 1991; Series *et al.*, 1994).

As síndromes psiquiátricas associadas ao uso de MDMA incluem manifestações a curto-termo como confusão, ansiedade, insónia, distúrbios do sono (Allen *et al.*, 1993), ataques de pânico (Williamson *et al.*, 1997) e psicoses agudas (Creighton *et al.*, 1991), e manifestações a longo-termo como psicose paranóide crónica (Schifano, 1991), psicose paranóide aguda recorrente (ou “flashback”) (Creighton *et al.*, 1991), perturbações de memória (Bolla *et al.*, 1998; Morgan, 1999), estados de pânico (McCann e Ricaurte, 1992; Pallanti e Mazzi, 1992) e depressões graves com intenção suicida (Benazzi e Mazzoli, 1991; Cohen, 1996). É de salientar que estes efeitos adversos a longo-termo persistem mesmo após a metabolização completa de MDMA e muitos casos requerem intervenção psiquiátrica com medicação antipsicótica (McCann e Ricaurte, 1994).

Estas síndromes estão frequentemente associadas ao uso repetido, e normalmente em doses elevadas, de MDMA e têm sido atribuídas a disfunções do sistema serotoninérgico (Ricaurte *et al.*, 1994; Huether *et al.*, 1997).

2.7.2. TOXICIDADE NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

O consumo de MDMA pode levar ao aparecimento de efeitos cardiovasculares nefastos, nomeadamente hipertensão ou hipotensão, palpitações, arritmias, dor anginosa e colapso circulatório, podendo a morte ocorrer por insuficiência cardíaca aguda ou por acidente vascular cerebral (Murthy *et al.*, 1997; Brody *et al.*, 1998; Vollenweider *et al.*, 1998).

Pensa-se que o mecanismo de cardiotoxicidade da MDMA seja semelhante ao proposto para as restantes anfetaminas. Estes compostos promovem o aumento dos níveis de catecolaminas na fenda sináptica e na corrente sanguínea (Karch, 1993). A presença de concentrações séricas elevadas de catecolaminas pode exercer efeitos cardiotóxicos diversos ao nível dos electrólitos, da estrutura, bioquímica e membrana das células, podendo ocorrer espasmos coronários, arritmias, disfunções contractéis, danificação celular e até necrose miocárdica (para revisão ver Dhalla *et al.*, 1992 e Rupp *et al.*, 1994). Vários estudos realizados em modelos animais (Zalis *et al.*, 1967; Pentel *et al.*, 1987) e no Homem (Smith *et al.*, 1976; O'Neill *et al.*, 1983) sugerem que a cardiotoxicidade das anfetaminas seja mediada pelas catecolaminas. Os estudos patológicos realizados em vítimas do abuso de MDMA revelaram uma cardiotoxicidade com padrão histológico indiferenciável do obtido com catecolaminas (Milroy *et al.*, 1996).

2.7.2.1. CARDIOMIOPATIAS, ENFARTE DO MIOCÁRDIO E MORTE SÚBITA POR ARRITMIA

O consumo de anfetaminas está associado ao desenvolvimento de **cardiomiopatias**. Vários mecanismos foram propostos para explicar esta associação directo (ver Call *et al.*, 1982). Em primeiro, temos a agregação plaquetária induzida pelas catecolaminas. Em segundo, a hipóxia secundária a uma redução do fornecimento de oxigénio pela vasoconstrição coronariana e concomitante aumento do consumo de oxigénio pelo miocárdio, induzido pelas catecolaminas. Em terceiro, um aumento da concentração plasmática de ácidos gordos livres e redução da sua oxidação pelo miocárdio, ambos

induzidos pelas catecolaminas. Por fim, as catecolaminas podem induzir lesão endotelial ou exercer um efeito cardiotoxico. Em concordância com o possível efeito cardiotoxico directo das catecolaminas, foi descrito o caso de uma mulher consumidora crónica de anfetamina que desenvolveu cardiomiopatia dilatada com insuficiência cardíaca congestiva crónica, sem evidências de doença das coronárias, lesões valvulares ou outra causa demonstrável de falência cardíaca (Smith *et al.*, 1976).

Como já foi referido anteriormente, a presença de níveis elevados de catecolaminas pode resultar na sua auto-oxidação, com formação de quinonas e radicais de oxigénio altamente reactivos (O_2^- , H_2O_2 e $OH^\bullet$) (Figura 9). Estas espécies danificam componentes celulares, nomeadamente lípidos, proteínas e DNA (Rupp *et al.*, 1994).

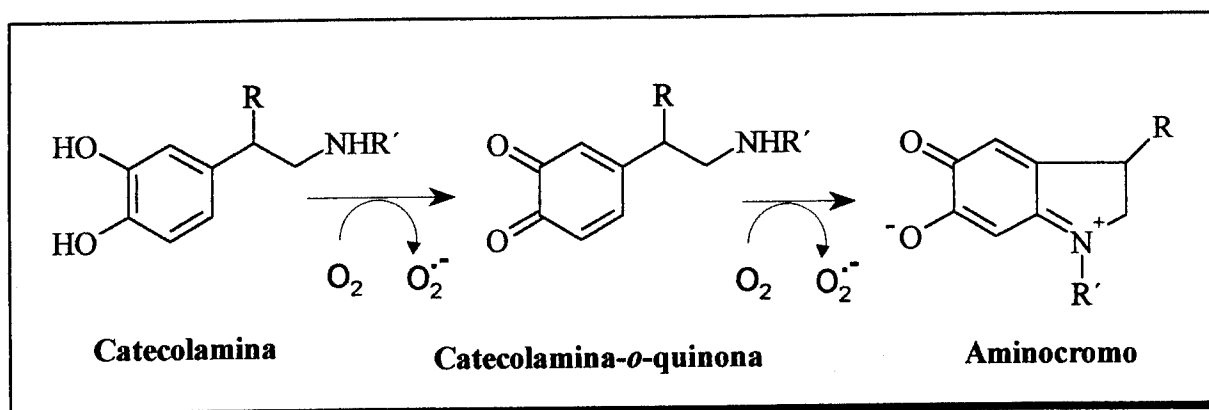


Figura 9. Mecanismo de toxicidade resultante da oxidação das catecolaminas (adaptado de Rupp *et al.*, 1994).

As quinonas formadas podem ainda sofrer ciclização com formação de aminocromos extremamente reactivos, que estão envolvidos em vários processos tóxicos, nomeadamente oxidação de grupos sulfidrílo proteicos, desacoplamento mitocondrial, inibição enzimática (MAO e fosfatase alcalina) e alterações do fluxo de Ca^{2+} , como resultado das suas acções ao nível da membrana citoplasmática, sarcoplasmática e mitocondrial (Dhalla *et al.*, 1992). Assim, a formação de quinonas e espécies reactivas de oxigénio (ROS), conjuntamente com a formação de aminocromos, parece ter uma acção importante na cardiotoxicidade induzida pelas catecolaminas (Bindoli *et al.*, 1992).

O **enfarte do miocárdio** é outra complicação cardiovascular observada ocasionalmente em consumidores de anfetaminas. O mecanismo é ainda desconhecido mas pensa-se que possa ser provocado por espasmo da artéria coronária ou por oclusão coronária por trombos plaquetários. Estes efeitos podem ser agravados pela exigência repentina de maiores níveis de oxigenação miocárdica induzida pelas catecolaminas (Packer *et al.*, 1990).

Por fim, outro efeito das catecolaminas a nível cardíaco é sensibilização do miocárdio a estímulos ectópicos, com consequente risco de arritmias (Kalant e Kalant, 1975; Hoffman e Lefkowitz, 1996). O consumo de MDMA está também associado ao aparecimento de casos de **morte súbita por arritmia** (Suarez e Riemersma, 1988). Num estudo realizado por Fitzgerald e Reid (1994), usando corações isolados de Rato, verificou-se que a MDMA induziu arritmias em 7 dos 11 corações ensaiados. Este efeito foi inibido com o uso de β -bloqueadores (propranolol) e de inibidores da captação neuronal (desipramina).

É de salientar que indivíduos com problemas cardiovasculares latentes constituem um grupo de maior risco para os efeitos cardiotoxicos induzidos pela MDMA (Dowling *et al.*, 1987).

2.7.2.2. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O abuso de drogas recreacionais é um factor de risco reconhecido de acidente vascular cerebral (AVC) em jovens e deve, por isso, ser investigado em casos de pacientes jovens apresentando quadro de AVC (Heye e Hankey, 1996).

Gledhill *et al.* (1993) descreveram o caso de uma jovem de 25 anos, consumidora usual de MDMA, que desenvolveu AVC hemorrágico após ingestão de 2,5 comprimidos de *ecstasy*. A angiografia revelou a existência de um aneurisma sacular pré-existente. Foi proposto que a elevação da pressão arterial após ingestão de MDMA, aliada a um provável

enfraquecimento progressivo da parede vascular pelo uso repetido da droga, havia sido a causa da ruptura do aneurisma.

O abuso de MDMA pode também levar ao desenvolvimento de AVC isquémico. Hanyu *et al.* (1995) relataram o caso de um jovem de 28 anos que desenvolveu AVC isquémico após a primeira dose de “ecstasy”. A MDMA promove a libertação de serotonina, que é a amina vasoconstritora mais potente na circulação cerebral, especialmente nas artérias de grande e médio calibre. Esta vasoconstrição pode estar na origem de AVC isquémico. Em alguns pacientes, a arteriografia cerebral revela vasoespasma cerebral traduzido imagiologicamente por “colar de contas” (Delaney e Estes, 1980; Cahill *et al.*, 1981; Yen *et al.*, 1994).

As anfetaminas podem ainda causar lesão directa a nível do endotélio da vasculatura cerebral e hemorragia (Delaney e Estes, 1980). Citron *et al.* (1970) demonstraram a existência de angiíte necrosante cerebral em indivíduos consumidores usuais de metanfetamina. Patologicamente, estas lesões eram indistinguíveis das observadas na poliarterite nodosa (vasculite autoimune), o que sugere um mecanismo autoimune na etiologia da vasculopatia associada às anfetaminas (Heye e Hankey, 1996).

Os sobreviventes de acidentes vasculares cerebrais ficam normalmente com sequelas neurológicas, incluindo hemiparésias, disfasias e epilepsias (Delaney e Estes, 1980).

2.7.2.3. ARTERIOPATIA TROMBOEMBÓLICA PULMONAR

Apesar da via mais comum para a administração da MDMA ser a via oral, esta pode ser injectada por via intravenosa. Quando a droga é esmagada e injectada por via intravenosa, as fibras insolúveis (celulose microcristalina, grãos de amido ou fibras de algodão) presentes no comprimido são retidas pela microvasculatura pulmonar, podendo resultar numa arteriopatia tromboembólica pulmonar (Karch, 1993).

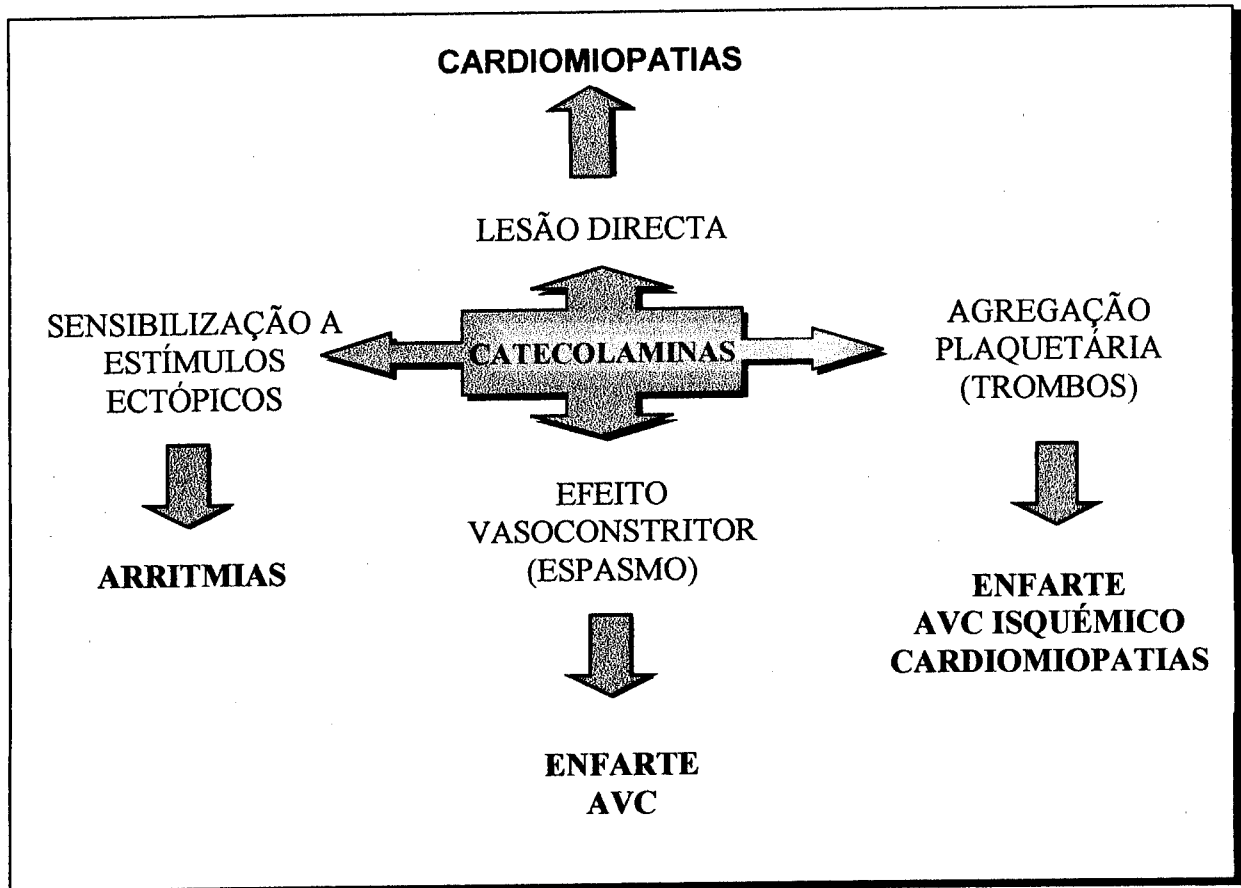


Figura 10. Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na toxicidade cardiovascular pelas catecolaminas.

2.7.3. TOXICIDADE HEPÁTICA

O consumo de MDMA como droga recreacional tem sido responsável pelo aparecimento de vários casos de falência hepática aguda em jovens. Os primeiros casos de hepatotoxicidade associada ao consumo de MDMA foram descritos em 1992 por Henry *et al.*, aos quais se seguiram muitos outros que vieram comprovar esta associação (Jones *et al.*, 1994; Dykhuizen *et al.*, 1995; Coore, 1996; Filder *et al.*, 1996; Roques *et al.*, 1998; Fineshi *et al.*, 1999). A lesão hepática induzida pela MDMA abrange desde formas benignas análogas a hepatites víricas (Dykhuizen *et al.*, 1995) a formas severas como falência hepática secundária a necrose hepática maciça (Henry *et al.*, 1992; Coore, 1996; Brauer *et al.*, 1997). Na literatura aparecem descritos alguns casos de falência hepática fulminante induzida pelo consumo de “ecstasy” que necessitaram de transplante hepático (Chenard-Neu *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1996; Brauer *et al.*, 1997; Riordan e Williams, 1999).

Andreu *et al.* (1998) relataram 5 casos de hepatite induzida pela MDMA. Todos os pacientes apresentavam doença hepática grave, com icterícia, nível sérico elevado de transaminases, hipoglicémia e reduzida actividade da protrombina mas sem ocorrência de encefalopatia hepática. A biópsia hepática de todos os pacientes revelou um padrão praticamente constante de necrose hepatocelular presente nas zonas midzonal e centrilobular do ácinos hepático. O tracto portal apresentava edema e infiltrados inflamatórios, com predomínio de eosinófilos em 2 dos casos. Foi também observado, em 3 dos casos, necrose hepatocelular focal e presença de microvesículas lipídicas nas áreas periportais. Este padrão histológico também foi observado por Milroy *et al.* (1996) em estudos *post mortem* de vítimas do consumo de “ecstasy”.

O consumo crónico de “ecstasy” pode levar ao aparecimento de fibrose hepática progressiva (Khakoo *et al.*, 1995). Recentemente, Varela-Rey *et al.* (1999) verificaram que a MDMA tem uma acção pró-fibrogénica dado ter induzido a produção de colagénio após incubação numa cultura de células Ito (responsáveis pela síntese de colagénio no fígado).

Os mecanismos envolvidos na lesão hepática induzida pela MDMA e anfetaminas em geral não estão ainda completamente esclarecidos. Alguns investigadores consideram que este efeito tóxico possa resultar de uma reacção idiossincrásica, dada a existência de vários casos em que o seu consumo não provoca lesão hepática. Num estudo realizado por Andreu *et al.* (1998) constatou-se a presença de elevado número de eosinófilos no tracto portal, o que poderá estar relacionado com algum mecanismo de hipersensibilidade. No entanto, vários factores poderão influenciar a hepatotoxicidade das anfetaminas, nomeadamente o teor de catecolaminas, a oxidação das aminas biogénicas, as variações do fluxo sanguíneo hepático, a hipertermia, além de um possível efeito directo da anfetamina e/ou dos seus metabolitos.

A oxidação das aminas biogénicas libertadas por acção da MDMA poderá contribuir para a lesão hepática. Quando ocorre a saturação das enzimas que participam no metabolismo das catecolaminas, estas sofrem auto-oxidação com formação de quinonas e radicais de oxigénio altamente reactivos. Estas espécies danificam componentes celulares, nomeadamente lípidos, proteínas e DNA. Nakagawa e Moldéus (1992) verificaram que muitos compostos de natureza quinónica provocavam a morte celular, precedida de depleção de GSH, grupos tióis proteicos e ATP. A citotoxicidade observada foi prevenida pela administração de GSH e cisteína.

Outro factor importante na indução da lesão hepática parece ser o metabolismo. Foi já demonstrado que a MDMA é metabolizada em microsomas de fígado de Rato pelo sistema citocromo P450 a aductos com a glutathione (Figura 11). O mecanismo da formação do aducto envolve a formação de um catecol, o qual após oxidação a quinona, reage rapidamente com grupos tióis (Hiramatsu *et al.*, 1990; Terrence e Lau, 1992). Paralelamente, a MDMA sofre N-desmetilação com formação da metilenodioxianfetamina, a qual origina conjugados com a glutathione pelo mesmo processo. A grande capacidade que as quinonas possuem para originar “ciclos redox”, induzir o *stress* oxidativo e formar aductos com as macromoléculas pode resultar na destruição de moléculas essenciais para a sobrevivência celular. Assim, a reacção da GSH com as quinonas corresponde muito provavelmente a um mecanismo de defesa, uma vez que as quinonas são compostos oxidantes e electrofílicos (Monks e Lau, 1997). Existem, no entanto, alguns conjugados da

GSH com grupos polifenóis (electrofilicos) que mantêm a reactividade e, por vezes, esta reactividade é ainda superior à do composto inicial (Monks e Lau, 1992 e 1997). Desta forma, os tioéteres formados pela adição de grupos SH poderão ser intervenientes importantes nos efeitos tóxicos resultantes.

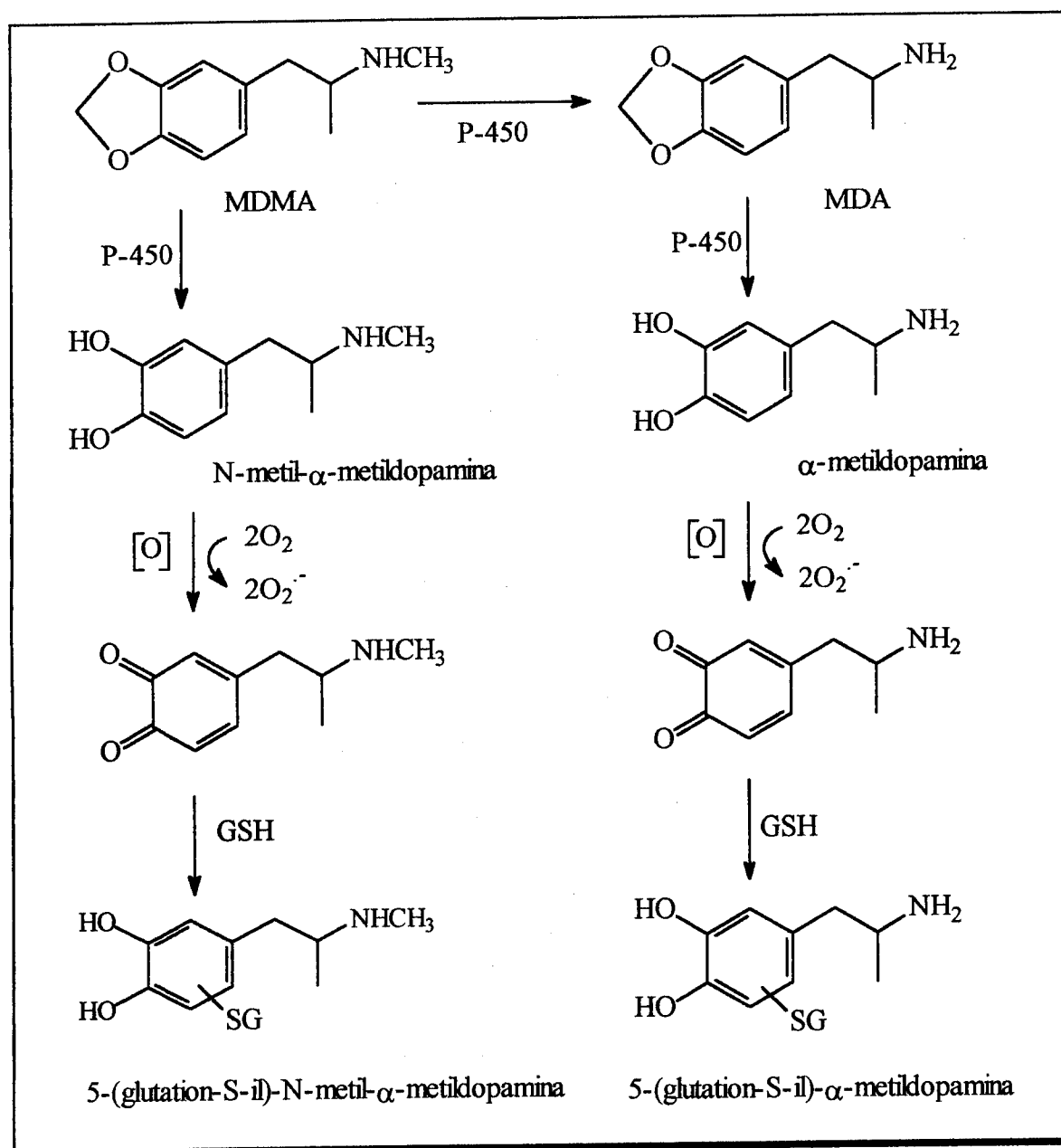


Figura 11. Mecanismo proposto para a formação do aducto da metilenodioximetanfetamina (MDMA) com a glutathiona (GSH) (adaptado de Monks e Lau, 1992).

Até ao momento apenas foi realizado um estudo *in vitro* para avaliar os efeitos hepatotóxicos da MDMA. Beitia *et al.* (1999) observaram em hepatócitos isolados de Rato que a MDMA induzia a depleção dos níveis intracelulares de GSH e de ATP. A depleção de GSH foi igualmente observada nos estudos realizados por Carvalho *et al.* (1996) com a *d*-anfetamina. A GSH participa nos processos de protecção celular contra espécies reactivas de oxigénio e contra a acção nefasta de vários xenobióticos electrofílicos. Assim, a depleção dos níveis de glutathiona hepática poderá constituir um passo inicial para a acção hepatotóxica da MDMA. No entanto, permanece ainda por demonstrar se a depleção de GSH é suficiente para causar morte celular ou se expõe as células a outros efeitos tóxicos que acontecem ao mesmo tempo *in vivo*, como poderá ser o caso da hipertermia.

A hipertermia induzida pela MDMA pode ser, pelo menos em parte, responsável pela hepatotoxicidade observada *in vivo*. Os danos hepatocelulares observados na hipertermia (Wills *et al.*, 1976) são semelhantes aos observados em vítimas do consumo de MDMA. Nos estudos realizados por Carvalho *et al.* (1997) com hepatócitos isolados de Rato verificou-se que a elevação da temperatura de incubação de 37°C para 41°C, causou depleção de GSH, aumento de GSSG, peroxidação lipídica e morte celular. Também a perfusão de fígado isolado com soluções hipertérmicas pode induzir *stress* oxidativo (Skibba *et al.*, 1991). O ataque oxidativo pode resultar em toxicidade se houver falência dos mecanismos de defesa celular (antioxidantes).

A variabilidade interindividual na susceptibilidade à toxicidade induzida pela MDMA pode ser explicada adicionalmente pela existência de um polimorfismo génico. A actividade metabólica da debrisoquina 4-hidroxilase (CYP2D6), enzima envolvida na desmetilenação da MDMA (principal via metabólica no Homem), está diminuída em cerca de 10% da população caucasiana (Tucker *et al.*, 1994). Estes indivíduos podem ser menos susceptíveis aos efeitos crónicos da MDMA (menor formação de metabolitos tóxicos) mas, em contrapartida, mais vulneráveis aos efeitos agudos da MDMA (níveis plasmáticos de MDMA mais elevados) (Malpass *et al.*, 1999).

Outro mecanismo proposto parece ser a hipóxia hepática, secundária à vasoconstrição da artéria hepática induzida pela MDMA (Roberts *et al.*, 1997).

Por fim, é importante salientar que muitos comprimidos vendidos como “ecstasy” não possuem apenas MDMA, podendo-se encontrar outros compostos, nomeadamente cafeína, efedrina, anfetaminas, LSD, MDA, MDEA e 2C-B (Winstock e King, 1996; Baudot *et al.*, 1998). Assim, dado que se trata de uma droga sintetizada clandestinamente, é possível que um contaminante hepatotóxico se possa formar durante o processo de fabrico ou possa ser adicionado ao produto final (Milroy *et al.*, 1996; Rochester e Kirchner, 1999).

Outros aspectos da patogénese da lesão hepática associada à MDMA permanecem pouco esclarecidos, como a variabilidade no intervalo entre a última exposição à droga e os primeiros sintomas de lesão hepática. Na maioria dos casos, este intervalo foi de alguns dias mas noutros foi de 2 a 3 semanas. A duração da exposição e a quantidade de droga consumida não se relacionam com a severidade da lesão hepática resultante. De facto, esta pode ocorrer após a ingestão de apenas 1 a 2 comprimidos ou aparecer somente após o uso regular durante semanas ou meses. Um caso de hepatite fulminante (Coore, 1996) e dois de hepatite aguda (Henry *et al.*, 1992; Dykhuizen *et al.*, 1995) foram descritos após a ingestão de um único comprimido de ecstasy.

O uso de MDMA deve ser investigado em jovens apresentando icterícia ou hepatomegalia sem causa aparente. Os pacientes com hepatite induzida pela “ecstasy” devem ser alertados para o perigo de voltarem a consumir a droga, devido ao risco de recaída que pode levar a falência hepática fatal ou ao desenvolvimento de hepatite crónica (Andreu *et al.*, 1998).

2.7.4. RABDOMIÓLISE E NEFROTOXICIDADE

A rabdomiólise caracteriza-se por lesão do músculo esquelético com libertação no plasma do conteúdo dos miócitos. Pode ser causada por vários factores, nomeadamente pressão elevada sobre um membro com diminuição da perfusão muscular, imobilidade prolongada ou esforço exagerado do músculo esquelético, desordens metabólicas, alcoolismo, infecções víricas, fármacos, toxinas, miopatias, coagulopatia, hipotensão, hiperpirexia e hipocalémia (Odeh, 1991). No caso das anfetaminas, a rabdomiólise parece ser provocada por exercício muscular vigoroso e exaustivo, hipermetabolismo celular, diminuição da perfusão muscular, coagulopatia, hipotensão sistémica e hipertermia (Kendrick *et al.*, 1977; Terada *et al.*, 1988). Quando ocorre rabdomiólise há libertação de mioglobina, potássio, fósforo, creatina, enzimas musculares, nomeadamente a creatinina fosfoquinase (CK) e transaminase glutâmica-oxaloacética (GOT) e difosfato de adenosina (Kendrick *et al.*, 1977; Karch, 1993). A libertação muscular da CK, creatina e provavelmente de difosfato de adenosina pode originar agregação plaquetária (Kendrick *et al.*, 1977). Além disso, a libertação de um activador do plasmogénio muscular, a hipertermia e as catecolaminas podem provocar fibrinólise excessiva (Kendrick *et al.*, 1977; Terada *et al.*, 1988). O conjunto destes factores acaba por induzir um estado de coagulação intravascular disseminada, o qual contribui para a nefrotoxicidade (Kendrick *et al.*, 1977). Os danos renais também aparecem quando a mioglobina, ou os produtos da sua decomposição, causam obstrução e degeneração tubular (Odeh, 1991; Karch, 1993). Pensa-se que muitas destas lesões possam ser mediadas pela formação de radicais livres, sendo de salientar que estes mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos (Karch, 1993).

Os casos de rabdomiólise associados ao consumo de MDMA são frequentemente observados em jovens após exercício muscular vigoroso e exaustivo em ambientes quentes e praticamente sem ventilação (característicos das “raves”) (Henry *et al.*, 1992; Screatton *et al.*, 1992; Murthy *et al.*, 1997; Williams e Unwin, 1997). Deste modo, o esforço muscular intenso exigido neste tipo de festas associado às elevadas temperaturas atingidas no organismo são factores predisponentes ao desenvolvimento de lesões musculares e renais.

A par da lesão renal associada à rabdomiólise, alguns relatos sugerem uma possível acção tóxica directa das anfetaminas, ou seus metabolitos, no rim. Isto foi proposto por

Foley (1984) após ter observado um caso clínico de nefrite intersticial aguda, na ausência de lesão muscular e hiperpirexia.

A MDMA sofre metabolização no fígado com formação de aductos com a glutathiona (ver Fig. 11, pág. 37). O posterior efluxo hepático e metabolismo de fase III dos conjugados da glutathiona pela γ -glutamyltranspeptidase (que existe em elevada quantidade no rim), dipeptidase e N-acetiltransferase resultam na formação de conjugados com a cisteína e a N-acetilcisteína (Figura 12).

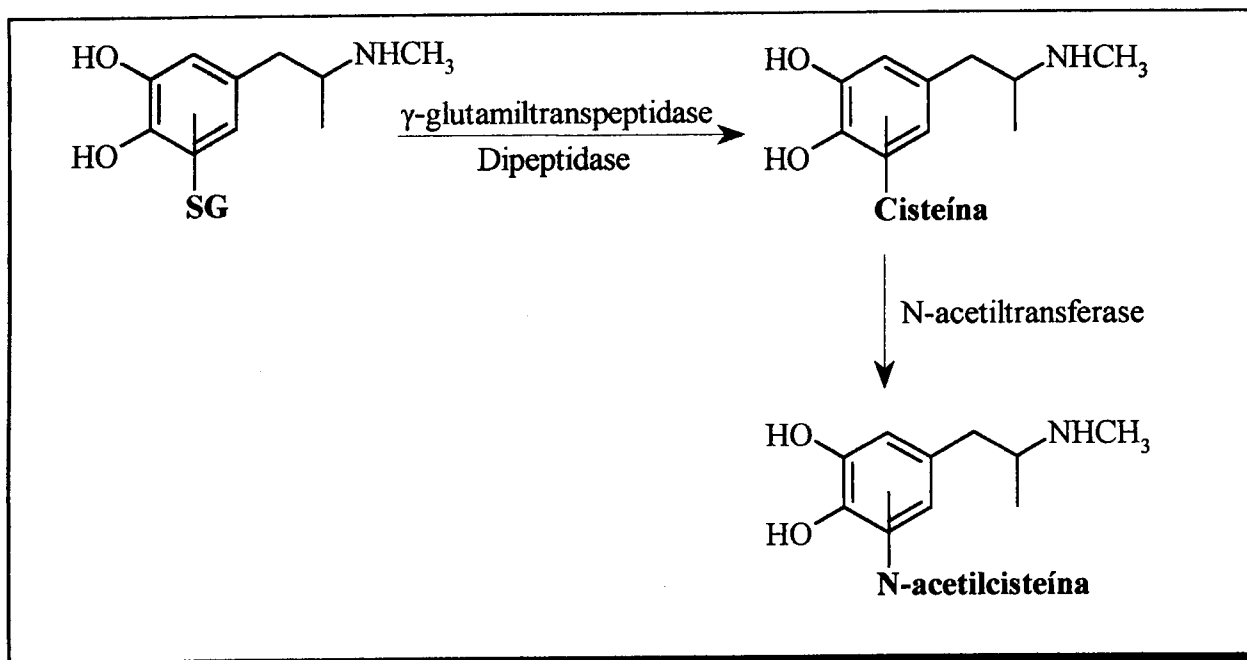


Figura 12. Metabolismo do conjugado 5-(glutathion-S-il)-N-metil- α -metildopamina (adaptado de Monks e Lau, 1997).

Os conjugados da GSH com vários polifenóis têm demonstrado ser nefrotóxicos em animais de experiência (Monks e Lau, 1997). Esta nefrotoxicidade é uma consequência da actividade particularmente elevada de γ -GT na parte externa das membranas das células epiteliais renais. Assim, as reacções de hidrólise ou de transpeptidação catalizadas por esta enzima têm lugar extracelularmente, e o produto final da reacção, o dipéptido cisteinilglicina é o substrato para as dipeptidases que têm também a mesma localização (Tate, 1980). Os conjugados com a cisteína são transportados através da membrana das células epiteliais do túbulo proximal pelo sistema de transporte de aminoácidos, acabando

por exercer a sua toxicidade no interior da célula, normalmente por um mecanismo de ataque electrofílico a macromoléculas vitais (Monks e Lau, 1997).

Para além da rabdomiólise e do possível efeito directo da MDMA e/ou metabolitos no rim, outros factores como a hipotensão, a vasoconstrição renal, a hipertermia (Kendrick *et al.*, 1977; Terada *et al.*, 1988) e a angiíte necrosante (Citron *et al.*, 1970) podem também contribuir para os danos renais verificados.

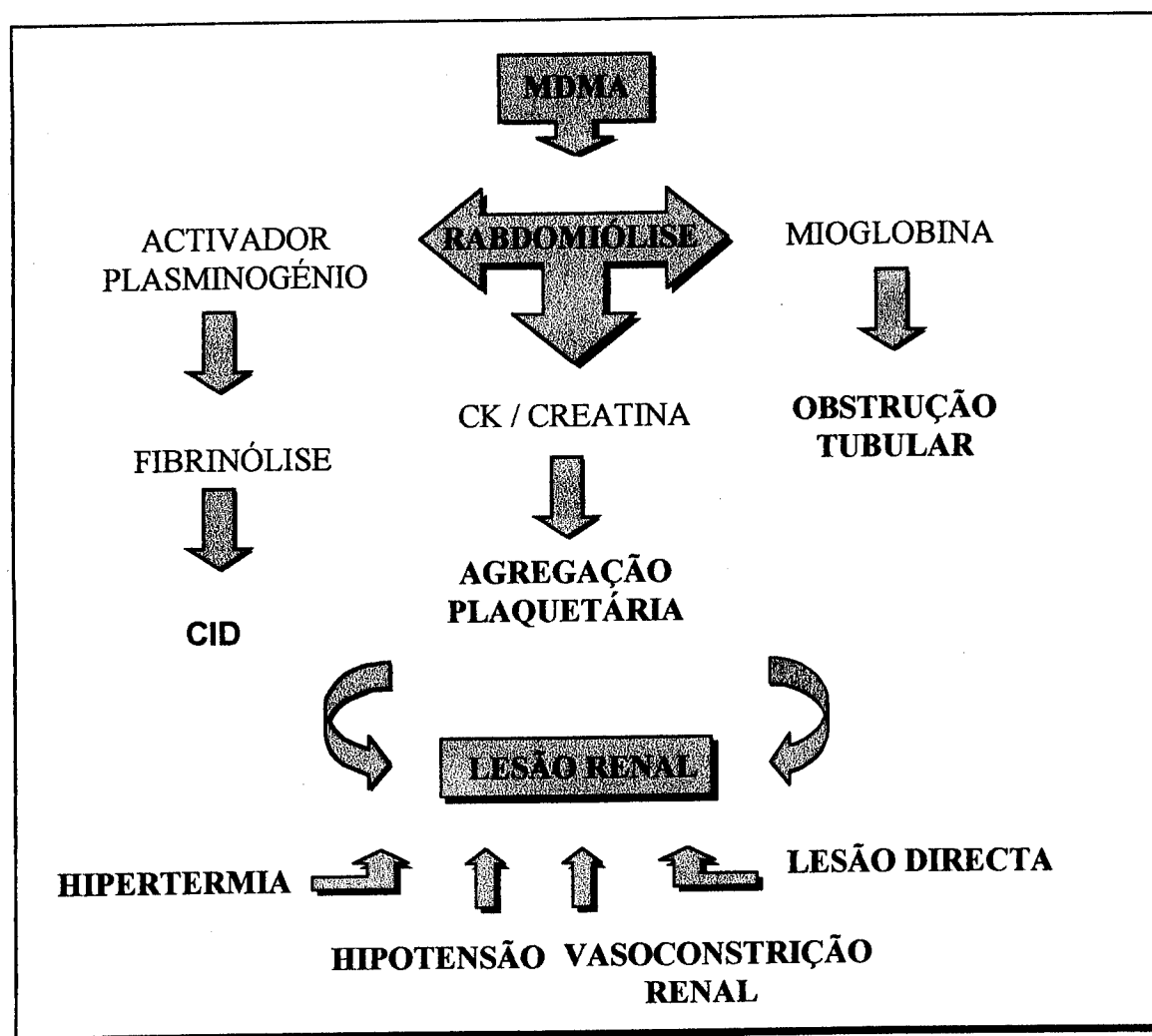


Figura 13. Representação esquemática dos mecanismos propostos para a rabdomiólise e lesões renais induzidas pela MDMA.

2.7.5. HIPERTERMIA

A hipertermia é uma complicação grave observada frequentemente em indivíduos intoxicados com MDMA. Em alguns casos, a mortalidade associada ao consumo de MDMA está claramente relacionada com a elevação da temperatura corporal até níveis letais, a qual pode atingir temperaturas da ordem dos 43°C (Henry *et al.*, 1992; Screaton *et al.*, 1992; Coore, 1996; Murthy *et al.*, 1997; Walubo e Seger, 1999). As temperaturas não letais podem levar ao agravamento da rabdomiólise, das lesões renais e de outros efeitos tóxicos destes compostos, contribuindo para uma maior morbidade (Dar e McBrien, 1996).

A hipertermia induzida pela MDMA parece estar associada à estimulação serotoninérgica do centro da temperatura no hipotálamo (Gordon *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1995; Walubo e Seger, 1999). No entanto, vários factores parecem também estar envolvidos, nomeadamente o aumento da actividade motora acompanhado por um estado hipermetabólico do músculo esquelético e a diminuição da perda de calor através da pele devido à vasoconstrição periférica induzida pelas catecolaminas (Gordon *et al.*, 1991). Recentemente, Denborough e Hopkinson (1997) demonstraram que a MDMA induz a libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático, causando contracção muscular sustentada, que contribui para a hipertermia.

O efeito hipertérmico induzido pela MDMA parece não estar relacionado com a quantidade de droga consumida. Na literatura encontra-se descrito um caso em que a ingestão de um único comprimido de "ecstasy" (50-150 mg) resultou em hipertermia severa e morte (Dar e McBrien, 1996), enquanto em um outro caso a ingestão de 42 comprimidos (concentração plasmática de 7,72 mg/L) foi assintomática (Henry *et al.*, 1992). Um factor que poderá contribuir para as diferenças observadas na susceptibilidade à toxicidade induzida pela MDMA é a existência de um polimorfismo génico. Indivíduos com actividade metabólica da *CYP2D6* (enzima envolvida na metabolização da MDMA) diminuída podem ser mais vulneráveis aos efeitos hipertérmicos da MDMA (Malpass *et al.*, 1999).

Por outro lado, verificou-se que a disfunção do sistema termorregulador em animais de experiência administrados com MDMA é fortemente condicionada pela temperatura ambiente. De uma forma geral, temperaturas ambiente baixas (4-15°C) provocam hipotermia, temperaturas intermédias produzem uma resposta bifásica de hipotermia seguida por hipertermia, enquanto temperaturas elevadas (28-30°C) causam hipertermia severa (Gordon *et al.*, 1991; Dafters, 1995; Farfel e Seiden, 1995; Malberg e Seiden, 1998). Isto é importante visto a “ecstasy” ser normalmente consumida em locais de temperatura ambiente elevada, o que, conjuntamente com a hiperactividade motora e o estado de desidratação, poderá potenciar os seus efeitos no sistema termorregulador e levar a uma hipertermia fulminante (Henry *et al.*, 1992; Huether *et al.*, 1997).

O organismo reage à agressão da hipertermia com a síntese de proteínas de choque térmico conhecidas como “heat shock proteins” (HSP), sendo as mais comuns as HSP 70. Estas proteínas funcionam como agentes de protecção, tornando as células mais termotolerantes. Lu e Das (1993) verificaram que a administração de anfetamina em Ratos induzia a expressão das HSP 70 de uma forma diferencial nos vários órgãos, sendo esta indução mais expressiva no rim, moderada no coração e pulmão, e ausente no cérebro e fígado. Isto sugere que certos órgãos possam ter maior capacidade de tolerância aos efeitos térmicos induzidos pelas anfetaminas (Jones e Simpson, 1999).

Tanto quanto se sabe, ainda não foi estudado o efeito da MDMA na expressão destas proteínas.

2.7.6. TERATOGENICIDADE

O consumo de MDMA tem vindo a aumentar, principalmente no seio das classes mais jovens, sendo preocupante a sua utilização por mulheres em idade fértil. É bem conhecido o potencial teratogénico de algumas anfetaminas, tendo sido documentado elevada frequência de partos prematuros, nado-mortos, atraso de crescimento intrauterino, atresia do tracto biliar e problemas cardiovasculares (Schardein, 1980; Ericksson *et al.*, 1994; Stewart e Meeker, 1997).

Num estudo prospectivo, levado a termo em 1998 pela "UK National Teratology Information Service" (NTIS) e que envolveu 136 gestações de mães consumidoras de MDMA, foram encontradas várias anomalias nos recém-nascidos, como clinodactilia, plagiocefalia, hipoplasia do 1º arco costal, pé boto unilateral e bilateral, estenose pilórica, ausência completa dos membros superiores ou, em menor extensão, da clavícula e omoplata, e observados vários casos de prematuridade e abortos espontâneos (McElhatton *et al.*, 1999).

Até ao momento, não foram desenvolvidos muitos ensaios na investigação da acção teratogénica da MDMA. São conhecidos apenas alguns estudos para avaliação da acção neurotóxica da MDMA durante o desenvolvimento embrionário. Estes estudos realizados tanto *in vivo* (St. Omer *et al.*, 1991; Bronson *et al.*, 1994; Colado *et al.*, 1997a; Aguirre *et al.*, 1998) como *in vitro* (Weissman e Caldecott-Hazard, 1995) não evidenciaram quaisquer efeitos neurotóxicos da MDMA, contrariamente ao observado com outras anfetaminas.

Muitos esforços têm sido desenvolvidos nos últimos anos no sentido de tentar explicar os mecanismos envolvidos no efeito teratogénico das anfetaminas. Um dos mecanismos propostos foi a possível interferência das anfetaminas com a função transportadora da placenta (Ganapathy *et al.*, 1999). A placenta expressa grandes quantidades de transportadores de noradrenalina e serotonina (Balkovetz *et al.*, 1989; Ramamoorthy *et al.*, 1992), os quais constituem alvos de ligação para as anfetaminas. A função destes transportadores consiste no transporte destas aminas do sangue materno para o sinciciotrofoblasto, onde existe grandes quantidades de catecol O-metiltransferase e

monoamina oxidase A (enzimas responsáveis pela degradação das catecolaminas). As anfetaminas podem interferir directamente com estes transportadores (Ramamoorthy *et al.*, 1995), bloqueando o transporte de noradrenalina e serotonina e sendo transportadas como substratos alternativos para dentro do sinciciotrofoblasto. Daqui resulta a presença de elevadas quantidades de noradrenalina e serotonina ao nível das vilosidades placentárias e consequente vasoconstricção das artérias uterinas, com diminuição do fluxo sanguíneo para a placenta, e contracção do miométrio uterino. Estes efeitos poderão ter sérias consequências na função placentária e no desenvolvimento do feto, uma vez que a diminuição do fluxo sanguíneo levará a uma diminuição do fornecimento de nutrientes e oxigénio e o aumento da contractilidade do miométrio levará a um aumento do risco de partos prematuros (Ganapathy *et al.*, 1999). Em concordância com este mecanismo, foi relatado o caso de uma mãe viciada em metanfetamina que gerou um nado-morto, cujo exame *post-mortem* era consistente com anoxia intra-uterina (Stewart e Meeker, 1997).

A placenta possui também receptores sigma-1 (Ramamoorthy *et al.*, 1995b), que parecem adquirir actividade imunossupressora quando ligados à progesterona, por inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), IL-6 e factor de necrose tumoral- α 1 (FNT- α 1) e aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Ganapathy *et al.*, 1999). Esta imunossupressão ao nível da interface feto-materna parece ser importante para a não rejeição do feto e prosseguimento da gravidez. A anfetamina poderá competir com a progesterona na ligação a este receptor, com os consequentes efeitos deletérios na implantação e gestação.

No entanto, são necessários mais estudos na área da teratogenicidade para a completa elucidação dos mecanismos envolvidos.

2.7.7. IMUNOTOXICIDADE

A modulação do sistema imune é uma das possíveis consequências do consumo de anfetaminas. Estas parecem intervir de modo diferencial nas respostas imunológicas, dependendo do composto e do parâmetro imunológico em estudo.

O sistema imune existe em equilíbrio dinâmico com o sistema neuronal e endócrino. Certos factores do sistema imune, como as citocinas, parecem modular o sistema nervoso central. Em contrapartida, o SNC parece influenciar a resposta imune através dos sistemas nervoso simpático e neuroendócrino.

A MDMA actua ao nível dos sistemas monoaminérgicos centrais, levando à libertação do factor de libertação de corticotropina hipotalâmico e consequente activação do sistema hipotalâmico-pituitário-adrenal. Desta activação resulta um aumento da secreção da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e consequentemente de corticosterona (Budziszewska *et al.*, 1981; Yau *et al.*, 1997), com actividade imunossupressora. A leucopenia, observada após a exposição à MDMA, parece ser resultante deste aumento da concentração plasmática de corticosterona (Freire-Garabal *et al.*, 1991).

Paralelamente, a MDMA parece desempenhar um efeito imunomodulador por acção ao nível do sistema nervoso simpático, com libertação de catecolaminas. Foi demonstrado que a activação dos receptores β_2 -adrenérgicos, presentes nos macrófagos e linfócitos, diminui as respostas imunológicas celulares e a actividade “natural killer” (NK) dos linfócitos (Irwin *et al.*, 1990; Freire-Garabal *et al.*, 1992).

Para além desta acção indirecta sobre os sistemas nervoso simpático e neuroendócrino, a MDMA poderá influenciar igualmente o sistema imunitário por acção directa sobre as células alvo. Os linfócitos possuem na sua membrana transportadores com elevada afinidade para a serotonina (Faraj *et al.*, 1994), o que poderá facilitar a captação de MDMA para o interior destas células, possibilitando uma intervenção directa na função linfocitária.

Em estudos realizados por House *et al.* (1994 e 1995) verificou-se que a exposição *in vitro* à MDMA levava a um aumento significativo da produção pelos linfócitos T de interleucina-2 (IL-2), na presença de concentrações baixas, e a uma diminuição desta citocina para concentrações elevadas (100 μ M). A IL-2, à semelhança das restantes citocinas, possui uma importante actividade imunoreguladora. Paralelamente também se observou a supressão da indução de linfócitos T citotóxicos. Outro parâmetro estudado foi a actividade dos linfócitos "Natural Killer" (NK), capazes de destruir certas células alvo sem prévia exposição ao antígeno (Ritz, 1988). Verificou-se que esta actividade era ligeiramente aumentada por exposição à MDMA. Nestes estudos não se observaram alterações significativas ao nível dos linfócitos B.

Estes resultados foram confirmados recentemente por Pacifici *et al.* (1999).

Os primeiros estudos *in vivo* do efeito da MDMA nas respostas imunológicas foram realizados recentemente por Connor *et al.* (1998 e 1999) em ratos. O objectivo destes estudos consistiu na avaliação do efeito da exposição aguda à MDMA no número de leucócitos circulantes e na resposta funcional dos linfócitos à estimulação mitogénica com fitohemaglutinina. Paralelamente, foram determinados os níveis plasmáticos de corticosterona, tendo sido observado um aumento significativo para doses iguais ou superiores a 10 mg/Kg. Verificaram uma redução significativa do número de linfócitos circulantes após a administração de uma dose igual ou superior a 7,5 mg/Kg de MDMA, concomitante com o aumento da concentração plasmática de corticosterona. Uma explicação possível para este efeito parece ser o fenómeno da marginalização linfocitária (isto é, os linfócitos migram do sangue periférico para outros compartimentos, como gânglios linfáticos, baço, medula óssea, placas de Peyer) e o fenómeno da apoptose linfocitária, ambos induzidos pela corticosterona. Não se observou qualquer alteração na contagem absoluta de neutrófilos e monócitos.

Verificou-se, curiosamente, um decréscimo na proliferação linfocitária em resposta ao mitogénico (fitohemaglutinina), independentemente da dose de MDMA administrada e dos níveis plasmáticos de corticosterona. Estes resultados sugerem que esta diminuição da proliferação linfocitária possa ser mediada por um mecanismo independente de glucocorticóides.

É interessante constatar que em estudos realizados com a anfetamina também se verificou uma supressão drástica da proliferação dos linfócitos e este efeito foi igualmente independente da secreção de corticosterona (Pezzone *et al.*, 1992). A activação do sistema nervoso simpático por este composto parece estar envolvido na mediação deste efeito, tendo-se verificado que a supressão da proliferação dos linfócitos pela anfetamina foi revertida por antagonistas dos receptores β -adrenérgicos periféricos. No entanto, são ainda necessários muitos outros estudos *in vivo* e *in vitro* para elucidar este e outros mecanismos envolvidos na imunomodulação pela MDMA.

2.8. TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO

Não existe um tratamento específico para a intoxicação provocada pela MDMA. O tratamento é muito semelhante ao utilizado em indivíduos intoxicados por anfetaminas e consiste essencialmente na estabilização das funções vitais e no tratamento de sintomas específicos (Shields, 1990; Lapostolle *et al.*, 1997; Rochester e Kirchner, 1999). É peremptório proceder-se à avaliação do estado cardio-respiratório do indivíduo e à verificação da existência de eventuais arritmias ou crises hipertensivas. Sempre que possível deve-se obter um relatório detalhado das circunstâncias da intoxicação. Se a ingestão tiver ocorrido no intervalo precedente de 30 a 60 minutos, o tratamento de eleição consiste na lavagem gastrointestinal e posterior administração de carvão activado e sorbitol. É importante a colheita de sangue para a contagem diferencial de células e para a quantificação de vários parâmetros bioquímicos, nomeadamente marcadores de lise hepática, enzimas cardíacas (especialmente nos casos de angina ou disritmias), creatinina cinase, entre outros. É igualmente importante o exame toxicológico ao sangue e urina, com quantificação de alcoolémia. Outros exames auxiliares de diagnóstico são a radiografia torácica e a tomografia axial computadorizada (TAC) cerebral, este último no caso de perturbações mentais persistentes.

- Tratamento sintomático em fase aguda:
 - administração de oxigénio para o tratamento de depressão respiratória;
 - administração de fluidos endovenosos e eventualmente de substâncias inotrópicas (dopamina, norepinefrina ou dobutamina) para o tratamento de hipotensão;
 - benzodiazepinas ou butirofenonas para o tratamento de agitação e convulsões;
 - fentolamina ou nitroprussiato de sódio (bloqueadores α) para o tratamento de hipertensão;
 - lidocaína para o tratamento de arritmias ventriculares;
 - nitroglicerina para o tratamento de angina do miocárdio;

- mantas hipotérmicas e banhos gelados para o tratamento de hipertermia. O uso de dantroleno (inibidor da libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático) também pode ser eficaz no tratamento da hipertermia.
- manitol e bicarbonato para o tratamento de rabdomiólise. A diurese alcalina forçada com manitol e bicarbonato é recomendada dado promover a “clearance” da mioglobina e, desta forma, reduzir os seus efeitos tóxicos no rim (Better e Stein, 1990; Schwartz e Miller, 1997). A fluidoterapia deve compensar a perda de líquidos ocorrida na diurese.
- correcção de distúrbios electrolíticos (acidose metabólica);

Ao contrário do que é normalmente referido para o tratamento da intoxicação por anfetaminas, a acidificação da urina, cujo objectivo seria acelerar a excreção da MDMA, não é aconselhável, uma vez que potencia a toxicidade renal devida à mioglobina.

- Tratamento após estabilização clínica:

- monitorização cardíaca contínua, com determinação da tensão arterial, frequência cardíaca e respiratória, e saturações de oxigénio;
- introdução de um cateter de Foley para quantificação do débito urinário;
- avaliação frequente dos parâmetros hematológicos e bioquímicos para despiste de alterações metabólicas, hepatotoxicidade, rabdomiólise e coagulação intravascular disseminada (CID).

Antes da alta clínica, dever-se-á proceder à avaliação de eventuais perturbações emocionais, psicoses ou outros distúrbios de foro psiquiátrico. Os casos clínicos graves poderão necessitar de sedação com clorpromazina ou haloperidol.



2.9. DEPENDÊNCIA

O uso frequente de MDMA provoca uma diminuição gradual dos efeitos desejados, o que leva a uma perda de interesse por parte dos consumidores. Isto poderá explicar a existência de poucos casos conhecidos de dependência de “ecstasy”. No entanto, o uso repetido e prolongado de MDMA parece preencher alguns dos critérios de dependência definidos pela “American Psychiatric Association” (ver O’Brien, 1996) nomeadamente induzir tolerância, despertar forte desejo de voltar a consumir a droga apesar de se conhecer os potenciais efeitos nefastos e provocar sintomas físicos de privação. Muito recentemente, Jansen (1999) descreveu 3 casos de indivíduos que desenvolveram um quadro de dependência após terem consumido quantidades elevadas de MDMA durante vários meses. É importante referir que vários factores de carácter social ou psicológico poderão ter um papel crucial no aparecimento de alguns casos de dependência.

CAPÍTULO III

Estudo da Hepatotoxicidade da 3,4- Metilenodioximetanfetamina

Ensaio In Vivo

III. Estudo da hepatotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina: ensaios in vivo

3.1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho, optou-se por usar o ratinho Charles River, como modelo animal, para o estudo *in vivo* dos efeitos hepatotóxicos da MDMA. A razão desta escolha baseou-se na quantidade limitada de amostra de MDMA disponível para os ensaios e no facto de os ensaios com este modelo animal não terem sido ainda muito explorados.

Neste estudo é dado particular ênfase ao estudo da hipertermia induzida pela MDMA. O estudo deste factor é importante visto estar frequentemente associado ao consumo de “ecstasy” (Henry *et al.*, 1992; Murthy *et al.*, 1997; Walubo e Seger, 1999). Assim, um dos objectivos deste trabalho consistiu no estudo, em ratinhos Charles River, da relação entre a dose e o efeito hipertérmico induzido pela MDMA.

Foi já demonstrado que a disfunção do sistema termorregulador em animais de experiência administrados com MDMA é fortemente condicionada pela temperatura ambiente (Gordon *et al.*, 1991; Farfel e Seiden, 1995; Malberg e Seiden, 1998). Assim, outro objectivo deste trabalho foi o estudo da influência da temperatura ambiente no efeito hipertérmico e na hepatotoxicidade induzido pela MDMA. Para tal, os ensaios foram realizados a duas temperaturas ambientes, $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. O estudo deste factor é importante visto a “ecstasy” ser normalmente consumida em locais de temperatura ambiente elevada (como, por exemplo, festas “rave”), o que pode ser crucial para a expressão da toxicidade da droga (Henry *et al.*, 1992; Huether *et al.*, 1997).

Para a avaliação da hepatotoxicidade da MDMA procedeu-se à quantificação de vários parâmetros bioquímicos no plasma e fígado e ao exame histológico de cortes de fígado. Tendo em conta o papel da glutathione nos processos de protecção celular e ao facto de ter sido demonstrada, em estudos anteriores, a depleção de GSH por acção da MDMA (Hiramatsu *et al.*, 1990; Beitia *et al.*, 1999) considerou-se importante a avaliação do conteúdo hepático em GSH ao fim das 24 horas após a administração de MDMA. Atendendo ao facto de o conteúdo hepático em GSH poder ser influenciado pelo efeito anoréctico induzido pela MDMA, este estudo foi realizado em animais com livre acesso à ração e em animais mantidos em jejum.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Materiais utilizados

Todos os reagentes usados nas experiências tinham grau analítico. O ácido 2-tiobarbitúrico, o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), o ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), a redutase da glutathione (EC 1.6.4.2), a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), a forma reduzida da glutathione (GSH), a forma oxidada da glutathione (GSSG), a albumina sérica bovina (fracção V), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o Triton X-100 foram adquiridos à Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo., USA). O hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3), o carbonato de sódio (Na_2CO_3), o hidrogenofosfato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), o sulfato de cobre (CuSO_4), o tartarato de sódio e potássio tetraidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o reagente de Folin Ciocalteu, o Triton X-100, o ácido perclórico e o ácido tricloroacético foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os solventes usados em HPLC tinham grau de pureza "Lichrosolv" e eram da marca Merck. A água usada na fase móvel para HPLC foi bidesionizada.

A 3,4-metilenodioximetanfetamina foi uma oferta da United Nations Drug Control Program (Viena, Austria). Na fase final deste estudo a MDMA foi obtida por síntese no Laboratório de Química Orgânica desta Faculdade.

3.2.2. Animais

Utilizaram-se ratinhos macho outbred Charles River CD1, com peso aproximado de 30 g, adquiridos no Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, em Oeiras.

Os animais foram divididos em 4 grupos, de 5 animais cada, e aclimatizados em gaiolas de polietileno de rede metálica no topo, acamadas com aparas de madeira, numa temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, humidade entre 40 e 60%, e ciclos dia/noite de 12/12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração padrão e água *ad libitum*, no nosso biotério, pelo menos duas semanas antes da sua utilização.

Os ensaios tiveram início sempre entre as 9 e as 10 horas da manhã.

As experiências foram realizadas tendo presentes as linhas de orientação de "Principles of Laboratory Animal Care" (Publicação NIH nº 85-23, revista em 1985).

3.2.3. Protocolo experimental

1. Divisão dos animais em 4 grupos, de 5 animais cada, e pesagem dos animais;
2. Administração (i.p.) de diferentes doses de MDMA: 5 mg/Kg, 10 mg/Kg e 20 mg/Kg e de soro fisiológico ao grupo controlo;
3. Colocação dos animais em câmaras de temperatura regulável. Foram realizadas experiências a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas;
4. Medição da temperatura corporal dos animais ao longo do ensaio;

Após 24 horas:

5. Pesagem e anestesia dos animais;
6. Recolha de sangue para a quantificação dos níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina;
7. Remoção e pesagem do fígado;
8. Divisão do fígado em 4 porções para a determinação:
 - dos níveis de glutathione reduzida
 - da extensão da peroxidação lipídica
 - da actividade de enzimas antioxidantes (catalase, transferase da glutathione, redutase da glutathione, peroxidase da glutathione e dismutase do superóxido)

- e para o estudo histológico.

O estudo foi conduzido em duas séries de ensaios:

- 1ª SÉRIE - os animais tiveram livre acesso à ração padrão e água *ad libitum*, ao longo das 24 horas do ensaio.
- 2ª SÉRIE - os animais foram privados de ração (mantidos em jejum), com água *ad libitum*, ao longo das 24 horas do ensaio.

Em ambas as séries, o estudo foi realizado a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. Administração da MDMA

As soluções de MDMA (5, 10 e 20 mg/Kg) foram preparadas em solução de NaCl 0,9% (w/v) e injectadas intraperitonealmente num volume de 1 ml/Kg. Os animais controlo foram injectados apenas com a solução salina.

Após a administração, os animais foram colocados em câmaras (Tecniplast, Itália) em ambiente de temperatura constante de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

3.2.5. Medição da temperatura corporal

A medição da temperatura corporal foi realizada apenas nos animais da primeira série de ensaios (livre acesso à ração). Para isso, foi implantado subcutaneamente no dorso de cada animal um transdutor de temperatura (BMDS IPTT-100, Plexx BV, 6660 AE Elst, Holanda). Estes transdutores (aprox. 14 mm comprimento, 2 mm largura) foram implantados, 24 horas antes do início de cada ensaio, através de um dispositivo acoplado a uma agulha, evitando anestesiá-los. A leitura da temperatura corporal foi feita recorrendo a uma sonda portátil (DAS-5007) mantida a uma distância de cerca de 2 cm do transdutor.

Estes transdutores apresentam a vantagem de reduzir o *stress* dos animais inerente ao manuseamento e de permitir uma leitura da temperatura com a frequência necessária.

As leituras foram efectuadas imediatamente antes da injeção de MDMA e com intervalos de 15 minutos na 1ª hora do ensaio, 30 minutos na 2ª e 3ª horas e 60 minutos nas horas seguintes. A medição da temperatura foi suspensa 10 horas após o início do ensaio, tempo para o qual se verificou um valor igual e constante da temperatura nos vários grupos em estudo.

3.2.6. Quantidade de ração ingerida

Um dos efeitos bem conhecidos da MDMA é a diminuição do apetite. Para determinar a quantidade de ração ingerida procedeu-se à sua pesagem no início e no final de cada ensaio.

Os resultados foram expressos em g de ração ingerida por 100 g de peso corporal.

3.2.7. Relação peso do fígado/peso corporal

Os animais foram pesados imediatamente antes da administração de MDMA (dia anterior) e após as 24 horas do ensaio (dia do sacrifício). No final do ensaio, o fígado foi removido, lavado com solução salina, seco em papel de filtro e pesado.

Os resultados foram apresentados na forma de relação entre o peso do fígado e o peso corporal dos animais no dia anterior ao sacrifício e no dia do sacrifício.

3.2.8. Quantificação dos níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina

Os níveis séricos das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são os marcadores bioquímicos de lise hepática mais vulgarmente usados (Sturgill e Lambert, 1997). Estas enzimas encontram-se em altas concentrações nos hepatócitos, estando presentes no citoplasma e mitocôndria. A ALT é altamente específica para o fígado enquanto que a AST se encontra também presente no coração, cérebro, rim e músculo esquelético. Os níveis séricos destas enzimas estão elevados em todos os tipos de lesão hepática (Marshall, 1995), daí a importância do seu estudo.

Contrariamente às transaminases, a fosfatase alcalina (ALP) é essencialmente um marcador de lesão colestática (ver Plaa e Charbonneau, 1994). Esta enzima é pouco específica para o fígado, encontrando-se igualmente presente nos leucócitos, ossos e rim.

Neste trabalho, procedeu-se à colheita do sangue da veia cava inferior em seringas heparinizadas, o qual foi posteriormente transferido para tubos heparinizados (Aptaca) e centrifugado a 6000 r.p.m. durante 10 minutos para separação do plasma. Os níveis plasmáticos de ALT, AST e ALP foram determinados usando kits apropriados (Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica) em analisador automático (Cobas Mira S). Os resultados foram expressos em unidades de enzima por litro (U/L).

3.2.9. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida

A glutathiona (γ -glutamilcisteinilglicina) é o tiol não proteico mais importante nos organismos vivos e encontra-se presente em praticamente todas as células de mamíferos, onde a sua concentração intracelular é relativamente alta (entre 0,5 e 10 mM), sendo o fígado o órgão mais rico neste tripeptídeo (> 7mM) onde ela é sintetizada (Kretzschmar e Klinger, 1990).

Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG: forma oxidada da GSH). Em situações normais, a GSSG representa apenas uma pequena fracção da

glutathione total (5%). No entanto, em situações de *stress* oxidativo, o quociente GSH/GSSG pode estar diminuído, uma vez que a GSH é consumida com formação de GSSG. A glutathione na forma oxidada pode ser reduzida a GSH por acção da enzima glutathione reductase (ver 3.1.11.2).

Em virtude da sua reactividade devida ao grupo SH presente no resíduo de cisteína, a GSH tem um papel importante na homeostase celular e na protecção contra vários agressores celulares (DeLeve e Kaplowitz, 1991). A glutathione pode reagir com espécies reactivas de oxigénio (ROS), que compreendem radicais livres e formas moleculares de oxigénio, de duas formas:

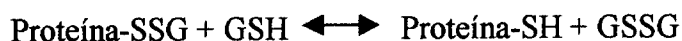
- actuar como redutor, originando GSSG, mediante reacção catalisada pela glutathione peroxidase (ver 3.1.11.4), ou
- reagir directamente com os radicais livres levando à formação do radical glutathione tiolo (GS[•]):



O radical tiolo pode dimerizar e formar GSSG:



A GSH contribui para a manutenção do equilíbrio sulfidriló-dissulfureto proteico e do potencial redox celular através da sua acção antioxidante:



Este potencial é essencial para a funcionalidade de certas proteínas, nomeadamente enzimas, como as ATPases dependentes de Ca^{2+} (vitais para a manutenção dos níveis plasmáticos de cálcio livre).

A GSH funciona como sequestrador nucleofílico, ligando-se covalentemente a compostos electrofílicos. Está igualmente envolvida na regeneração do ácido ascórbico e vitamina E (α -tocoferol) e na inibição da peroxidação lipídica (para revisão ver Sciuto, 1997).

Por todas estas acções conclui-se que a GSH tem um papel muito importante na defesa celular e a sua depleção pode resultar na exacerbação da toxicidade provocada pelos xenobióticos. É portanto de grande significado toxicológico a monitorização dos seus níveis celulares.

Neste trabalho, a determinação dos níveis de GSH foi realizada num de sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detecção electroquímica, de acordo com a técnica desenvolvida por Remião *et al.* (artigo submetido).

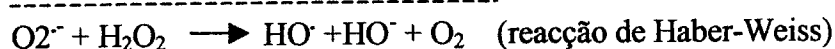
Técnica:

- Pesou-se uma porção de fígado (± 500 mg) que foi colocado num tubo de ensaio contendo 5 ml de ácido perclórico a 5% (mantido em gelo).
- As amostras foram homogeneizadas (Ultra-Turrax) até se obter uma suspensão homogénea e, em seguida, centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 10 minutos numa centrífuga refrigerada (4°C).
- O sobrenadante resultante de cada uma das amostras foi congelado (-20°C) até à altura da análise por HPLC.

Os valores obtidos foram convertidos em μmol de GSH por g de fígado.

3.2.10. Determinação da extensão da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um processo mediado por radicais livres. Numa situação de *stress* oxidativo pode haver falência dos mecanismos de defesa endógenos (antioxidantes) com formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), capazes de ataque oxidativo a lípidos membranares. A espécie oxidante mais reactiva é o radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$). A formação deste radical ocorre facilmente no organismo na presença de metais de transição, tais como o ferro e o cobre.



Dada a sua elevada reactividade e baixa capacidade de difusão, o radical hidroxilo ataca moléculas próximas ao local onde é formado, essencialmente lípidos. Este radical é capaz de abstrair um hidrogénio das duplas ligações dos ácidos gordos presentes nas membranas celulares, iniciando-se assim o processo de peroxidação lipídica (Figura 14). O radical lipídico formado ($\text{L}^\cdot$) é convertido sucessivamente a radical peroxilo ($\text{LOO}^\cdot$) pela entrada de O_2 , a hidroperóxido (LOOH) e radical alcóxido ($\text{LO}^\cdot$) pela reacção de Fenton. A consequente fragmentação dá origem a hidrocarbonetos como o etanol e a aldeídos como o 4-hidroxinonenal e o malonildialdeído. Este processo propaga-se cíclica e continuamente, dado que estão constantemente a formar-se radicais lipídicos ($\text{L}^\cdot$). O termo do processo ocorre quando há uma condensação de radicais ou a intervenção de sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Comporti, 1998).

A peroxidação lipídica induz a destruição das membranas lipídicas (alteração da permeabilidade membranares) e a formação de ROS e outros compostos electrofílicos, como o 4-hidroxinonenal.

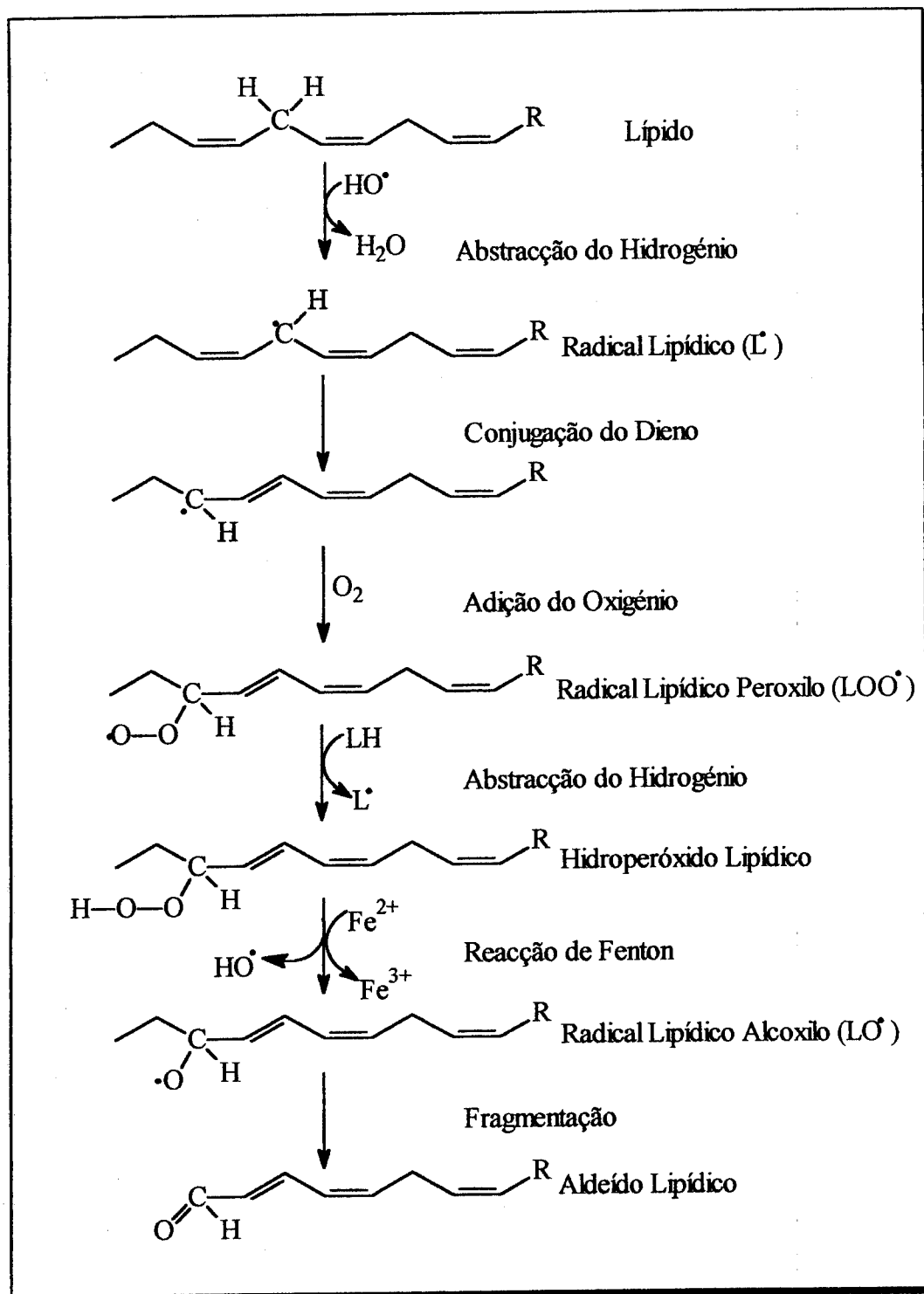


Figura 14. Peroxidação lipídica (Remião, 1998)

Neste trabalho, a extensão da peroxidação lipídica foi determinada pelo método das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm (Buege e Aust, 1978). Este método tem como princípio a reacção de uma molécula de malonildialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com formação de um complexo de cor vermelha estável.

Técnica :

- Pesou-se uma porção do fígado (± 500 mg) e colocou-se num tubo de ensaio contendo 5 ml de ácido tricloroacético a 10%.

- As amostras foram homogeneizadas (Ultra-Turrax) até se obter uma suspensão homogénea e, em seguida, centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 20 segundos.

- Retirou-se 600 μ l de sobrenadante para um tubo de ensaio, ao qual se adicionou igual volume de ácido tiobarbitúrico a 1% (solução extemporânea).

- A mistura foi aquecida durante 10 minutos em banho de água à ebulição e, após arrefecimento, leu-se a absorvência a 535 nm num espectrofotómetro Shimadzu 160.

Os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de malonildialdeído por g de fígado, usando um coeficiente de extinção de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.11. Medição da actividade de enzimas antioxidantes

Em condições fisiológicas normais há formação contínua de espécies reactivas de oxigénio (para revisão ver Halliwell, 1991). No entanto, as células possuem mecanismos de defesa antioxidantes capazes de neutralizar e minimizar os potenciais efeitos citotóxicos das ROS. Estes mecanismos incluem antioxidantes endógenos (glutathiona, vitamina A, C e E, ácido úrico) e enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona S-transferase (Figura 15). A actividade destas enzimas pode ser modificada em situações de *stress* oxidativo.

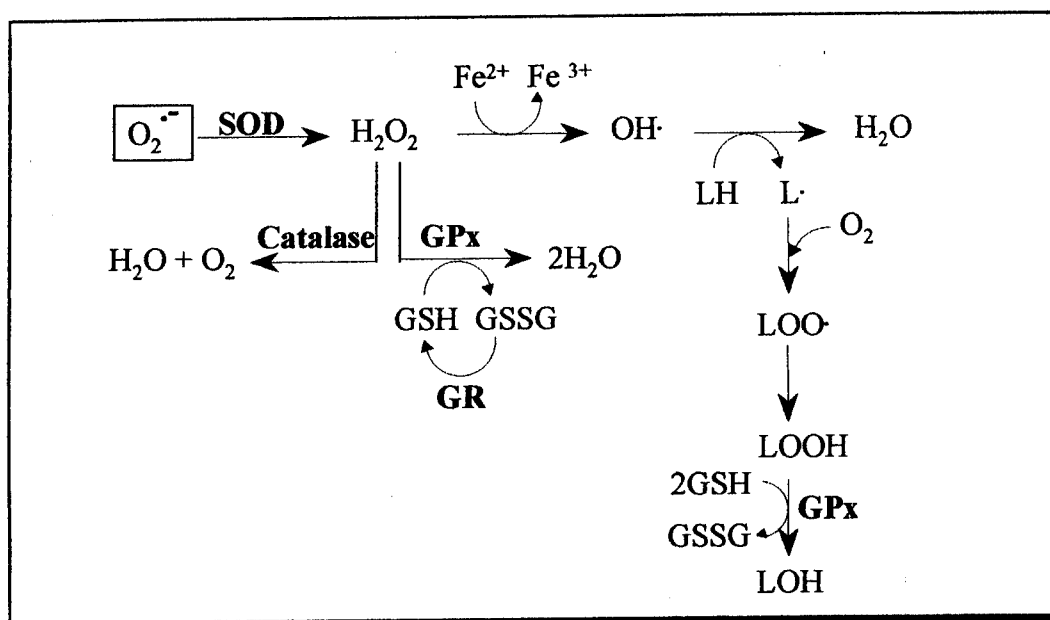


Figura 15. Enzimas antioxidantes envolvidas na defesa celular contra espécies reactivas de oxigénio (adaptado de Reed, 1998)

Neste trabalho, para a medição da actividade das enzimas antioxidantes, as amostras de fígado foram homogeneizadas (Ultra-Turrax) em 5 ml de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) com 0,1% de Triton X-100 (detergente que produz lise celular). Os homogeneizados (mantidos em gelo) foram centrifugados a 13000 r.p.m. durante 5 minutos em centrífuga

refrigerada (4°C). O sobrenadante de cada amostra foi dividido em 5 aliquotas e conservado a -20°C até altura da determinação das enzimas.

Os resultados são expressos em unidades de enzima por mg de proteína. O conteúdo proteico de cada amostra foi determinado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), que se descreve a seguir, usando uma curva padrão de albumina sérica bovina (10-200 µg/ml).

Técnica :

- Colocou-se em duplicado 100 µl de amostra (ou padrão) num “eppendorf” e adicionou-se 1 ml de reagente composto por Na₂CO₃ 2%, CuSO₄ 1% e tartarato de Na e K 2% nas proporções de 49:1:1, respectivamente.

- As amostras (ou padrões) foram agitadas em vortex e deixadas a repousar durante 10 minutos, à temperatura ambiente (formação de um complexo cobre-proteína, em meio alcalino).

- Adicionou-se 100 µl de reagente de “Folin Ciocalteau” (diluído 2× em água) e agitou-se em vortex.

- Ao fim de 30 minutos, leu-se a absorvência a 750 nm num espectrofotómetro Shimadzu 160.

As proteínas efectuem a redução do ácido misto fosfomolibdico-tungstico, originando compostos de cor azul característica, sendo a intensidade da cor directamente proporcional à quantidade de proteína presente.

3.2.11.1. Catalase

A catalase é uma enzima citoplasmática, presente nos peroxissomas, que cataliza a decomposição do H_2O_2 a H_2O . Encontra-se no fígado em níveis relativamente elevados (Somani *et al.*, 1997).

A catalase exerce uma dupla função:



(i) Decomposição de H_2O_2 , originando O_2 (actividade catalítica)

(ii) Oxidação de dadores de H, como é o caso do metanol, ácido fórmico e fenóis, com o consumo de peróxido (actividade peroxidica)

Neste trabalho, a actividade da catalase foi determinada monitorizando a decomposição do peróxido de hidrogénio a 240 nm, de acordo com o método descrito por Aebi (1984). A decomposição enzimática do H_2O_2 obedece a uma reacção de 1ª ordem, sendo a sua velocidade sempre proporcional à quantidade de peróxido presente.

Técnica :

- Programou-se o espectrofotómetro (Shimadzu 160) na função cinética, para absorção no comprimento de onda de 240 nm e com leituras de 5 em 5 segundos durante 30 segundos.

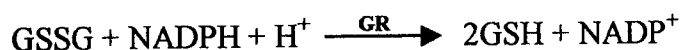
- Realizou-se a análise cinética, num espectrofotómetro de feixe duplo, juntando-se H_2O_2 10 mM à amostra diluída em tampão fosfato (KH_2PO_4 62,5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, na proporção de 1:1,5 (v/v); pH 7,0).

- Registou-se a diminuição da absorvência a 240 nm, durante 30 segundos.

Os resultados foram calculados usando um coeficiente de extinção de $0,00394 \pm 0,0002 \text{ mM}^{-1}\text{mm}^{-1}$ e apresentados em unidades (U) por mg de proteína, sendo uma unidade de catalase definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar uma μmol de H_2O_2 por minuto, nas condições do ensaio.

3.2.11.2. Glutathiona redutase

A glutathiona redutase (GR) é uma enzima essencial na manutenção do quociente GSH/GSSG, regenerando a glutathiona na forma reduzida a partir da sua forma oxidada:



A actividade da glutathiona redutase foi determinada monitorizando a oxidação do NADPH a NADP^+ a 340 nm, de acordo com o método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). Uma unidade de glutathiona redutase é definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto, nas condições do ensaio.

Técnica :

-Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção no comprimento de onda de 340 nm e com leituras de 10 em 10 segundos durante 5 minutos.

-As amostras e o branco foram colocados em triplicado em placas para leitura no leitor de placas (96 poços, de fundo liso). Em cada poço adicionou-se (num volume final de 300 μl):

-tampão fosfato-EDTA (KH_2PO_4 67 mM, EDTA 0,7 mM; pH 7,0)

-solução de GSSG 1 mM

-50 μl de amostra (ou tampão fosfato-EDTA para o branco)

-solução de NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 10 mM; pH 7,0)

-Registou-se a diminuição da absorvência a 340 nm durante 5 minutos, à temperatura de 30°C.

Os resultados foram calculados usando um coeficiente de extinção de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e apresentados em nanomoles de NADPH por minuto por miligrama de proteína.

3.2.11.3. Glutathione-S-transferase

A glutathione-S-transferase (GST) encontra-se presente no fígado em níveis elevados. Esta enzima cataliza a reacção de compostos electrofílicos potencialmente tóxicos com a glutathione, resultando normalmente na formação de tioéteres menos tóxicos e mais hidrossolúveis. Os S-conjugados são posteriormente eliminados através da bile (Sies *et al.*, 1989).

Neste trabalho, a actividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada monitorizando a formação do conjugado da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm, de acordo com o método descrito por Habig *et al.* (1974). Uma unidade de glutathione-S-transferase é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de S-2,4-dinitrofenilglutathione por minuto, nas condições do ensaio.

Técnica :

- Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção no comprimento de onda de 340 nm e com leituras de 10 em 10 segundos durante 5 minutos, a 30°C.

-As amostras foram colocadas em triplicado em placas para leitura no leitor de placas. As placas foram pré-incubadas, durante alguns minutos, no leitor de placas, à temperatura de 30°C. Em cada poço adicionou-se (num volume final de 300 µl):

-tampão fosfato-EDTA (NaHPO₄.2H₂O 83 mM, EDTA 0,8 mM; pH 6,5) colocado previamente em banho à temperatura de 30°C

-20 µl de amostra (ou tampão fosfato-EDTA para o branco)

-solução de GSH 1 mM

-solução de CDNB 1 mM

-Registou-se o aumento da absorvência a 340 nm durante 5 minutos, à temperatura de 30°C.

Os resultados foram calculados usando um coeficiente de extinção de 9,6 mM⁻¹cm⁻¹ e apresentados em nanomoles de conjugado por minuto por miligrama de proteína.

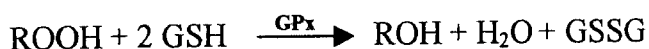
3.2.11.4. Glutathione peroxidase

A glutathione peroxidase (GPx) na forma dependente de selénio cataliza a redução do H₂O₂ com formação de GSSG e H₂O. Nesta reacção, a glutathione serve de substrato da enzima.



Esta enzima encontra-se presente no citoplasma e mitocôndria. É de realçar o facto de a nível mitocondrial não existir catalase e, por isso, apenas a GPx metaboliza o H₂O₂. Em condições fisiológicas normais, a GPx parece ser mais importante que a catalase na eliminação de H₂O₂ (Michiels e Remacle, 1988).

A GPx tem, ainda, a capacidade de reduzir hidroperóxidos orgânicos (ROOH):



A glutathiona peroxidase na forma independente de selénio é capaz de reduzir peróxidos orgânicos mas não o peróxido de hidrogénio (Kaul *et al.*, 1993).

Neste trabalho, a actividade da glutathiona peroxidase dependente do selénio foi determinada monitorizando a oxidação do NADPH a NADP^+ na presença de GSH redutase, a qual catalisa a redução da GSSG formada pela GPx, de acordo com o método descrito por Flohé e Günzler (1984).

Técnica :

-Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção no comprimento de onda de 340 nm e com leituras de 10 em 10 segundos durante 5 minutos.

-As amostras e o branco foram colocados em triplicado em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se (num volume final de 300 µl):

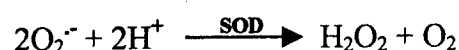
- tampão de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mM; pH 7,0)
- 30 µl de amostra (ou tampão de fosfatos para o branco)
- solução de glutathiona redutase 0,24 U/ml (em tampão de fosfatos)
- solução de GSH 1 mM
- solução de NaN_3 1 mM (em tampão de fosfatos)
- solução de Na_2EDTA 1 mM (em tampão de fosfatos)
- Pré-incubar a placa durante 10 min. à temperatura ambiente
- solução de NADPH 0,15 mM (em solução de NaHCO_3 0,1%)
- solução de H_2O_2 0,15 mM

-Registou-se a diminuição da absorvência a 340 nm durante 5 minutos, à temperatura de 25°C.

Os resultados foram calculados usando um coeficiente de extinção de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e multiplicados por 2,25 (factor usado quando a determinação é efectuada a 25°C). Os resultados finais foram expressos em unidades de enzima por miligrama de proteína, sendo uma unidade de glutathiona peroxidase definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 nmol de NADPH por minuto, nas condições do ensaio.

3.2.11.5. Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) encontra-se presente em todos os tecidos, sendo a sua actividade particularmente elevada no fígado e rim (Frederiks e Bosh, 1997). Esta enzima é responsável pela remoção de radicais superóxido com formação de peróxido de hidrogénio.



Pode conter diferentes grupos prostéticos metálicos, sendo os mais comuns o cobre e o zinco presentes na enzima citoplasmática e o manganês presente na enzima mitocondrial (Somani *et al.*, 1997).

Neste trabalho, a actividade das enzimas cobre, zinco superóxido dismutase (Cu,Zn SOD) e manganês superóxido dismutase (Mn SOD) foi determinada de acordo com o método descrito por Flohé e Ötting (1984). A velocidade de redução do ferricitocromo c por radicais superóxido foi monitorizada a 550 nm utilizando-se o sistema xantina-xantina oxidase como fonte de radicais superóxido (com transformação de xantina em ácido úrico). A SOD compete com o ferricitocromo c para estes radicais diminuindo assim a sua redução.

Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a velocidade de redução do citocromo c em 50%. Para determinar este valor de 50% de inibição foi construída uma curva padrão usando SOD bovina 5-50 ng /300 µl (concentração final no poço).

Técnica:

-Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) para absorção no comprimento de onda de 550 nm com leituras de 10 em 10 segundos durante 2 minutos, a 25°C.

-As amostras e o branco foram colocados em triplicado em placas para leitura no leitor de placas.

- **Determinação da SOD total**

Em cada poço adicionou-se (num volume final de 300 µl):

-solução A (xantina 29 µM em NaOH 0,001 N e 12 mg de citocromo c em tampão de fosfatos-EDTA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33 mM, EDTA 0,07 mM; pH 7,8); mantida à temperatura de 25°C)

-50 µl de amostra

-solução B (solução extemporânea de xantina oxidase 0,05 U/ml em EDTA 0,017 mM; mantida em gelo)

Uma vez que a actividade da xantina oxidase pode variar, deve-se utilizar enzima suficiente para originar uma velocidade de redução do citocromo c de 0,025 unidades de absorvência por minuto, no ensaio sem SOD (branco).

- **Determinação da MnSOD**

Em cada poço adicionou-se (num volume final de 300 µl):

-25 µl de amostra

-solução de KCN 0,17 mM em tampão de fosfatos-EDTA

-solução A

-solução B

-Registou-se o aumento da absorvância a 550 nm durante 2 minutos.

O cianeto de potássio permite determinar a actividade da superóxido dismutase mitocondrial por inibir a Cu,Zn SOD.

Os resultados das amostras foram calculados por interpolação na curva padrão (% de inibição versus concentração de SOD ($\mu\text{g/ml}$)) e foram apresentados em unidades de enzima por miligrama de proteína.

3.2.12. Histologia de cortes de fígado

O estudo histológico de cortes de fígado de ratinho foi realizado apenas para a 1ª série de ensaios (animais com livre acesso à ração). O fígado foi seccionado com o auxílio de um bisturi em pedaços pequenos que foram imediatamente imersos em solução de "Bouin" (composta por ácido pícrico, formaldeído (37%) e ácido acético (15:5:1)) e mantidos no fixador durante 24 horas. Resumidamente, as etapas que se seguiram foram a desidratação com álcool, a impregnação com parafina, a inclusão em blocos, o corte dos blocos no micrótomo (3 a 8 μm), a colagem dos cortes na lâmina, a desparafinação com xilol, a rehidratação, a coloração com hematoxilina e eosina-ploxina, a desidratação com álcool, o clareamento com xilol, a montagem com bálsamo, a limpeza de excessos de bálsamo e a etiquetagem.

Os cortes foram observados ao microscópio óptico, utilizando uma ampliação de 100 $\times$.

3.2.13. Análise estatística

Os resultados apresentam-se sob a forma de médias $\pm$ erros padrão, para o número de animais que será referido para cada determinação.

A análise estatística dos valores de temperatura corporal foi realizada através da análise de variância “one-way” (ANOVA) seguida do teste de Duncan (“Duncan’s Multiple Range Test”). As restantes comparações estatísticas foram feitas através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste PLSD de Fisher (“Fisher Protected Least Significant Difference”). As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

As comparações estatísticas foram confinadas a comparações dentro de cada série de ensaios (com ração e sem ração), dado que as duas séries de ensaios foram conduzidas em alturas diferentes usando animais provenientes de lotes diferentes.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Efeito da MDMA na quantidade de ração ingerida

	Ração ingerida (g)/ 100 g peso corporal			
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
20±2°C	17,8	20,1	13,7	10,0
30±2°C	14,5	14,8	13,5	9,3

Tabela 1. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na quantidade de ração ingerida, à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Cada resultado apresentado na tabela é referente a um grupo unitário de cinco animais, pelo que não foram feitas comparações estatísticas para os diferentes grupos analisados.

3.3.2. Efeito da MDMA na relação peso do fígado/peso corporal

• Dia anterior (a)

Peso fígado / peso corporal (%)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração (n=10)</i>				
20±2°C	4,85 ± 0,07	4,69 ± 0,14	4,50 ± 0,22	4,61 ± 0,19
30±2°C	4,59 ± 0,08	4,42 ± 0,08	4,32 ± 0,09	4,56 ± 0,20
<i>Sem ração (n=10)</i>				
20±2°C	3,35 ± 0,08	3,24 ± 0,07	3,22 ± 0,06	3,29 ± 0,12
30±2°C	3,39 ± 0,11	3,12 ± 0,10	3,00 ± 0,11	2,90 ± 0,08

• Dia do sacrifício (b)

Peso fígado/ peso corporal (%)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração (n=10)</i>				
20±2°C	4,92 ± 0,12	4,75 ± 0,15	4,60 ± 0,21	4,81 ± 0,21
30±2°C	4,61 ± 0,08	4,65 ± 0,09	4,49 ± 0,13	4,66 ± 0,16
<i>Sem ração (n=10)</i>				
20±2°C	3,81 ± 0,09	3,69 ± 0,09	3,72 ± 0,08	3,74 ± 0,13
30±2°C	3,79 ± 0,14	3,84 ± 0,12	3,78 ± 0,13	3,62 ± 0,10

Tabela 2. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na razão entre o peso do fígado e o peso corporal no dia anterior (a) e peso corporal no dia do sacrifício (b), à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, para o número de animais indicado. Não foram encontradas diferenças estatísticas para os diferentes grupos analisados.

3.3.3. Efeito da MDMA nos níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina

Parâmetros plasmáticos (U/l)						
	AST	ALT	ALP	AST	ALT	ALP
	20±2°C			30±2°C		
<i>Com ração (n=5)</i>						
Controlo	80 ± 12	28 ± 3	58 ± 7	63 ± 7	30 ± 4	69 ± 11
5 mg/Kg	131 ± 24	39 ± 3	33 ± 2	53 ± 5	24 ± 2	54 ± 6
10 mg/Kg	83 ± 14	30 ± 2	43 ± 7	52 ± 2	22 ± 2	64 ± 3
20 mg/Kg	59 ± 3	24 ± 3	64 ± 7	72 ± 7	39 ± 8	79 ± 7
<i>Sem ração (n=5)</i>						
Controlo	83 ± 25	56 ± 18	74 ± 17	53 ± 5	23 ± 3	64 ± 9
5 mg/Kg	64 ± 13	33 ± 8	49 ± 8	75 ± 8	35 ± 3	59 ± 5
10 mg/Kg	46 ± 5	19 ± 4	33 ± 2	75 ± 16	35 ± 8	68 ± 3
20 mg/Kg	70 ± 13	35 ± 8	47 ± 4	67 ± 8	30 ± 4	59 ± 7

Tabela 3. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA nos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, para o número de animais indicado. Não foram encontradas diferenças estatísticas para os diferentes grupos analisados.

3.3.4. Efeito da MDMA na temperatura corporal

• Ensaio à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$

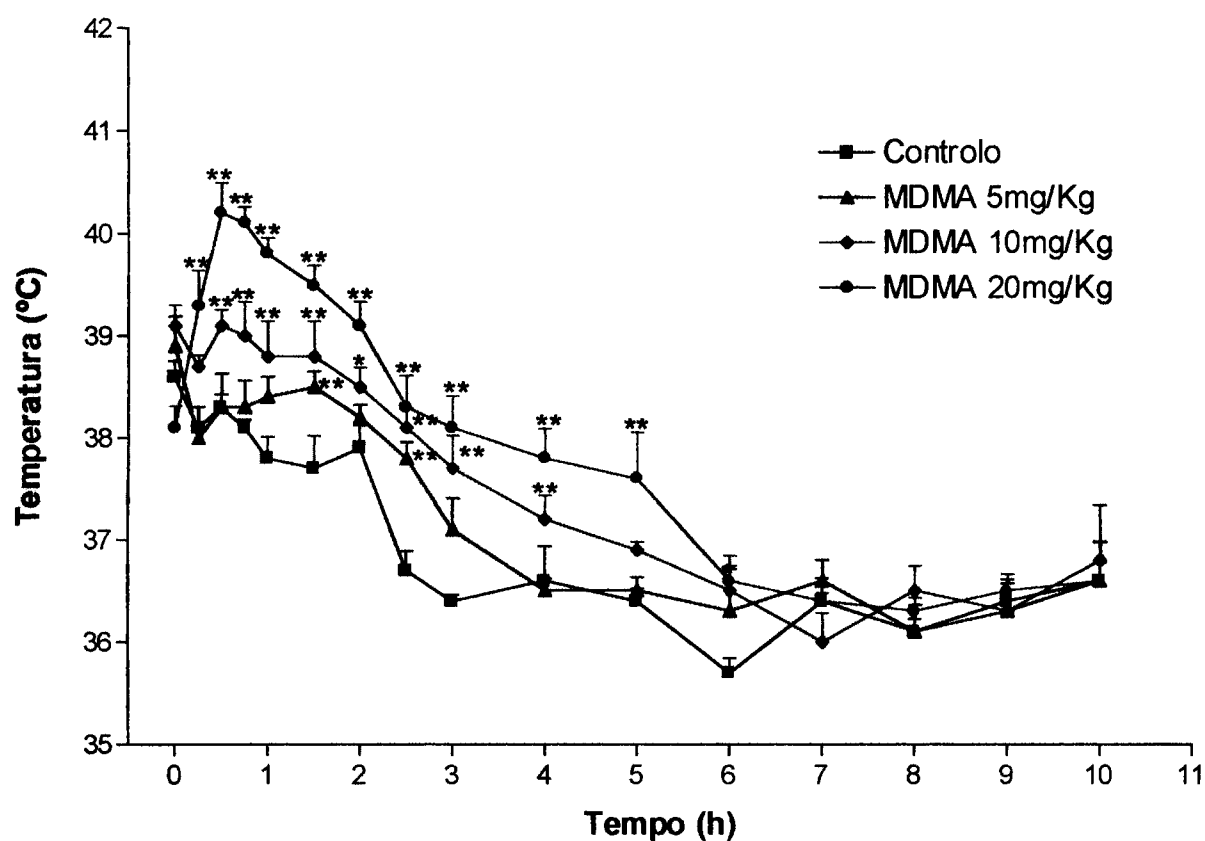


Figura 16. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na temperatura corporal, em ensaios realizados à temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Os valores são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, para 5 animais (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$: MDMA vs controlo).

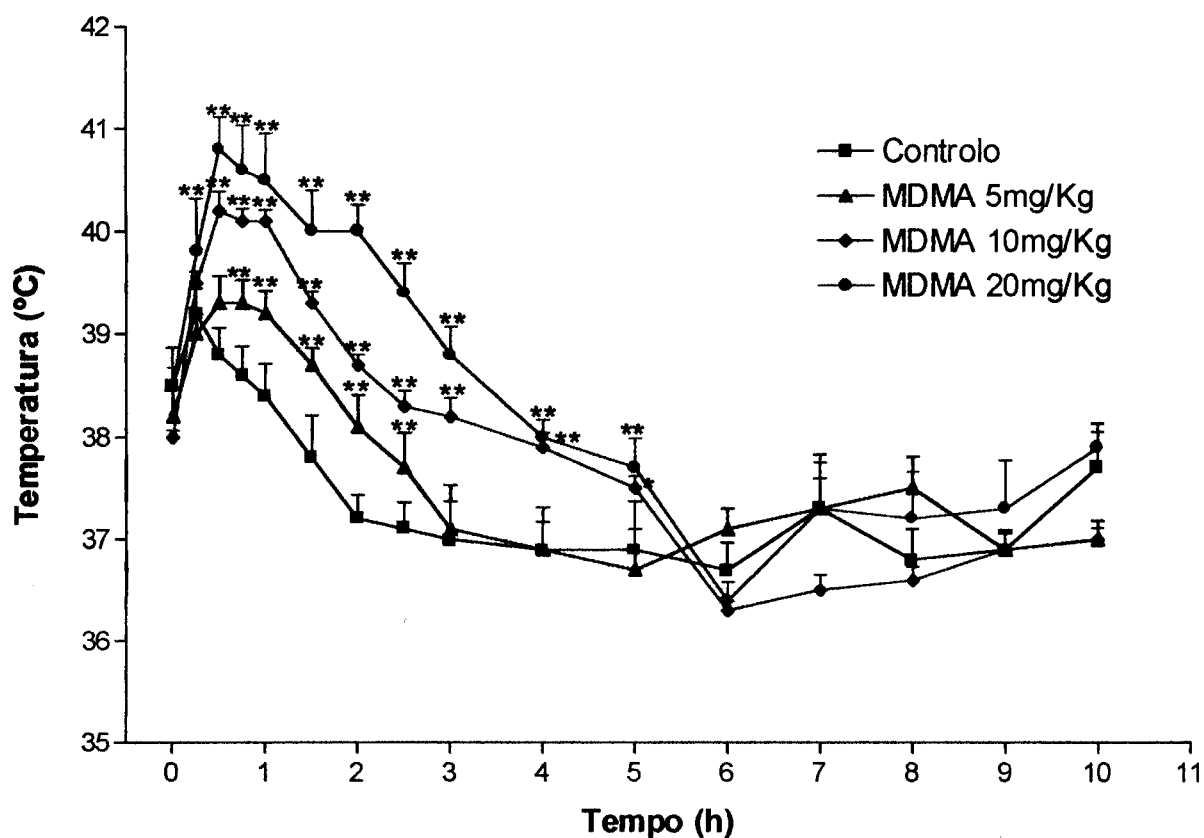
• Ensaio à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 

Figura 17. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na temperatura corporal, em ensaios realizados a uma temperatura ambiente de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Os valores são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, para 5 animais (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$: MDMA vs controlo).

3.3.5. Efeito da MDMA nos níveis de glutathione reduzida

Glutathione reduzida ($\mu\text{mol/g}$ fígado)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração (n=10)</i>				
20 $\pm$ 2°C	9,82 $\pm$ 0,50	9,32 $\pm$ 0,46	9,71 $\pm$ 0,37	8,34 $\pm$ 0,53*
30 $\pm$ 2°C	6,97 $\pm$ 0,32 ^{††}	6,64 $\pm$ 0,27	6,03 $\pm$ 0,29*	5,85 $\pm$ 0,21*
<i>Sem ração (n=10)</i>				
20 $\pm$ 2°C	4,46 $\pm$ 0,10	3,91 $\pm$ 0,18**	3,49 $\pm$ 0,09**	3,91 $\pm$ 0,09**
30 $\pm$ 2°C	4,06 $\pm$ 0,20	3,99 $\pm$ 0,13	3,61 $\pm$ 0,20	3,45 $\pm$ 0,13**

Tabela 4. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA nos níveis hepáticos de glutathione reduzida, à temperatura ambiente de 20 $\pm$ 2°C e 30 $\pm$ 2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, para o número de animais indicado (*p $\leq$ 0,05 e **p $\leq$ 0,01: MDMA vs controlo; ^{††}p $\leq$ 0,01: controlo 30°C vs controlo 20°C).

3.3.6. Efeito da MDMA na extensão da peroxidação lipídica

Peroxição lipídica (nmol malonildialdeído/ g fígado)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração</i>				
20±2°C (n=5)	13,6 ± 0,7	12,5 ± 0,4	14,1 ± 2,2	13,7 ± 1,4
30±2°C (n=5-10)	11,7 ± 1,2	11,2 ± 0,8	11,5 ± 1,5	9,97 ± 0,6
<i>Sem ração</i>				
20±2°C (n=10)	15,0 ± 1,2	13,6 ± 0,6	14,9 ± 1,1	11,8 ± 1,0
30±2°C (n=10)	15,1 ± 1,2	17,1 ± 1,5	18,1 ± 1,7	19,8 ± 1,8*

Tabela 5. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na extensão da peroxidação lipídica, à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, para o número de animais indicado (*p≤0,05: MDMA vs controlo).

3.3.7. Efeito da MDMA na actividade de enzimas antioxidantes

3.3.7.1. Catalase

Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prote\acute{a}na/ min}$)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração</i>				
20 $\pm$ 2°C (n=5)	233,0 $\pm$ 17,1	224,1 $\pm$ 17,4	251,9 $\pm$ 16,7	256,2 $\pm$ 20,4
30 $\pm$ 2°C (n=5-10)	346,1 $\pm$ 17,5**	303,3 $\pm$ 15,4	299,9 $\pm$ 9,6*	295,2 $\pm$ 10,5*
<i>Sem ração</i>				
20 $\pm$ 2°C (n=10)	323,7 $\pm$ 13,1	306,5 $\pm$ 12,9	312,7 $\pm$ 11,0	304,4 $\pm$ 19,1
30 $\pm$ 2°C (n=10)	315,4 $\pm$ 10,4	297,1 $\pm$ 13,7	250,5 $\pm$ 10,7**	269,9 $\pm$ 10,1*

Tabela 6. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na actividade da catalase, à temperatura ambiente de 20 $\pm$ 2°C e 30 $\pm$ 2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, para o número de animais indicado (*p $\leq$ 0,05 e **p $\leq$ 0,01: MDMA vs controlo; **p $\leq$ 0,01: controlo 30°C vs controlo 20°C).

3.3.7.2. Glutathione redutase

Glutathione Redutase (nmol NADPH/ mg proteína/ min)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração</i>				
20±2°C (n=5)	22,1 ± 1,1	21,9 ± 1,1	22,0 ± 1,1	20,9 ± 1,4
30±2°C (n=5-10)	21,4 ± 0,9	22,3 ± 1,3	21,8 ± 1,2	18,3 ± 2,4
<i>Sem ração</i>				
20±2°C (n=10)	23,5 ± 0,9	23,7 ± 0,7	23,0 ± 1,0	24,5 ± 1,1
30±2°C (n=10)	22,7 ± 0,5	22,3 ± 0,7	22,2 ± 0,8	24,0 ± 0,8

Tabela 7. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na actividade da glutathione redutase, à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, para o número de animais indicado. Não foram encontradas diferenças estatísticas para os diferentes grupos analisados.

3.3.7.3. Glutathione-S-transferase

Glutathione Transferase (nmol conjugado/ mg proteína/ min)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração</i>				
20±2°C (n=5)	868,5 ± 28,9	721,3 ± 25,6	836,6 ± 98,7	758,2 ± 66,0
30±2°C (n=5-10)	981,4 ± 62,3	1038,3 ± 40,9	1015,3 ± 78,9	1005,2 ± 104,4
<i>Sem ração</i>				
20±2°C (n=10)	1237,2 ± 59,0	1380,9 ± 86,4	1301,9 ± 68,6	1320,8 ± 69,1
30±2°C (n=10)	1153,5 ± 43,4	1129,4 ± 34,1	1051,4 ± 49,1	1079,5 ± 44,5

Tabela 8. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na actividade da glutathione transferase, à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, para o número de animais indicado. Não foram encontradas diferenças estatísticas para os diferentes grupos analisados.

3.3.7.4. Glutathione peroxidase

Glutathione Peroxidase (nmol NADPH/ mg proteína/ min)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração</i>				
20±2°C (n=5)	292,0 ± 17,8	280,5 ± 9,6	303,2 ± 10,3	285,9 ± 9,6
30±2°C (n=5-10)	337,7 ± 7,9	287,5 ± 13,6**	282,0 ± 10,1**	268,2 ± 18,7**
<i>Sem ração</i>				
20±2°C (n=10)	480,3 ± 14,1	493,5 ± 17,0	466,6 ± 14,3	466,2 ± 11,5
30±2°C (n=10)	403,6 ± 17,3**	394,7 ± 17,9	380,8 ± 15,5	403,9 ± 11,9

Tabela 9. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na actividade da glutathione peroxidase, à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, para o número de animais indicado (**p≤0,01 MDMA vs controlo; **p≤0,01: controlo 30°C vs controlo 20°C).

3.3.7.5. Superóxido dismutase

(a) SOD Total

Superóxido Dismutase Total (U/ mg proteína)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração</i>				
20±2°C (n=5)	19,32 ± 0,75	17,11 ± 1,43	17,26 ± 0,31	19,32 ± 1,35
30±2°C (n=5-10)	22,49 ± 0,84	22,54 ± 0,77	21,72 ± 0,52	22,00 ± 0,71
<i>Sem ração</i>				
20±2°C (n=10)	12,74 ± 0,69	16,22 ± 0,73	11,79 ± 0,61	14,52 ± 0,90
30±2°C (n=10)	14,37 ± 0,70	11,16 ± 0,60	13,85 ± 0,71	12,53 ± 0,44

(b) Mn SOD

Mangânês Superóxido Dismutase (U/ mg proteína)				
	Controlo	5 mg/Kg	10 mg/Kg	20 mg/Kg
<i>Com ração</i>				
20±2°C (n=5)	0,79 ± 0,02	0,78 ± 0,05	0,81 ± 0,03	0,80 ± 0,08
30±2°C (n=5-10)	0,86 ± 0,01	0,87 ± 0,03	0,90 ± 0,01	0,85 ± 0,03
<i>Sem ração</i>				
20±2°C (n=10)	0,78 ± 0,03	0,87 ± 0,06	0,85 ± 0,02	0,85 ± 0,03
30±2°C (n=10)	0,79 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,83 ± 0,03	0,83 ± 0,03

Tabela 10. Efeito da administração de diferentes doses de MDMA na actividade da superóxido dismutase total (a) e superóxido dismutase mangânês (b), à temperatura ambiente de 20±2°C e 30±2°C. Os valores são apresentados sob a forma de média ± erro padrão, para o número de animais indicado. Não foram encontradas diferenças estatísticas para os diferentes grupos analisados.

3.3.8. Estudo histológico de cortes de fígado

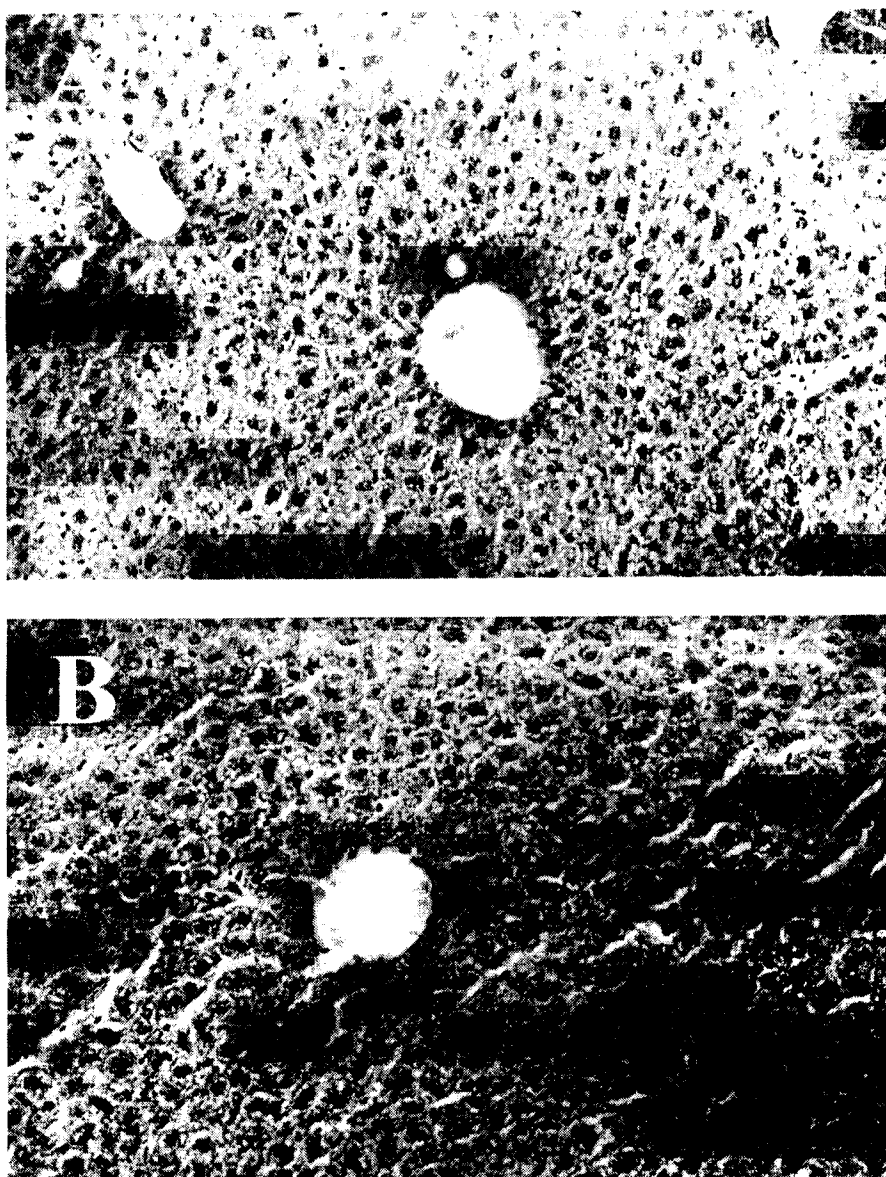


Figura 18. Fotografias de microscopia óptica obtidas de cortes de fígado de ratinho (obtidas em colaboração com a Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Universidade de Aveiro). **A.** Fígado de ratinho controlo (ampliação de 100×). Observa-se apenas ligeira vacuolização do parênquima hepático. **B.** Fígado de ratinho injectado com MDMA 5 mg/Kg (ampliação de 100×). O parênquima revela aspecto aparentemente normal. As fissuras que se observam no tecido devem-se à dureza do mesmo, o que dificulta o corte.

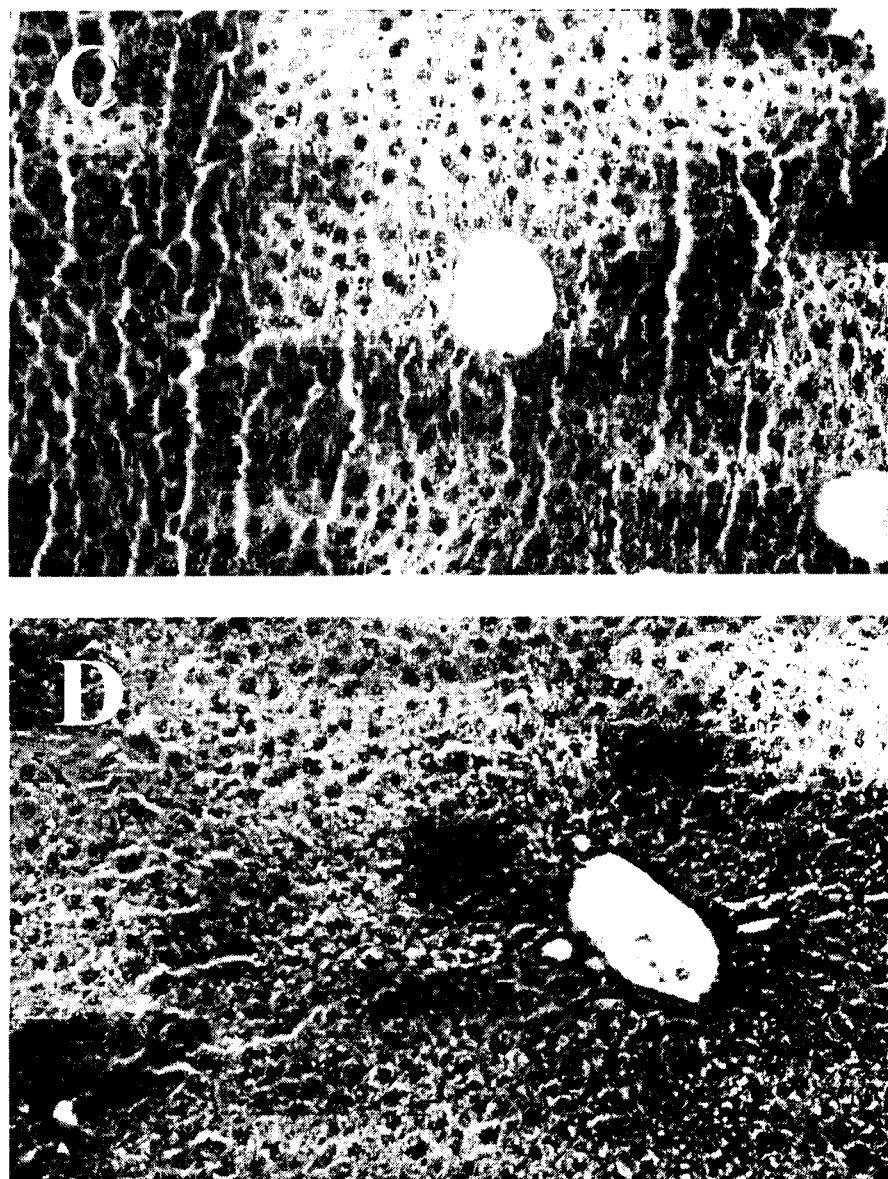


Figura 18. Fotografias de microscopia óptica obtidas de cortes de fígado de ratinho **C.** Fígado de ratinho injectado com MDMA 10 mg/Kg (ampliação de 100×). O parênquima não revela alterações. As fissuras revelam dureza do tecido. **D.** Fígado de ratinho injectado com MDMA 20 mg/Kg (ampliação de 100×).

3.4. DISCUSSÃO

Efeito da MDMA na quantidade de ração ingerida

Neste trabalho verificou-se uma diminuição da quantidade de ração ingerida pelos animais tratados com MDMA (10 e 20 mg/Kg, i.p.), como era esperado dado os seus efeitos anorécticos (Tabela 1). Para a dose mais alta estudada, esta diminuição foi da ordem dos 44% no ensaio realizado à temperatura ambiente de 20°C e da ordem dos 36% no ensaio realizado à temperatura de 30°C. O efeito anoréctico induzido pela MDMA foi claramente dependente da dose administrada. Por outro lado, o *stress* originado pela elevação da temperatura ambiente pareceu contribuir para a menor ingestão de ração observada nos animais controlo (cerca de 19%).

Esta anorexia poderá ter significado toxicológico visto diminuir o conteúdo hepático em cisteína e glutatona. A dieta é a principal fonte de cisteína no nosso organismo, quer na forma de proteínas quer como metionina (Kretzschmar e Klinger, 1990). A cisteína é essencial para a síntese de glutatona (factor limitante da sua síntese) (ver Meister, 1989). Foi demonstrado que animais mantidos em jejum de 24 h apresentam uma diminuição do conteúdo hepático em cisteína numa extensão de 30% e que esta depleção está directamente associada à diminuição do conteúdo hepático em glutatona (Tateishi *et al.*, 1974 e 1977). A glutatona hepática constitui uma reserva antioxidante vital na defesa celular contra efeitos lesivos de espécies reactivas de oxigénio e compostos electrofílicos formados durante o metabolismo de xenobióticos. Assim, a ingestão deficitária de alimentos e consequente diminuição dos níveis de glutatona hepática pode tornar as células mais vulneráveis aos efeitos tóxicos da MDMA.

Efeito da MDMA na temperatura corporal

Como se pode verificar pelos resultados apresentados nos gráficos das Figuras 16 e 17, a administração de MDMA (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) em ratinhos provoca um aumento da temperatura corporal, sendo o efeito observado dependente da dose administrada. Tanto

quanto se sabe, este parece ser o primeiro estudo realizado para a avaliação da relação entre a dose e o efeito hipertérmico induzido pela MDMA tendo como modelo animal o ratinho Charles River.

É importante salientar que na maioria dos trabalhos publicados a medição da temperatura é realizada por sonda rectal, o que causa *stress* adicional aos animais, podendo este método influenciar a variação da temperatura corporal. No presente trabalho a leitura da temperatura corporal é feita através de um método não invasivo, o que permite eliminar o efeito hipertérmico associado ao *stress* inerente ao manuseamento dos animais durante as leituras (ver Malberg e Seiden, 1998).

O efeito hipertérmico no Homem, associado ao consumo de “ecstasy”, parece não estar relacionado com a quantidade de droga consumida (Henry *et al.*, 1992). No entanto, foi previamente demonstrado em ratos que este efeito é dependente da dose (O’Shea *et al.*, 1998) e confirmado em ratinhos no presente trabalho. A variabilidade interindividual ao efeito hipertérmico induzido pela MDMA pode ser explicada por uma diferente susceptibilidade dos indivíduos a factores circunstanciais adversos, tais como temperatura ambiente elevada e agrupamento, normalmente observados em locais de consumo como festas “rave”, assim como a condições fisiológicas desfavoráveis causadas por actividade física sustentada, anorexia e ingestão insuficiente de líquidos. Assim, estes factores poderão potenciar os efeitos da MDMA no sistema termorregulador. Esta variabilidade interindividual pode ser explicada adicionalmente pela existência de um polimorfismo génico para a debrisoquina 4-hidroxilase (*CYP2D6* ou citocromo P450 2D6), enzima envolvida na desmetilação da MDMA (principal via metabólica no Homem) (Tucker *et al.*, 1994). A actividade metabólica do *CYP2D6* está diminuída em cerca de 10% da população caucasiana, podendo estes indivíduos ser mais vulneráveis aos efeitos hipertérmicos provocados pela MDMA (Malpass *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, vários investigadores têm-se debruçado sobre a influência da temperatura ambiente no efeito hipertérmico da MDMA em animais de experiência (Gordon *et al.*, 1991; Farfel e Seiden, 1995; Dafters e Lynch, 1998; Malberg e Seiden, 1998). De uma forma geral, a administração de MDMA a temperaturas ambiente baixas (4-

15°C) provoca hipotermia, a temperaturas intermédias produz uma resposta bifásica de hipotermia seguida por hipertermia, enquanto a temperaturas elevadas (28-30°C) causa hipertermia severa. Neste trabalho não se observou hipotermia inicial nos ratinhos expostos a uma temperatura ambiente de 20°C, como foi descrita para algumas estirpes de rato (Dafters e Lynch, 1998; Malpass *et al.*, 1999). É importante salientar que não foram observadas diferenças significativas entre os valores de temperatura corporal de animais controlo colocados à temperatura ambiente de 20±2°C ou a 30±2°C, embora a temperatura corporal dos animais colocados a 30±2°C tenha sido ligeiramente superior ao longo do ensaio. Podemos constatar neste estudo um aumento do efeito hipertérmico induzido pela MDMA com a elevação da temperatura ambiente. Para a temperatura ambiente de 30±2°C os picos de temperatura atingidos foram superiores, em cerca de 0,6 a 1,2°C (dependendo da dose administrada), aos atingidos à temperatura de 20±2°C. Tentando extrapolar para o Homem, e dado que a “ecstasy” é normalmente consumida em locais cuja temperatura ambiente pode ser elevada (como, por exemplo, em festas “rave”), este factor poderá ser crucial para a expressão da toxicidade da droga.

Efeito da MDMA na letalidade

A letalidade induzida pela MDMA foi drasticamente aumentada com a elevação da temperatura ambiente. Verificou-se que para a dose de 20 mg/Kg a letalidade foi da ordem dos 10% à temperatura ambiente de 20°C e de 40% para temperaturas de 30°C (valores não apresentados). As mortes ocorreram nas primeiras 2 horas após a administração da MDMA. No estudo realizado em ratos por Gordon *et al.* (1991) verificou-se igualmente a potenciação dos efeitos letais da MDMA pelas altas temperaturas ambientes.

Um aspecto a salientar no presente estudo é que a temperatura corporal dos animais que morreram era semelhante à dos que sobreviveram, pelo que a morte pode ter sido resultado de outras causas como, por exemplo, colapso cardiovascular.

Efeito da MDMA na relação peso fígado/peso corporal

Como se verifica, pela observação dos resultados apresentados na Tabela 2, não existem diferenças significativas entre os valores da relação peso fígado/peso corporal dos grupos tratados com MDMA, comparativamente ao grupo controlo. No entanto, podemos verificar que quando se compara o peso do fígado com o peso do animal obtido no início do ensaio em animais privados de ração e colocados a 30°C, observa-se a tendência ($p < 0,09$) para uma diminuição da razão entre o peso do fígado e o peso corporal. É possível que a depleção de glicogénio hepático possa contribuir para o abaixamento da relação peso fígado/peso corporal. De facto, sabe-se que a estimulação adrenérgica resulta na indução da glicogenólise (Taylor *et al.*, 1983), com aumento dos níveis de glucose no plasma. Assim, a maior necessidade de energia do organismo em conjunto com a não reposição devido à privação de alimentos pode causar uma diminuição do peso do fígado. Este efeito deixa de ser evidente no dia seguinte à administração da MDMA, o que pode ser justificado pela diminuição, observada no dia seguinte, do peso corporal dos animais (valores não apresentados).

Efeito da MDMA nos níveis plasmáticos de transaminases e fosfatase alcalina

É bem conhecido que indivíduos consumidores de “ecstasy” possuem actividades séricas elevadas de transaminases (AST e ALT) e fosfatase alcalina (Roques *et al.*, 1998). No entanto, neste trabalho não se observaram diferenças significativas entre os níveis plasmáticos destas enzimas nos animais tratados com MDMA, comparativamente ao grupo controlo (Tabela 3). Os valores encontrados situam-se dentro dos valores de referência (AST: 75-300 U/L; ALT: 30-250 U/L; ALP: 30-70 U/L, citados em Levine, 1995).

Estes resultados estão em concordância com o exame histológico de cortes de fígado de ratinho (Figura 18), nos quais não se observou qualquer tipo de lesão hepática.

Efeito da MDMA nos níveis de glutathione reduzida

Como já foi mencionado anteriormente, a privação de alimentos está directamente associada à depleção dos níveis de glutathione hepática. Estudos realizados em animais mantidos em jejum durante 48 horas demonstraram uma diminuição do conteúdo hepático de glutathione entre 30 a 50% (Leeuwenburgh e Ji, 1996). Como já foi referido, o jejum limita a disponibilidade de cisteína para a síntese de glutathione no fígado, o que pode explicar a diminuição observada dos níveis hepáticos em GSH (Reed, 1998). Neste trabalho podemos verificar, pela observação dos resultados apresentados na Tabela 4, uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) dos níveis hepáticos em glutathione reduzida nos animais tratados com MDMA (10 e 20 mg/Kg) e com ração *ad libitum*, o que pode estar, pelo menos em parte, relacionada com a diminuição da quantidade de ração ingerida subsequente ao efeito anoréctico da MDMA. Esta depleção foi dependente da dose administrada. Verificou-se igualmente que os animais controlo colocados à temperatura ambiente de 30°C apresentam níveis de GSH significativamente mais baixos ($p \leq 0,01$), o que está de acordo com uma menor quantidade de ração ingerida (ver Tabela 1).

Por outro lado, embora não se tenha feito comparações estatísticas entre os resultados obtidos nas duas séries de ensaios, podemos verificar claramente uma depleção acentuada (cerca de 50%) dos níveis de GSH nos animais mantidos em jejum comparativamente aos que tiveram livre acesso à ração durante o ensaio. A depleção deste importante antioxidante torna as células mais vulneráveis a danos oxidativos. Vários estudos demonstraram que a privação de alimentos leva à potenciação da hepatotoxicidade de certos compostos capazes de depletar a GSH, como o tetracloreto de carbono, 1,1-dicloroetileno, acetaminofeno e bromobenzeno (ver Reed, 1998).

No entanto, esta depleção também foi observada nos animais tratados com MDMA mas mantidos em jejum durante o ensaio, o que permite concluir que a MDMA contribui para este efeito por um mecanismo independente da sua actividade anorexígena. Hiramatsu *et al.* (1990) demonstraram que durante o metabolismo da MDMA há formação de compostos de natureza quinónica capazes de reagir rapidamente com o grupo sulfidrílico da molécula de GSH (ver Figura 11, página 37). A formação destes aductos com a glutathione

poderá ser, pelo menos em parte, responsável pela observada depleção dos níveis hepáticos em glutathione.

Por fim, é de referir que a depleção *in vivo* de GSH hepática foi também observada após a administração de *d*-anfetamina (Carvalho *et al.*, 1993), embora a quantificação tenha sido realizada no período de 3 horas.

Efeito da MDMA na extensão de peroxidação lipídica

Foi já demonstrado que a hipertermia induz danos oxidativos no fígado de rato (Skibba *et al.*, 1991; Ando *et al.*, 1994). No presente estudo verificou-se (Tabela 5) uma tendência para o aumento do valor de peroxidação lipídica no fígado de ratinhos injectados com 5 e 10 mg/Kg de MDMA, privados de alimentos e colocados a 30°C, sendo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) para a dose mais alta ensaiada (20 mg/Kg, i.p.). Estes resultados sugerem que a elevação da temperatura ambiente possa ser um factor crucial na expressão da peroxidação lipídica induzida pela MDMA, uma vez que este efeito não foi observado a 20°C. Por outro lado, é de salientar que este efeito foi apenas observado nos animais mantidos em jejum. Assim, a depleção do conteúdo hepático em glutathione, causada pela privação de ração, associada à elevada temperatura ambiente, poderá conduzir a uma diminuição das defesas antioxidantes e consequente peroxidação lipídica por acção da MDMA.

Efeito da MDMA na actividade de enzimas antioxidantes

Conforme se verifica nas tabelas apresentadas nas Figuras 7, 8 e 10, não houve variação significativa nos valores obtidos para a actividade de glutathione redutase, glutathione transferase e superóxido dismutase após a administração de MDMA. No entanto, encontrou-se uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) da actividade da catalase no fígado dos animais tratados com MDMA (10 e 20 mg/Kg, i.p.) com e sem alimento quando

colocados à temperatura ambiente de 30°C e da glutathione peroxidase ($p \leq 0,01$) nos animais com livre acesso à ração e colocados à temperatura de 30°C.

A administração de MDMA pode resultar na formação de espécies reactivas de oxigénio, originadas quer por oxidação das aminas biogénicas libertadas por acção da MDMA quer durante o metabolismo da MDMA (Monks *et al.*, 1992; Tucker *et al.*, 1994). Assim, poder-se-ia esperar um aumento da actividade das enzimas envolvidas na defesa contra estas espécies. No entanto, vários estudos têm vindo a demonstrar que espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente O_2^- e H_2O_2 , são capazes de inactivar a actividade de certas enzimas antioxidantes, como a catalase (Kono e Fridovich, 1982; Lardinois *et al.*, 1996), glutathione peroxidase (Kerr *et al.*, 1988) e superóxido dismutase (Sinet e Gaber, 1981). Estes resultados sugerem que os radicais livres hipoteticamente formados após a administração de MDMA possam afectar a actividade das enzimas antioxidantes.

Os resultados deste trabalho parecem estar de acordo com os obtidos no estudo realizado por Jayanthi *et al.* (1999). Estes autores verificaram que a administração de MDMA a ratinhos provocou uma diminuição da actividade da catalase e glutathione peroxidase a nível cerebral e induziu a peroxidação lipídica. Observaram igualmente que a administração de MDMA a ratinhos transgénicos capazes de expressar a enzima SOD humana não causou alteração significativa da actividade das enzimas antioxidantes nem induziu peroxidação lipídica, o que vem corroborar a hipótese da possível acção inibidora dos radicais superóxido na actividade destas enzimas. A diminuição da actividade da catalase hepática foi também observada após a administração de *d*-anfetamina durante 14 dias a ratinhos (Carvalho *et al.*, 1999).

Por outro lado, durante o metabolismo da MDMA formam-se também compostos de natureza polifenólica e quinónica (Monks *et al.*, 1992; Tucker *et al.*, 1994). Foi já demonstrado que estes compostos são capazes de inibir a actividade de certas enzimas, nomeadamente da glutathione-S-transferase (Ommen *et al.*, 1991; Ploemen *et al.*, 1993; Monks *et al.*, 1992) e da glutathione redutase (Elliot *et al.*, 1992; Iio *et al.*, 1993; Remião, 1999). A depleção de GSH induzida pela MDMA torna as células vulneráveis aos efeitos destas quinonas. As quinonas são compostos altamente reactivos, capazes de se ligarem a

grupos sulfidrilo vitais à actividade destas enzimas (Monks *et al.*, 1992). Assim, poderemos admitir que a actividade das enzimas antioxidantes possa ser modificada por acção de radicais livres e/ou compostos quinónicos formados após a administração da MDMA.

Neste trabalho podemos igualmente verificar, pela observação dos resultados apresentados na Tabela 9, uma diminuição significativa da actividade da glutathione peroxidase nos animais controlo mantidos em jejum com o aumento da temperatura ambiente. A actividade da glutathione peroxidase é muito importante na protecção das células contra a peroxidação lipídica. Assim, a diminuição da actividade desta enzima poderá explicar, em parte, a peroxidação lipídica observada para dose mais alta estudada (ver Tabela 5).

CAPÍTULO IV

Estudo da Hepatotoxicidade da 3,4- Metilenodioximetanfetamina

Ensaaios In Vitro

IV. Estudo da hepatotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina: ensaios *in vitro*

4.1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho, optou-se por usar hepatócitos isolados em suspensão como modelo *in vitro* para avaliação dos efeitos hepatotóxicos da MDMA. Este modelo tem sido intensamente utilizado na investigação do metabolismo hepático de xenobióticos e da sua hepatotoxicidade. O modelo animal mais frequentemente usado para a obtenção de hepatócitos isolados é o rato. Neste trabalho, optou-se por trabalhar com hepatócitos isolados de ratinho por forma a usar o mesmo modelo animal usado nos ensaios *in vivo*. Este modelo animal é pouco utilizado neste tipo de ensaios, o que poderá dever-se à maior dificuldade de canulação da veia porta hepática e ao menor número de células obtidas de cada fígado, comparativamente ao que se verifica com o rato.

Como já foi referido anteriormente, a MDMA causa hipertermia no Homem e em animais de experiência. Pudemos verificar, nos ensaios *in vivo* realizados nesta dissertação, que a MDMA induziu um aumento da temperatura corporal em ratinhos Charles River, atingindo valores da ordem dos 41°C. Assim, pareceu-nos pertinente neste trabalho estudar a influência da hipertermia na hepatotoxicidade induzida pela MDMA. Com este fim, os ensaios *in vitro* foram conduzidos usando diferentes temperaturas de incubação, 37°C (condições de normotermia) e 41°C (condições de hipertermia).

As concentrações de MDMA (100-400 µM) ensaiadas neste trabalho estão em concordância com os níveis plasmáticos normalmente encontrados em indivíduos que consomem quantidades recreacionais de “ecstasy” (De la Torre *et al.*, 2000). No entanto, dado que em casos de intoxicações estes valores podem ser extremamente elevados (Henry *et al.*, 1992) estudaram-se também as concentrações de 800 e 1600 µM.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Materiais utilizados

Todos os reagentes usados nas experiências tinham grau analítico. A collagenase (tipo I), a albumina sérica bovina (fracção V), o ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico (HEPES), o ácido etilenoglicol-bis (β -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetracético (EGTA), o ácido 2-tiobarbitúrico, a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotido (NADH), o ácido pirúvico, a glutathione reduzida (GSH) e o azul de tripano foram adquiridos à SIGMA Chemical Company (St. Louis, Mo., Estados Unidos). O ácido perclórico e o ácido tricloroacético foram adquiridos à MERCK (Darmstadt, Alemanha).

Os solventes usados em HPLC tinham grau de pureza "Lichrosolv" e eram da marca Merck. A água usada na fase móvel para HPLC foi bidesionizada.

A 3,4-metilenodioximetanfetamina foi uma oferta da United Nations Drug Control Program (Viena, Austria).

4.2.2. Animais

Utilizaram-se ratinhos macho outbred Charles River CD1, com peso aproximado de 30 g, adquiridos no Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, em Oeiras. Os ratinhos foram aclimatizados em gaiolas de polietileno de rede metálica no topo, acamadas com aparas de madeira, numa temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, humidade entre 40 e 60%, e ciclos dia/noite de 12/12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração padrão e água *ad libitum*, no nosso biotério, pelo menos duas semanas antes da sua utilização.

Os procedimentos cirúrgicos destinados ao isolamento de hepatócitos ocorreram sempre entre as 9 e as 10 horas da manhã.

As experiências foram realizadas tendo presentes as linhas de orientação de "Principles of Laboratory Animal Care" (Publicação NIH nº 85-23, revista em 1985).

4.2.3. Protocolo experimental

1. Isolamento de hepatócitos de ratinho Charles River adulto;
2. Determinação da densidade e viabilidade celular;
3. Diluição da suspensão celular à densidade de $1,0 \times 10^6$ células/ml;
4. Fraccionamento da suspensão celular em 6 alíquotas de 5 ml cada;
5. Pré-incubação das células durante 30 minutos a 37°C;

Para o ensaio de hipertermia, após este tempo de pré-incubação, a temperatura do banho de incubação é modificada para 41°C.

6. Incubação dos hepatócitos isolados com MDMA nas concentrações de 100, 200, 400, 800 e 1600 μM na suspensão celular, durante 3 horas. Uma das alíquotas, sem qualquer adição de MDMA, serve de controlo da experiência.
7. Colheita de amostras no tempo 0 (tempo de pré-incubação) e após 1, 2, e 3 horas de incubação das células com a MDMA para a determinação:
 - da viabilidade celular
 - do conteúdo intracelular de glutathione reduzida e oxidada
 - e da extensão da peroxidação lipídica.

4.2.4. Isolamento de hepatócitos de ratinho

A técnica utilizada para o isolamento de hepatócitos de ratinho baseia-se no método da perfusão com collagenase descrito por Moldéus *et al.*, em 1978. Neste método, também designado por “two-step perfusion”, o fígado é inicialmente perfundido *in situ* com uma solução isenta de cálcio, contendo um agente quelante específico deste ião (EGTA) com a finalidade de diminuir a funcionalidade dos complexos juncionais (cálcio-dependentes), seguida da perfusão com uma solução de collagenase contendo cálcio para permitir a acção da enzima. A perfusão com collagenase completa a separação dos hepatócitos, seguindo-se a dissociação mecânica. A fase que se segue ao isolamento das células do fígado consiste na purificação da suspensão de hepatócitos obtida, uma vez que estão presentes vários tipos de células hepáticas não parenquimatosas, nomeadamente células de Kupffer, adipócitos e células endoteliais, e células parenquimatosas não viáveis. Para tal, a suspensão celular é filtrada, centrifugada e lavada por forma a remover os hepatócitos mortos, células não parenquimatosas e outras contaminações. As células assim obtidas estão prontas para serem usadas nos estudos.

É de salientar que o Laboratório de Toxicologia possui uma experiência considerável no isolamento de hepatócitos a partir do modelo animal rato, como se pode verificar pelos artigos publicados por Fernandes *et al.* (1995), Carvalho *et al.* (1996) e Carvalho *et al.* (1997). Com este trabalho de dissertação foi possível implementar no nosso laboratório a técnica de isolamento de hepatócitos de ratinho. As principais adaptações relativamente à técnica utilizada no isolamento de hepatócitos de rato prendem-se com o diâmetro da cânula empregue, com a velocidade do fluxo das soluções de perfusão, com a quantidade de enzima necessária e com o facto de a perfusão com a solução enzimática ser efectuada *in situ*. A seguir descrevem-se os vários passos da técnica de isolamento de hepatócitos de ratinho.

4.2.4.1. Técnica

a) O animal foi injectado com heparina (1ml/Kg) 10 minutos antes do início da anestesia, para evitar a coagulação do sangue dentro do fígado.

b) O animal foi anestesiado com éter dietílico num recipiente fechado, sendo depois colocado em decúbito dorsal numa placa de dissecação, onde os membros foram convenientemente imobilizados.

A manutenção da anestesia foi assegurada com éter dietílico.

c) Abriu-se a cavidade abdominal com uma incisão em forma de V (ver Figura 19), começando na base do abdómen e estendendo-se até um pouco acima do diafragma.

d) Expôs-se a veia porta hepática deslocando-se as vísceras para a direita. Introduziu-se rapidamente uma agulha (21G× 1"; 0,8 × 25 mm) que serviu de cânula e com o auxílio de uma pinça porta-agulhas fixou-se a veia à cânula. No momento da canulação o fluxo de saída da solução da cânula é interrompido, para permitir uma boa canulação. Após a canulação abriu-se o fluxo (4 ml/min) para efectuar a perfusão *in situ*.

Cortou-se rapidamente a veia cava inferior, evitando uma pressão excessiva no fígado, e, em seguida, o diafragma para sacrificar o animal.

e) Manteve-se a perfusão *in situ* com solução de Hank modificado (NaCl 230 mM; KCl 5,5 mM; MgSO₄.7H₂O 0,8 mM; Na₂HPO₄ 0,3 mM; NaHCO₃ 25 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; EGTA 0,06 mM; albumina 0,67%; pH: 7,4) durante 8 minutos a 37°C. Durante a perfusão, a solução foi constantemente gaseificada através de uma corrente de carbogénio (95% O₂ e 5% CO₂).

f) Terminada a perfusão com a solução de Hank, o fígado foi perfundido com a solução enzimática (NaCl 230 mM; KCl 5,5 mM; MgSO₄.7H₂O 0,8 mM; Na₂HPO₄ 0,3 mM; NaHCO₃ 25 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; collagenase 0,038%; CaCl₂ 0,12%; pH: 7,46). Esta perfusão foi efectuada durante 8 a 10 minutos, a 37°C, até o fígado perder a sua plasticidade quando levemente pressionado.

g) Retirou-se o fígado da cânula e colocou-se num recipiente de polietileno contendo solução de Krebs-Henseleit com albumina (NaCl 230 mM; KCl 5,5 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4 mM; KH_2PO_4 1,4 mM; NaHCO_3 28,8 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,0 mM; Hepes 12,5 mM; albumina 1%; pH: 7,4). Rompeu-se a cápsula que envolve o fígado e dispersaram-se as células hepáticas com agitação suave.

h) A suspensão obtida foi então filtrada por uma rede de poliamida (350 mesh) para dois tubos de centrifuga de 50 ml. Centrifugou-se durante 2 minutos a 300 r.p.m e aspirou-se o sobrenadante.

i) Seguidamente, os tubos foram cheios com solução Krebs-Henseleit (NaCl 230 mM; KCl 5,5 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4 mM; KH_2PO_4 1,4 mM; NaHCO_3 28,8 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,0 mM; Hepes 12,5 mM; pH: 7,4) e agitou-se muito suavemente para lavar as células. Repetiu-se mais duas vezes a lavagem, centrifugação e aspiração do sobrenadante.

j) Por fim, determinou-se a densidade e a viabilidade dos hepatócitos na suspensão celular obtida (ver 4.1.6.1.).

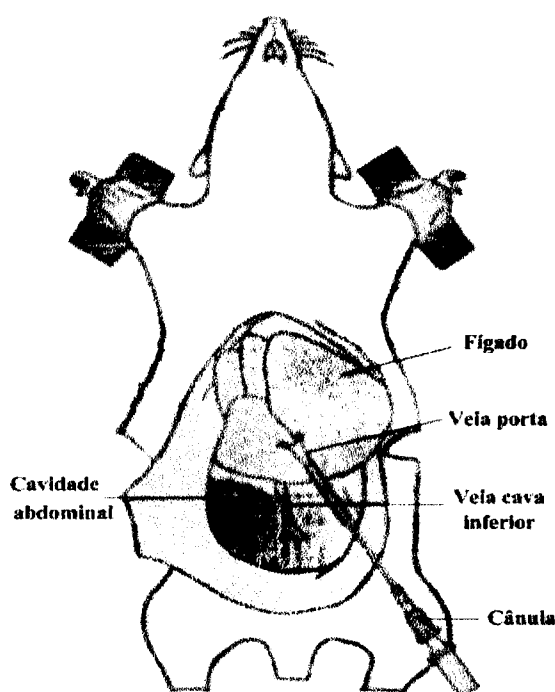


Figura 19. Representação esquemática da canulação da veia porta do fígado de ratinho (adaptado de Berry *et al.* 1991).

4.2.4.2. Sistema de perfusão

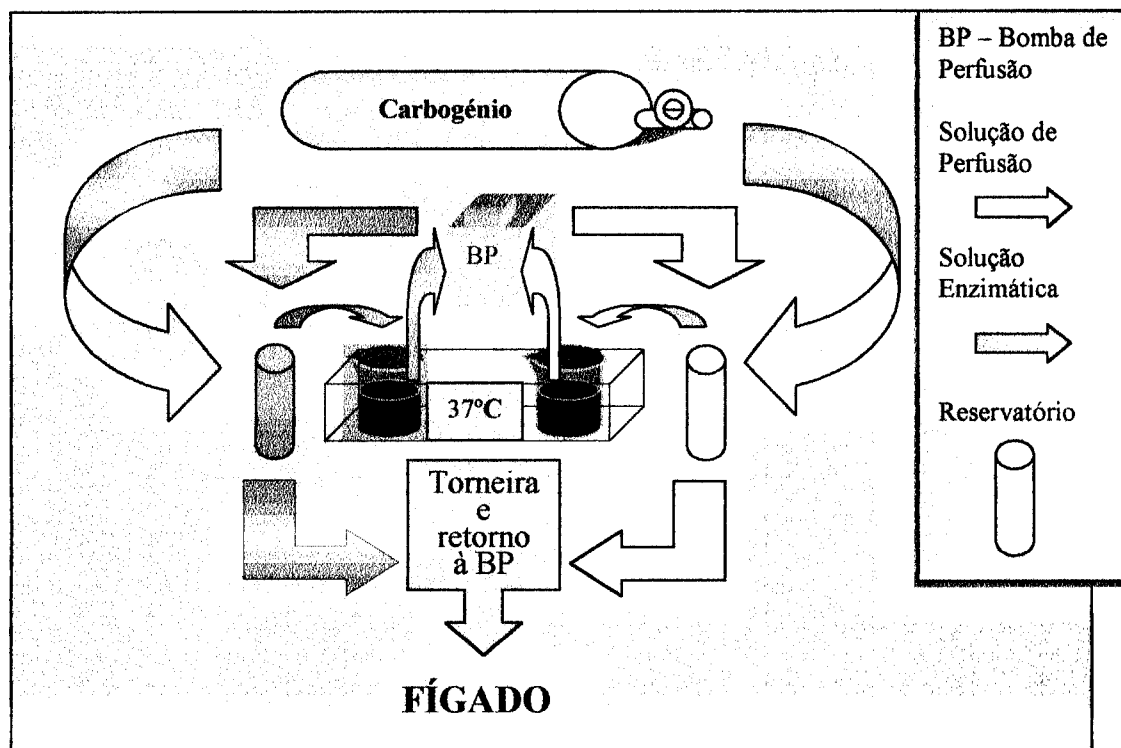


Figura 20. Esquema do sistema de perfusão (adaptado de Remião, 1998)

O sistema de perfusão é constituído por:

- Uma bomba peristáltica (bomba de perfusão) que permite a circulação das soluções de perfusão.
- Um suporte metálico onde se colocam dois goblés, um com a solução de Hank modificado e o outro com a solução enzimática. Estes goblés encontram-se mergulhados num banho termostático a 37-38°C. Em cada goblé encontra-se mergulhado um tubo de silicone ligado à bomba de perfusão.

- Dois reservatórios com cerca de 10 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, com quatro aberturas:
 1. uma abertura para a entrada de carbogênio, cuja pressão é regulada por um manómetro de pressão;
 2. uma abertura na parte superior para a entrada da solução de perfusão;
 3. uma abertura na parte inferior para a saída da solução de perfusão, ligada a um tubo de silicone que possui a cânula na extremidade;
 4. Uma abertura na parte superior lateral para a saída de carbogênio e de solução de perfusão em excesso, que retorna ao goblé inicial.

4.2.5. Incubação dos hepatócitos

A suspensão celular foi dividida por 6 matrizes de polietileno (de 25 ml) e diluída com solução de Krebs-Henseleit por forma a ter em cada matriz 5 ml de suspensão com $1,0 \times 10^6$ células/ml. Os matrizes foram então colocados num tabuleiro agitador (90 oscilações/minuto) de um banho termostatado a 37°C e continuamente arejados por uma mistura gasosa de carbogénio humidificada. Em todas as experiências as células foram pré-incubadas durante 30 minutos.

Após o período de pré-incubação, adicionou-se 10 µl de uma solução de MDMA (preparada em Krebs-Henseleit) por ml de suspensão celular de modo a obter as concentrações finais de 100, 200, 400, 800 e 1600 µM. Um dos matrizes, sem qualquer adição de MDMA, serviu como controlo da experiência (ao qual foi adicionado igual volume de Krebs-Henseleit).

Estes ensaios foram realizados a 37°C e a 41°C. Para o ensaio de hipertermia, após o tempo de pré-incubação, a temperatura do banho de incubação foi modificada para 41°C.

Em todos os protocolos experimentais foram retiradas alíquotas de suspensão celular de cada matriz ao fim dos 30 minutos de pré-incubação (tempo 0) e ao fim de 1, 2, e 3 horas de incubação das células com MDMA, para a determinação da viabilidade celular, do conteúdo intracelular de glutathiona reduzida e oxidada, e da peroxidação lipídica.

4.2.6. Determinação da viabilidade celular

Os hepatócitos viáveis são aqueles que possuem morfologia normal, membrana plasmática íntegra, e funções bioquímicas normais. Na prática, quando se pretende determinar a viabilidade, o que geralmente se avalia é a integridade da membrana plasmática (Jauregui *et al.*, 1981). Esta integridade foi avaliada por dois métodos:

- Exclusão do corante azul de tripano
- Libertação da enzima desidrogenase láctica (LDH) para o meio extracelular

4.2.6.1. Exclusão do corante azul de tripano

O azul de tripano é um corante orgânico de carga negativa que é excluído pelos hepatócitos com as respectivas membranas intactas, como resultado da manutenção do potencial de membrana dependente de energia. Desta forma, as células viáveis exibem uma forma esférica de contornos bem definidos, aspecto refringente e cor amarela, enquanto que as células danificadas são permeáveis ao azul de tripano, apresentando-se coradas de azul e de uma forma particularmente intensa no núcleo (ver Figura 21).

Técnica :

- Preparou-se uma solução de azul de tripano a 0,4 % em NaCl 0,9%, tendo sido filtrada por filtro 0,22 μ m.

- Para determinar a densidade (número de células viáveis por ml de suspensão) e a viabilidade dos hepatócitos na suspensão celular inicial retirou-se 200 μ l de suspensão celular para um eppendorf e adicionou-se igual volume de solução de azul de tripano (diluição 2x). A contagem das células foi efectuada numa câmara de Neubauer ao microscópio óptico (ampliação 40 x). Esta contagem fez-se na área central (que corresponde a 10^{-4} ml), nos dois lados da câmara.

Com base no número médio de células viáveis obtido, a suspensão celular foi diluída com solução de incubação de forma a obter a concentração pretendida ($1,0 \times 10^6$ células/ml).

Para calcular a % da viabilidade celular, dividiu-se o número de células viáveis pelo número total de células e multiplicou-se por 100.

Ao longo do ensaio retiraram-se amostras de forma aleatória para a determinação da viabilidade celular por esta técnica.

4.2.6.2. Libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular

A LDH é uma enzima que se encontra no citoplasma das células e que participa no último passo da glicólise anaeróbica, catalizando a redução reversível do ácido pirúvico a ácido láctico:



Neste trabalho, a quantidade de enzima presente no meio extracelular e total foi quantificada pela diminuição da absorvência a 340 nm quando o NADH é oxidado a NAD^+ , de acordo com o método descrito por Bergmeyer *et al.* (1965).

A avaliação da viabilidade celular por esta técnica apresenta algumas vantagens relativamente ao teste de exclusão do azul de tripano. Em contraste com a avaliação pela exclusão do azul de tripano, não tem importância a possível ocorrência de lise celular, uma vez que se pode fazer uma estimativa exacta de danos celulares mesmo que as células danificadas se tenham desintegrado. Assim, apesar das células desintegradas terem desaparecido, a LDH correspondente a estas células encontra-se no sobrenadante e, sendo mensurável, traduz a extensão da perda de viabilidade celular (Berry *et al.*, 1991).

Além disso, são evitados os problemas estatísticos que aparecem com a técnica de exclusão do azul de tripano e que devem ao pequeno número de células que é examinado.

A medição de LDH não deve ser utilizada para a determinação da viabilidade celular na suspensão inicial, uma vez que durante a obtenção dos hepatócitos isolados as células são submetidas a várias lavagens, durante as quais a LDH libertada por células danificadas é removida.

Técnica :

1. Determinação da LDH extracelular

- Retirou-se 250 µl de cada suspensão celular para um “eppendorf” e centrifugou-se a 6000 r.p.m. durante 10 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para outro “eppendorf” e manteve-se entre 0 e 4°C até ao doseamento da LDH.

2. Determinação da LDH total

- Retirou-se 250 µl de cada suspensão celular para um “eppendorf” e manteve-se entre 0 e 4°C até ao doseamento da LDH total.
- Após agitação em vortex, cada amostra foi desintegrada num sonicador (Vibracell 375 W sonicador, Sonics & Materials Danbury, USA) e, depois, centrifugada a 6000 r.p.m. durante 10 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para outro “eppendorf”.

Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção no comprimento de onda de 340 nm e com leituras de 10 em 10 segundos durante 2 minutos.

As amostras foram colocadas em triplicado em placas para leitura no leitor de placas (96 poços, de fundo liso). Em cada poço adicionou-se (num volume final de 300 µl):

- 20 µl de sobrenadante das amostras (LDH total ou LDH extracelular)
- solução de piruvato de sódio 0,32 mM (em tampão de fosfatos 0,02 M a pH 7,5)

- solução de NADH 0,28 mM (em tampão de fosfatos 0,05M a pH 7,5)

Registou-se a variação da absorvência a 340 nm e assim a velocidade de desaparecimento do NADH. Os resultados foram expressos em termos de % de LDH libertada.

4.2.7. Determinação dos níveis intracelulares de glutathiona reduzida e oxidada

A determinação simultânea dos níveis de GSH e GSSG foi realizada num de sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detecção electroquímica, de acordo com a técnica desenvolvida por Remião *et al.* (artigo submetido).

Técnica:

- Retirou-se 200 µl de cada suspensão celular para um “eppendorf”, adicionou-se 200 µl de ácido perclórico (concentração final de 5%) e, após agitação no vortex, centrifugou-se a 13000 r.p.m. durante 10 minutos numa centrífuga refrigerada (4°C).

- O sobrenadante resultante de cada uma das amostras foi congelado (-20°C) até à altura da sua injeção no HPLC.

Os valores obtidos foram convertidos em nmoles de GSH (ou GSSG) por milhão de células.

4.2.8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica

A extensão da peroxidação lipídica foi determinada pelo método das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm (Buege e Aust, 1978).

Técnica :

- Retirou-se 250 µl de cada suspensão celular para um “eppendorf” e adicionou-se 500 µl de ácido tricloroacético a 10%.

- Após agitação em vortex, as amostras foram centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 20 segundos.

- Retirou-se 600 µl de sobrenadante para um tubo de ensaio, ao qual se adicionou igual volume de ácido tiobarbitúrico a 1% (solução extemporânea).

- A mistura foi aquecida durante 10 minutos em banho de água à ebulição e, após arrefecimento, leu-se a absorvência a 535 nm num espectrofotómetro Shimadzu 160.

Os resultados foram expressos em pmol de equivalentes de malonildialdeído por milhão de células, usando um coeficiente de extinção de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.2.9. Análise estatística

As comparações estatísticas foram feitas através da análise de variância “one-way” (ANOVA) seguida do teste PLSD de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Características dos hepatócitos isolados obtidos

A observação ao microscópio óptico da suspensão celular obtida, após aplicação da técnica do azul de tripano, permitiu observar células vivas de cor amarela e membrana plasmática refringente e algumas células não viáveis de cor azul e com núcleo bem evidente (ver Figura 21 A e B). É frequente o aparecimento de vesículas na membrana plasmática das células, que se devem a alterações nos microfilamentos do citoesqueleto dos hepatócitos e que podem ser reversíveis ou irreversíveis, conduzindo neste caso a lise e morte celular (ver Figura 21 C). Estas vesículas podem retrair após o período de pré-incubação a 37°C num meio arejado com carbogénio (Berry *et al.*, 1991).

A técnica de isolamento utilizada permitiu a obtenção de um rendimento total entre 27 a 66 milhões de células vivas. Os hepatócitos usados nos ensaios apresentavam viabilidade entre 82 e 97% (determinada pela técnica do azul de tripano).

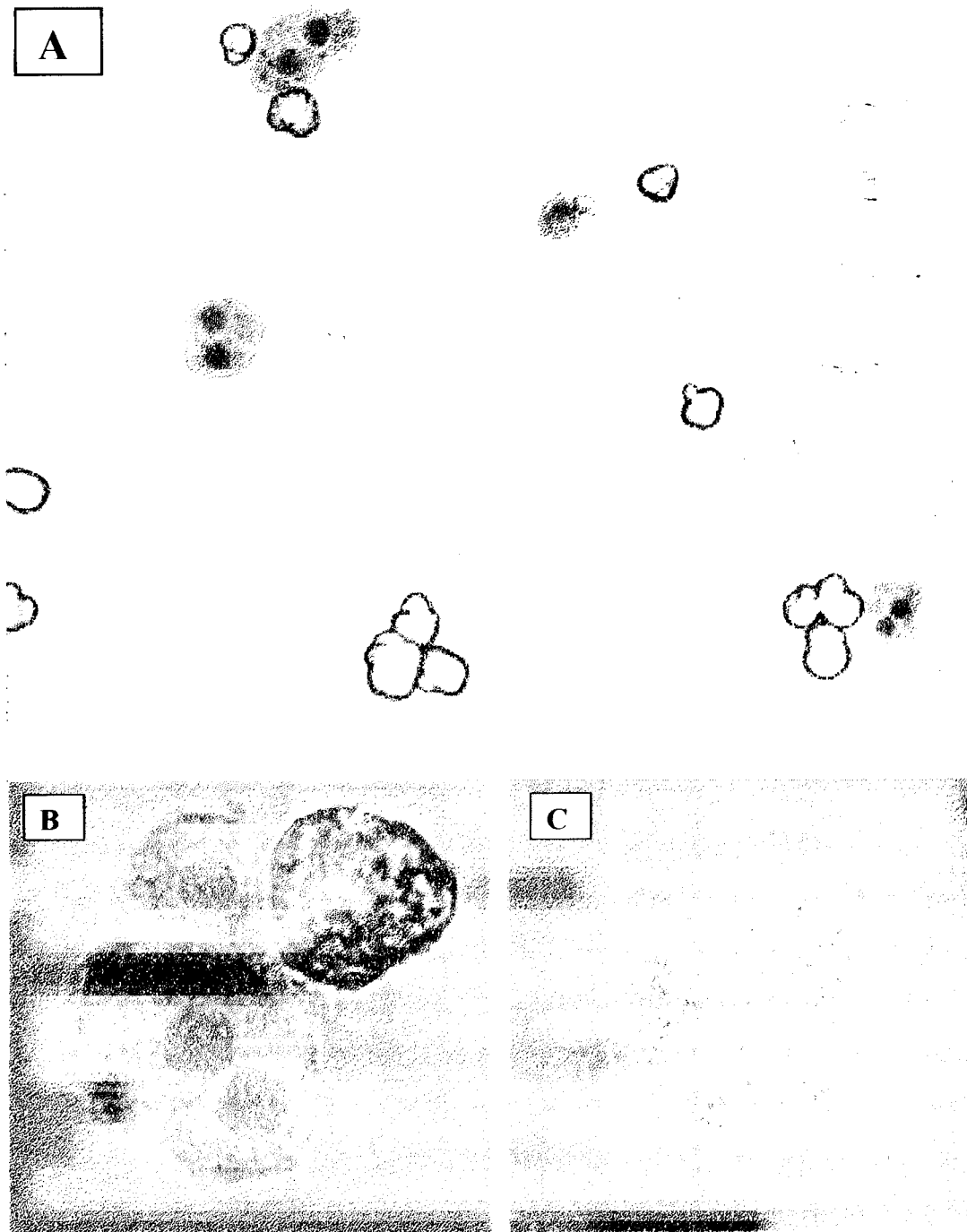


Figura 21. Fotografias de microscopia óptica, mostrando hepatócitos isolados de ratinho. A. Aspecto geral da suspensão celular obtida (ampliação de 40 ×). B. Vê-se com maior pormenor um hepatócito viável de cor amarela e dois hepatócitos não viáveis corados de azul (ampliação de 100 ×). C. É visível o aparecimento de vesículas na membrana plasmática das células (ampliação de 100 ×).

4.3.2. Efeito da hipertermia nas células controle

- Viabilidade celular (expressa pela libertação de LDH para o meio extracelular)

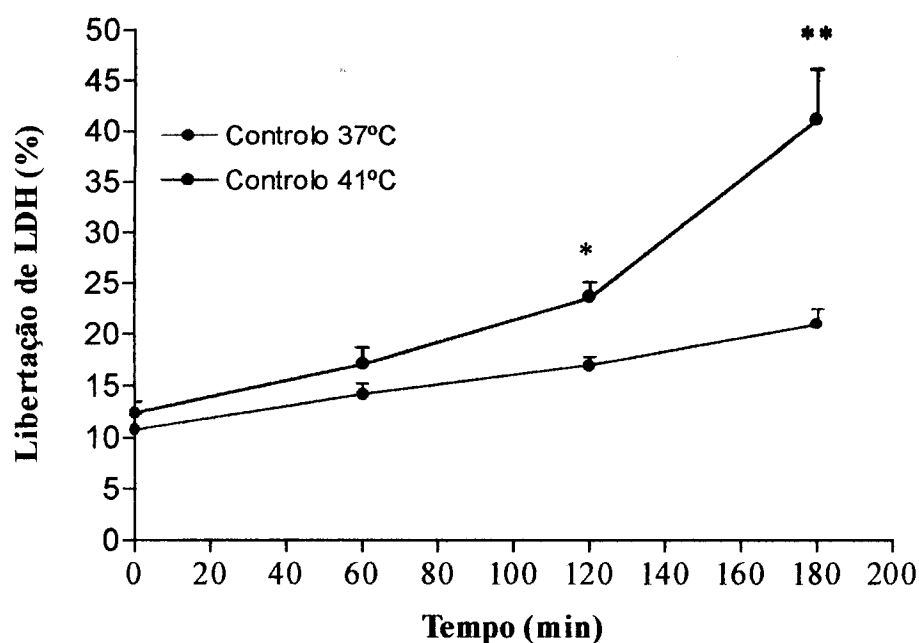
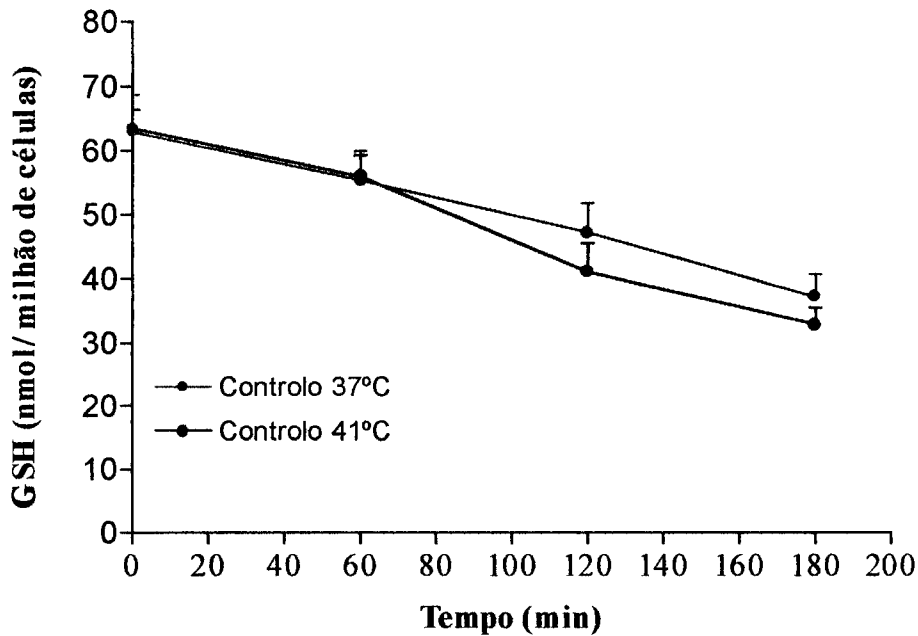


Figura 22. Efeito da temperatura na viabilidade, expresso pela libertação de LDH para o meio extracelular, em hepatócitos isolados de ratinho. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes (* $p \leq 0,05$).

• Glutathiona reduzida



• Glutathiona oxidada

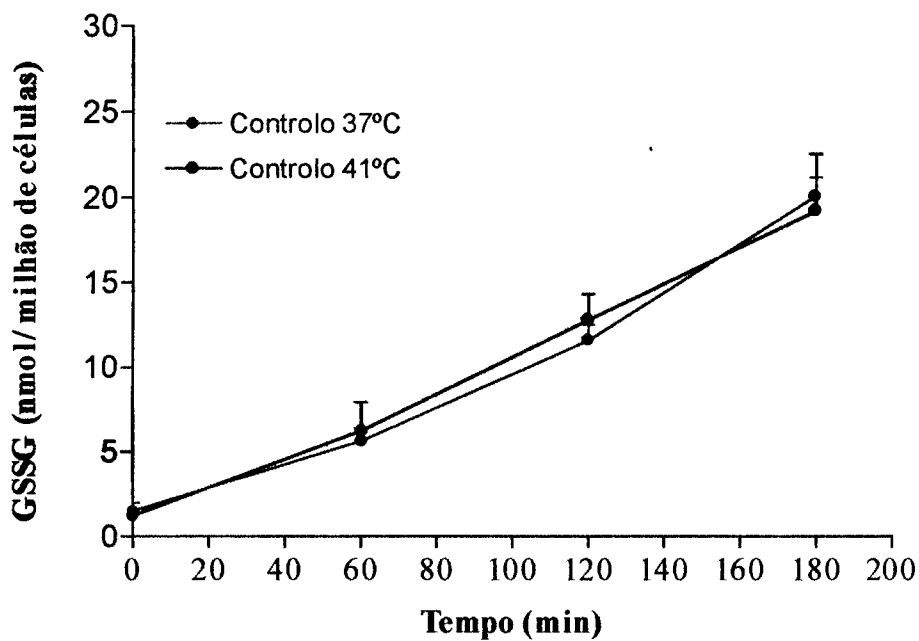


Figura 23. Efeito da temperatura nos níveis intracelulares de glutathiona reduzida e oxidada, em hepatócitos isolados de ratinho. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes.

• Peroxidação lipídica

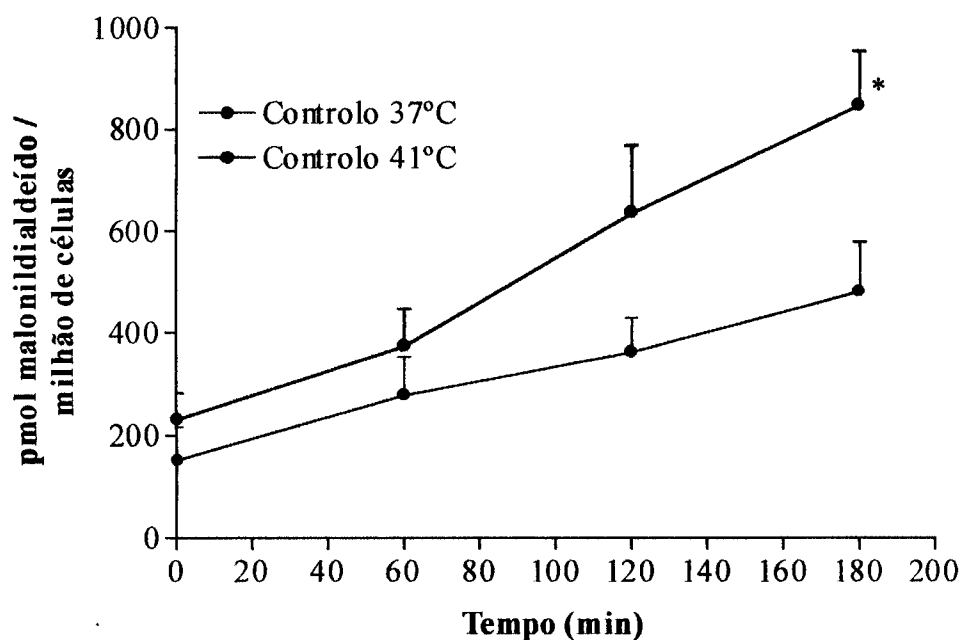


Figura 24. Efeito da temperatura na formação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico, em hepatócitos isolados de ratinho. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes (* $p \leq 0,05$).

4.3.3. Efeito da MDMA na viabilidade celular

• NORMOTERMIA

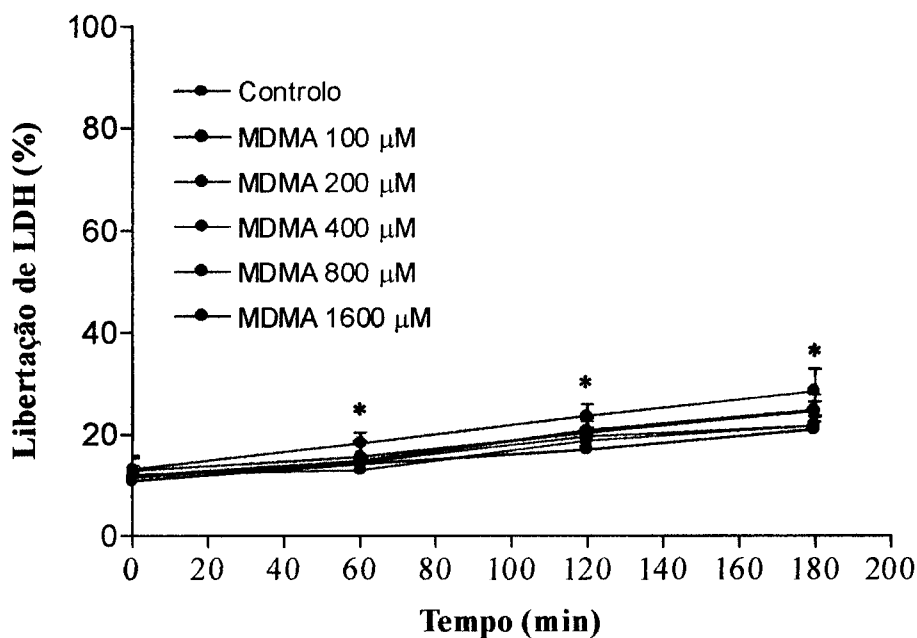


Figura 25. Efeito da MDMA na viabilidade celular, expresso pela liberação de LDH para o meio extracelular, em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 37°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes (* $p \leq 0,05$).

• HIPERTERMIA

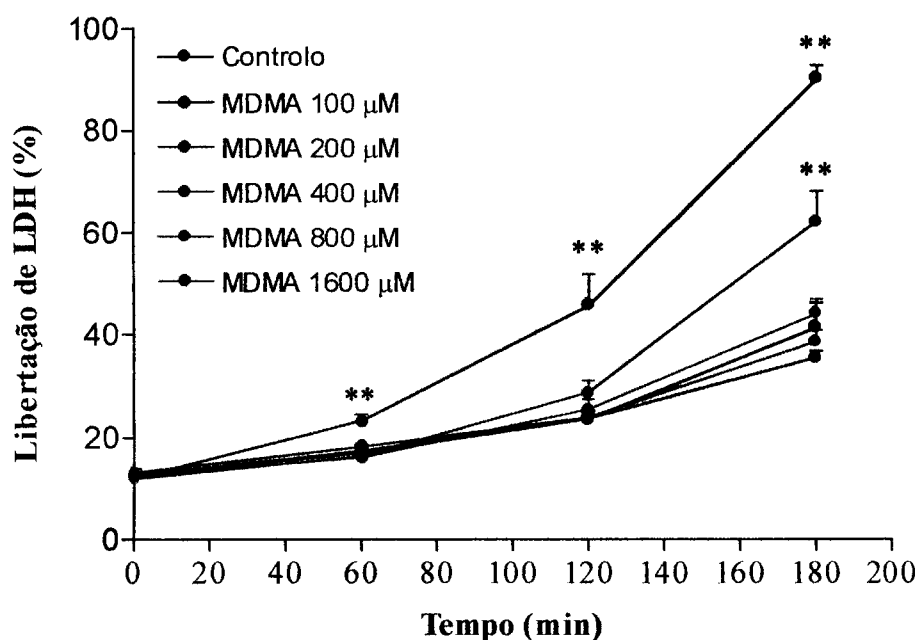


Figura 26. Efeito da MDMA na viabilidade celular, expresso pela libertação de LDH para o meio extracelular, em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 41°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 8 experiências diferentes (** $p \leq 0,01$).

4.3.4. Efeito da MDMA nos níveis intracelulares de glutathiona reduzida

• NORMOTERMIA

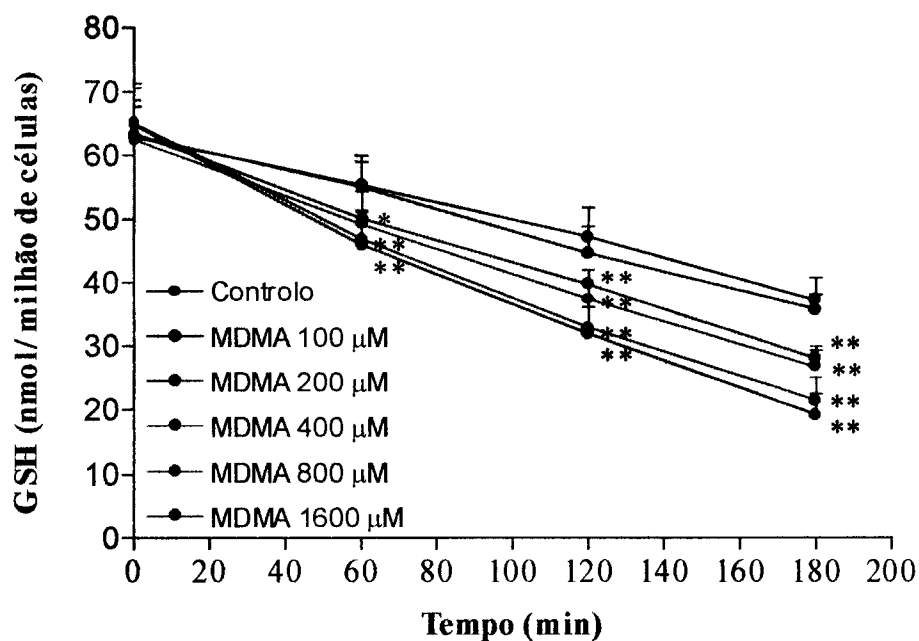


Figura 27. Efeito da MDMA no conteúdo de glutathiona reduzida em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 37°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

• HIPERTERMIA

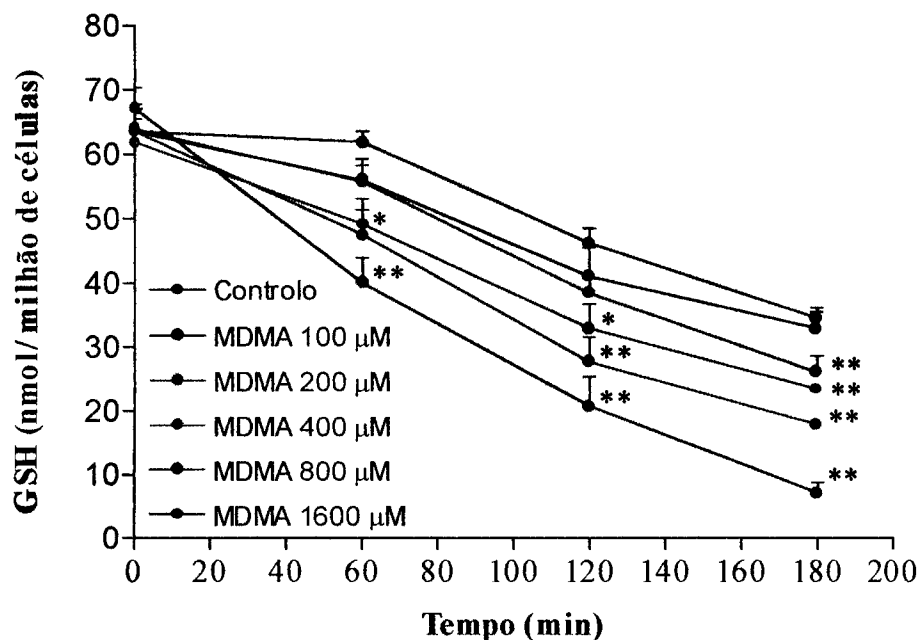


Figura 28. Efeito da MDMA no conteúdo de glutatona reduzida em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 41°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

4.3.5. Efeito da MDMA nos níveis intracelulares de glutathiona oxidada

• NORMOTERMIA

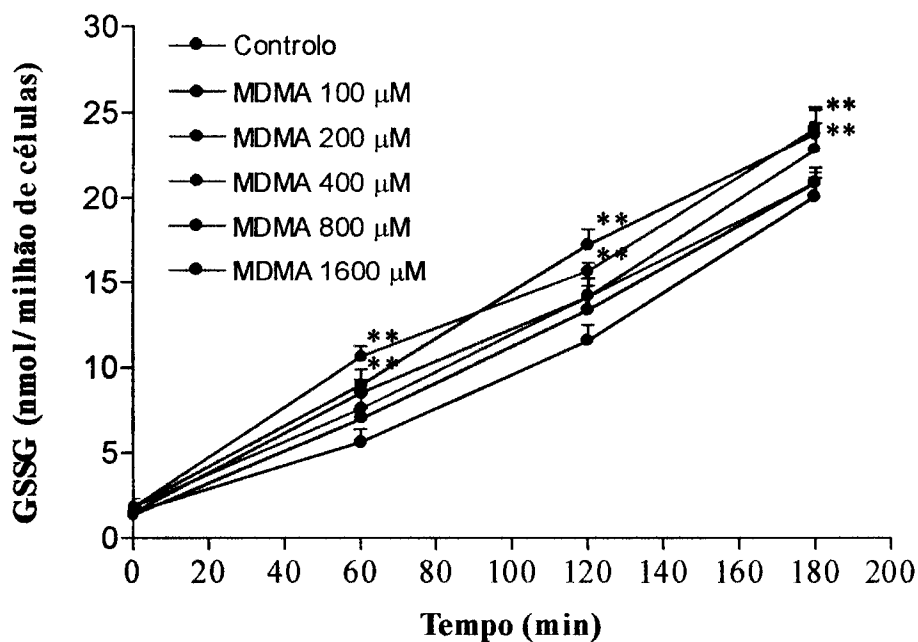


Figura 29. Efeito da MDMA no conteúdo de glutathiona oxidada em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 41°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes (** $p \leq 0,01$).

• HIPERTERMIA

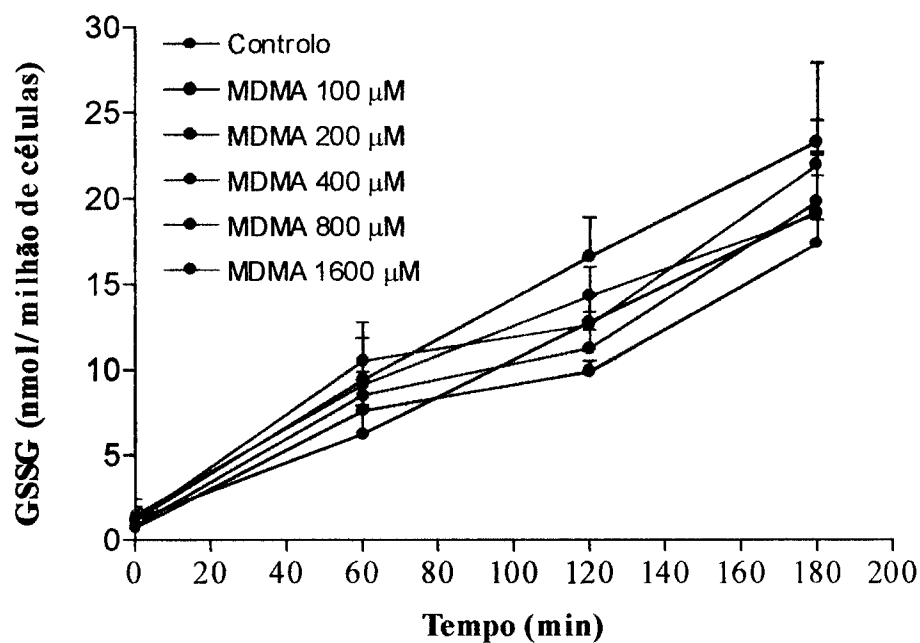


Figura 30. Efeito da MDMA no conteúdo de glutatona oxidada em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 41°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes.

4.3.6. Efeito da MDMA na extensão da peroxidação lipídica

• NORMOTERMIA

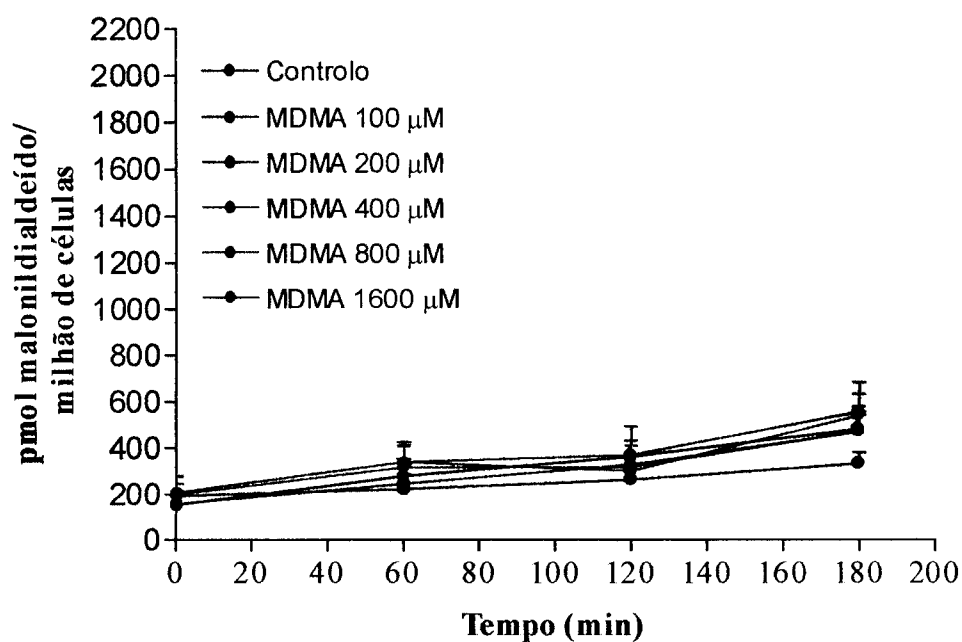


Figura 31. Efeito da MDMA na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 37°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes.

• HIPERTERMIA

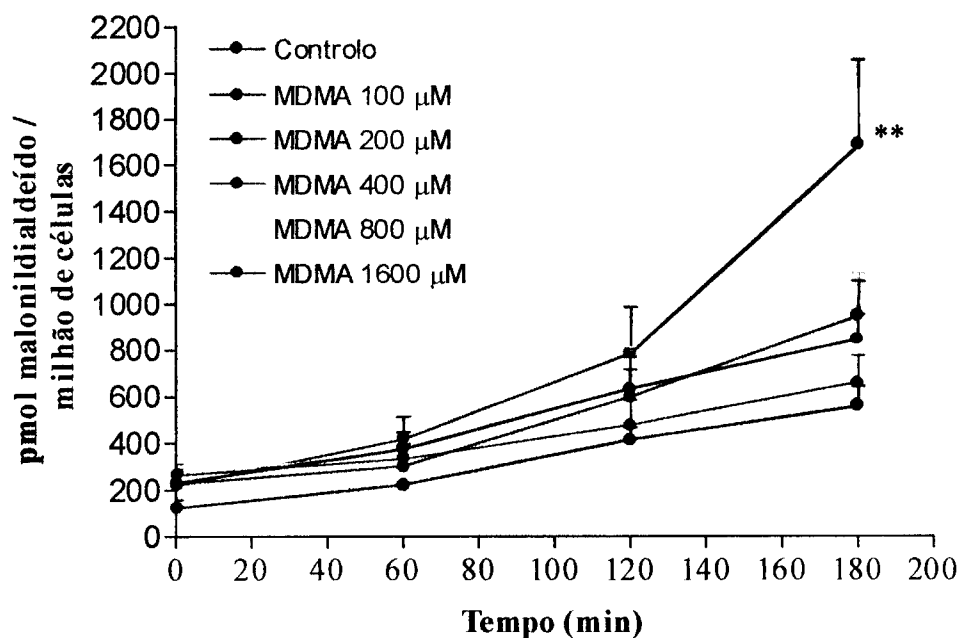


Figura 32. Efeito da MDMA na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em hepatócitos isolados de ratinho. Os hepatócitos foram incubados a 41°C com diferentes concentrações de MDMA. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão, de 5 experiências diferentes (** $p \leq 0,01$).

4.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a hipertermia, *in vivo*, induzida pela MDMA, poderá ser perniciososa para as células, como constatado quando se reproduziu esta situação em suspensões de hepatócitos isolados de ratinho. Nas células controlo (sem qualquer tratamento) a 37°C, os parâmetros quantificados permaneceram praticamente inalterados durante as 3 horas de incubação. No entanto, demonstramos que a hipertermia é, sem dúvida, um factor determinante na toxicidade celular, visto que um aumento da temperatura de incubação de 37°C para 41°C causa *stress* oxidativo nos hepatócitos isolados de ratinho, traduzido por indução da peroxidação lipídica, de forma dependente do tempo de incubação (ver Figura 24), e consequente perda da viabilidade celular (até cerca de 40% de mortalidade) (ver Figura 22), embora a variação nos níveis de GSH e de GSSG seja semelhante à observada em condições de normotermia (ver Figura 23).

Foi já demonstrado por outros autores que a hipertermia induz a peroxidação lipídica em fígado de rato (Skibba *et al.*, 1991; Ando *et al.*, 1994) e em suspensões de hepatócitos isolados de rato (Carvalho *et al.*, 1997). Os mecanismos responsáveis pelo *stress* oxidativo induzido pela hipertermia não foram ainda completamente estudados mas sabe-se que envolvem a formação de espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente de radicais superóxido e hidroxilo (Powers *et al.*, 1992; Flanagan *et al.*, 1998). Estes radicais podem-se formar após a conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, induzida pela hipertermia, e em presença de ferro (libertado pela ferritina) que funciona como catalisador na reacção de Fenton (Skibba *et al.*, 1989; Powers *et al.*, 1992). Neste trabalho, podemos verificar que ocorre peroxidação lipídica, apesar dos níveis de GSH se situarem dentro dos valores encontrados em condições de normotermia. É de referir que num estudo realizado em hepatócitos isolados de rato nas mesmas condições de hipertermia (Carvalho *et al.*, 1997) verificou-se que, paralelamente à peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular, ocorria oxidação da glutatona (depleção de GSH e aumento de GSSG). Esta diferença poderá dever-se a uma maior capacidade dos hepatócitos de ratinho para a restituição dos níveis basais ou a uma diferente distribuição intracelular dos locais de formação das espécies reactivas de oxigénio (por exemplo, na imediação dos lípidos membranares).

A MDMA causa hipertermia em animais e no Homem. No entanto, enquanto a hipertermia induzida pela MDMA em animais de experiência é dependente da dose e da temperatura ambiente (Malberg e Seiden, 1998; Dafters e Lynch, 1998; O'Shea *et al.*, 1998), no Homem este efeito parece nem sempre estar relacionado com a quantidade de droga ingerida (Henry *et al.*, 1992). Esta variabilidade interindividual ao efeito hipertérmico induzido pela MDMA pode ser explicada por uma heterogeneidade na susceptibilidade dos indivíduos a factores circunstanciais adversos, tais como temperatura ambiente elevada e agrupamento, normalmente observados em locais de consumo como festas "rave", assim como a condições fisiológicas desfavoráveis causadas por actividade física sustentada, anorexia e ingestão insuficiente de líquidos. Esta variabilidade interindividual pode ser explicada adicionalmente pela existência de diferentes fenótipos para a debrisoquina 4-hidroxilase (*CYP2D6* ou citocromo P450 2D6), enzima envolvida na desmetilação da MDMA (principal via metabólica no Homem) (Tucker *et al.*, 1994). A actividade metabólica da *CYP2D6* está diminuída em cerca de 10% da população caucasiana. Estes indivíduos poderão ser mais susceptíveis aos efeitos hipertérmicos da MDMA, uma vez que esta não sofre metabolização (Malpass *et al.*, 1999).

Neste trabalho, a incubação, a 37°C, dos hepatócitos isolados de ratinho com MDMA induziu depleção de GSH de forma dependente da concentração e do tempo de exposição (ver Figura 27) mas praticamente não teve repercussão a nível da peroxidação lipídica (ver Figura 31) e viabilidade celular (ver Figura 25). Em condições de hipertermia (41°C) verificou-se potenciação da depleção de GSH induzida pela MDMA (ver Figura 28), peroxidação lipídica (ver Figura 32) e perda de viabilidade celular (ver Figura 26), atingindo os 90-100% de mortalidade após 3 horas de incubação com MDMA na concentração mais alta estudada. Podemos assim concluir que, *in vitro*, estes dois factores, MDMA e hipertermia, em conjunto, são extremamente tóxicos. A contribuição directa da MDMA consiste essencialmente na depleção da GSH. A GSH tem um papel importante na prevenção da peroxidação lipídica que tem sido atribuída à sua acção neutralizante da oxidação e actividade regenerante dos peróxidos lipídicos e/ou radical tocoferilo (Mascio *et al.*, 1991). A depleção de GSH torna as células mais expostas ao *stress* oxidativo induzido pelas altas temperaturas de incubação, resultando na peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular.

É importante salientar que a depleção de GSH induzida pela MDMA não se acompanhou de um aumento proporcional na formação de GSSG (ver Figuras 29 e 30). Estes resultados fazem-nos suspeitar da formação de conjugados com a glutathione. Foi já demonstrado, em microsomas hepáticos de rato, que a MDMA sofre metabolização, por acção do sistema enzimático citocromo P450 2D, com formação de compostos reactivos capazes de se conjugarem com a glutathione (Hiramatsu *et al.*, 1990). O mecanismo da formação do aducto com a GSH envolve a formação de um catecol, o qual, após oxidação a quinona, reage rapidamente com grupos tióis (ver Figura 11, página 37). Os tioéteres formados por adição da GSH poderão ser intervenientes importantes nos efeitos tóxicos resultantes (Monks e Lau, 1992). Sabe-se que estes compostos não são desprovidos de reactividade e que, por vezes, esta reactividade é aumentada após conjugação com a glutathione. Os conjugados polifenólicos com a glutathione podem ainda ser oxidados com formação de quinonas-tioéteres, os quais, dada a sua reactividade, podem ligar-se a uma nova molécula de glutathione.

Embora de forma especulativa, podemos admitir que a formação deste aducto com a glutathione poderá ser, pelo menos em parte, responsável pela depleção de GSH, demonstrada previamente num estudo realizado em hepatócitos isolados de rato (Beitia *et al.*, 1999) e confirmada no presente trabalho em hepatócitos isolados de ratinho. Atendendo ao papel da GSH nos processos de protecção celular contra espécies reactivas de oxigénio e contra a acção nefasta de vários xenobióticos electrofílicos, a sua depleção assume, do ponto de vista toxicológico, particular relevância podendo constituir um passo inicial para a acção hepatotóxica da MDMA.

É de referir que durante este trabalho foram colhidas amostras de suspensões de hepatócitos incubadas com MDMA para futura caracterização por espectroscopia de massa de eventuais aductos formados durante o metabolismo da MDMA. A sua eventual caracterização poderá ser definitiva na elucidação do mecanismo inerente à depleção da GSH.

Paralelamente, as quinonas formadas durante o metabolismo da MDMA podem entrar num ciclo "redox" (as semiquinonas são re-oxidadas a quinonas) e, na presença de oxigénio molecular, levar à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS),

nomeadamente o anião superóxido, peróxido de hidrogénio e radical hidroxilo (ver Bolton *et al.*, 2000). Assim, o metabolismo da MDMA pode levar à formação de compostos potenciamente tóxicos capazes de provocar danos irreversíveis nas células secundariamente ao esgotamento dos mecanismos de defesa antioxidantes, o qual pode ocorrer, por exemplo, durante a hipertermia.

Podemos concluir, em corolário, que a hipertermia potencia a toxicidade induzida pela MDMA em hepatócitos isolados de ratinho. Este sinergismo tóxico entre a MDMA e a hipertermia não havia ainda sido estudado pelo que os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para um melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade da MDMA e ajudar a compreender a razão pela qual a MDMA é hepatotóxica para alguns consumidores.

CAPÍTULO V

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

➤ Ensaio *in vivo*:

1. A MDMA (10 e 20 mg/Kg, i.p.) evidenciou-se anoréctica em ratinhos Charles River, sendo o efeito observado dependente da dose.
2. A MDMA (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) induz hipertermia em ratinhos Charles River, de forma dependente da dose. Este efeito é potenciado pelo aumento da temperatura ambiente.
3. A letalidade induzida pela MDMA (20 mg/Kg, i.p.) é potenciada pelo aumento da temperatura ambiente.
4. A MDMA induz depleção de GSH hepática em ratinhos Charles River, efeito este observado ao fim de 24 horas.
5. A MDMA (20 mg/Kg, i.p.) induz peroxidação lipídica no fígado de ratinhos Charles River mantidos em jejum e à temperatura ambiente de 30°C, durante 24 horas.
6. A MDMA (5, 10 e 20 mg/Kg, i.p.) não induz o aumento dos níveis plasmáticos de AST, ALT e ALP em ratinhos Charles River ao fim de 24 horas. O exame histológico a cortes de fígado destes animais não revela lesão hepática.
7. A MDMA induz uma diminuição da actividade da catalase hepática em ratinhos Charles River (expostos à Ta 30°C) e da actividade da glutathione peroxidase (animais com livre acesso à ração e expostos à Ta 30°C) ao fim de 24 horas, embora não modifique a actividade hepática da glutathione transferase, glutathione reductase e superóxido dismutase.

➤ Ensaios *in vitro*:

8. Um aumento da temperatura de incubação de 37°C para 41°C causa *stress* oxidativo nos hepatócitos isolados de ratinho, traduzida por indução da peroxidação lipídica e perda da viabilidade celular (até cerca de 40% de mortalidade), embora a variação nos níveis de GSH e de GSSG seja semelhante à observada em condições de normotermia.
9. A MDMA induz a depleção de GSH em hepatócitos isolados de ratinho Charles River incubados a 37°C, de forma dependente da concentração e do tempo de exposição. Este efeito é potenciado a 41°C.
10. A MDMA não induz peroxidação lipídica em hepatócitos isolados de ratinho a 37°C mas induz peroxidação lipídica a 41°C na concentração mais alta estudada.
11. A MDMA induz perda de viabilidade celular de forma dependente da concentração e do tempo de exposição. Este efeito é apenas moderado a 37°C mas atinge os 90-100% de mortalidade a 41°C após 3 horas de contacto com MDMA na concentração mais alta estudada.

CAPÍTULO VI

Referências Bibliográficas

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. In *Oxygen Radicals in Biological Systems: Methods in Enzymology*. ed. Packer, L. pp. 121-126. New York: Academic Press.
- Aguirre, N., Barrionuevo, M., Lasheras, B. & Río, J.D. (1998). The role of dopaminergic systems in the perinatal sensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **286**, 1159-1165.
- Aguirre, N., Frechilla, D., García-Osta, A., Lasheras, B. & Río, J.D. (1997). Differential regulation by methylenedioxymethamphetamine of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor density and mRNA expression in rat hippocampus, frontal cortex, and brainstem: the role of corticosteroids. *J Neurochem*, **68**, 1099-1105.
- Allen, R.P., McCann, U.D. & Ricaurte, G.A. (1993). Persistent effects of (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on human sleep. *Sleep*, **16**, 560-564.
- Ando, M., Katagiri, K., Yamamoto, S., Asanuma, S., Usuda, M., Kawahara, I. & Wakamatsu, K. (1994). Effect of hyperthermia on glutathione peroxidase and lipid peroxidative damage in liver. *J Therm Biol*, **19**, 177-185.
- Andreu, V., Mas, A., Bruguera, M., Salmerón, J.M., Moreno, V., Nogué, S. & Rodés, J. (1998). Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. *J Hepatology*, **29**, 394-397.
- Axt, K.J., Mamounas, L.A. & Molliver, M.E. (1994). Structural features of amphetamine neurotoxicity in the brain. In *Amphetamine and its analogs*. ed. Cho, A.K. & Segal, D.S. pp. 315-367. San Diego: Academic Press.
- Baez, S., Linderson, Y. & Segura-Aguilar, J. (1995). Superoxide dismutase and catalase enhance autoxidation during one-electron reduction of aminochrome by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochemical and Molecular Medicine*, **54**, 12-18.
- Baez, S. & Segura-Aguilar, J. (1994). Formation of reactive oxygen species during one-electron reduction of noradrenochrome catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Redox Report*, **1**, 65-70.
- Bai, F., Lau, S.S. & Monks, T.J. (1999). Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of amethyldopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*, **12**, 1150-1157.

- Balkovetz, D.F., Tiruppathi, C., Leibach, F.H., Mahesh, V.B. & Ganapathy, V. (1989). Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem*, **264**, 2195-2198.
- Barish, P. & Tintinalli, J. (1990). Designer drugs. In *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. ed. Haddad, L.M. & Winchester, J.F. pp. 770-771. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Battaglia, G., Brooks, B.P., Kulsakdinum, C. & Sousa, E.B.D. (1988). Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur J Pharmacol*, **149**, 159-163.
- Battaglia, G., Yeh, S.Y., O'Hearn, E., Molliver, M.E., Kuhar, M.J. & Sousa, E.B.D. (1987). 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*, **242**, 911-916.
- Baudot, P., Dayre, S., Laval, R., Viriot, M.-L. & Carre, M.-C. (1998). «Ecstasy» (3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA) et dérivés. *Ann Fals Exp Chim*, **942**, 81-100.
- Beitia, G., Cobreros, A., Sainz, L. & Cenarruzabeitia, E. (1999). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced hepatotoxicity: effect on cytosolic calcium signals in isolated hepatocytes. *Liver*, **19**, 234-241.
- Benazzi, F. & Mazzoli, M. (1991). Psychiatric illness associated with "ecstasy". *Lancet*, **338**, 1520.
- Bengel, D., Murphy, D.L. & Lesch, K.-P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Molecular Pharmacology*, **53**, 649-655.
- Bergermeyer, H.U., Bernt, E. & Hess, B. (1965). . In *Methods in enzymatic analysis*. ed. Bergermeyer.
- Berry, M.N., Edwards, A.M. & Barritt, G.J. (1991). Isolated hepatocytes preparation, properties and applications: assessment of integrity of isolated hepatocytes. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. ed. Burdon, R.H. & Knippenberg, P.H. pp. 83-12. New York: Elsevier.

- Better, O.S. & Stein, J.H. (1990). Early management of shock and prophylaxis of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis. *N Engl J Med*, **322**, 825-829.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P. & Deeble, D.J. (1992). Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology and Medicine*, **13**, 391-405.
- Bitsch, A., Thiel, A., Rieckmann, P. & Prange, H. (1996). Acute inflammatory CNS Disease after MDMA ("ecstasy"). *Eur Neurol*, **36**, 328-329.
- Bolla, K.I., McCann, U. & Ricaurte, G.A. (1998). Memory impairment in abstinent MDMA ("ecstasy") users. *Neurology*, **51**, 1532-1537.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. & Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*, **13**, 135-160.
- Brauer, R.B., Heidecke, C.D., Nathrath, W., Beckurts, K.T.E., Vorwald, P., Zilker, T.R., Schweigart, U., Holscher, A.H. & Siewert, J.R. (1997). Liver transplantation for the treatment of fulminant hepatic failure induced by the ingestion of ecstasy. *Transpl Int*, **10**, 229-233.
- Bray, T.M. & Taylor, C.G. (1994). Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition. *Biochem Pharmacol*, **47**, 2113-2123.
- Brodkin, J., Malyala, A. & Nash, J.F. (1993). Effect of acute monamine depletion on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacol Biochem Behav*, **45**, 647-653.
- Brody, S., Krause, C., Veit, R. & Rau, H. (1998). Cardiovascular autonomic dysregulation in users of MDMA ("ecstasy"). *Psychopharmacology*, **136**, 390-393.
- Broening, H.W., Bowyer, J.F. & Slikker, W. (1994). Age modulates the long-term but not the acute effects of the serotonergic neurotoxicant 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, **271**, 285-293.
- Broening, H.W., Bowyer, J.F. & Slikker, W. (1995). Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant ($\pm$)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 325-333.
- Bronson, M.E., Barrios-Zambrano, L., Jiang, W., Clark, C.R., DeRuiter, J. & Newland, M.C. (1994). Behavioral and developmental effects of two 3,4-

- methylenedioxymethamphetamine (MDMA) derivatives. *Drug Alcohol Depend*, **36**, 161-166.
- Brown, C. & Osterloh, J. (1987). Multiple severe complications from recreational ingestion of MDMA ("Ecstasy"). *JAMA*, **258**, 780-781.
- Budaravi, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E. & Kinneary, J.F. (1996). *The Merck Index*. Rahway, USA: Merck & Co.
- Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L. & Lasón, W. (1996). The effect of repeated amphetamine and cocaine administration on adrenal, gonadal and thyroid hormone levels in the rat plasma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **104**, 334-338.
- Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*. pp. 302-310.
- Burnat, P., Brumant-Payen, C.L., Huart, B., Ceppa, F. & Pailler, F.M. (1996). L'ecstasy: psychostimulant, hallucinogène et toxique. *Presse Med*, **25**, 1208-1212.
- Cadet, J.L., Ladenheim, B., Baum, I., Carlson, E. & Epstein, C. (1994). CuZn-superoxide dismutase (CuZnSOD) transgenic mice show resistance to the lethal effects of methylenedioxyamphetamine (MDA) and of methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res*, **655**, 259-262.
- Cahill, D.W., Knipp, H. & Mosser, J. (1981). Intracranial hemorrhage with amphetamine abuse. *Neurology*, **31**, 1058-1059.
- Caldwell, J. (1980). Amphetamines and related stimulants: some introductory remarks. In *Amphetamines and Related Stimulants: Chemical, Biological, Clinical, and Sociological Aspects*. ed. Caldwell, J. pp. 1-11. Florida: CRC Press.
- Call, T.D., Hartneck, J., Dickinson, W.A., Hartman, C.W. & Bartel, A.G. (1982). Acute cardiomyopathy secondary to intravenous amphetamine abuse. *Ann. Int. Med.*, **97**, 559-560.
- Callaway, C.W., Rempel, N., Peng, R.Y. & Geyer, M.A. (1992). Serotonin 5-HT₁-like receptors mediate hyperactivity in rats induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neuropsychopharmacology*, **7**, 113-127.
- Cami, J., DelaTorre, R. & Ortuno, J. (1997). Pharmacokinetics of ecstasy (MDMA) in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **52 (suppl)**, A168.
- Carlberg, I. & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, **113**, 484-490.

- Carvalho, F., Fernandes, E., Remião, F. & Bastos, M.L. (1999). Effect of *d*-amphetamine repeated administration on rat antioxidant defences. *Arch Toxicol*, **73**, 83-89.
- Carvalho, F., Remião, F., Amado, F., Domingues, P., Correia, A.J.F. & Bastos, M.L. (1996). *d*-Amphetamine interaction with glutathione in freshly isolated rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol*, **9**, 1031-1036.
- Carvalho, F., Remião, F., Soares, M.E., Catarino, R., Queiroz, G. & Bastos, M.L. (1997). *d*-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol*, **71**, 429-436.
- Carvalho, F.D. (1998). Estudo da hepatotoxicidade da *d*-anfetamina. Ensaio *in vivo* e *in vitro*. In *Faculdade de Farmácia*. pp. 153. Porto: Universidade do Porto.
- Carvalho, F.D., Bastos, M.L. & Timbrell, J.A. (1993). Depletion of total non-protein sulphhydryl groups in mouse tissues after administration of *d*-amphetamine. *Toxicol*, **83**, 31-40.
- Che, S., Johnson, M., Hanson, G.R. & Gibb, J.W. (1995). Body temperature effect on methylenedioxymethamphetamine-induced acute decrease in tryptophan hydroxylase activity. *Eur J Pharmacol*, **293**, 447-453.
- Chenard-Neu, M.-P., Boudjema, K., Bernuau, J., Degott, C., Belghiti, J. & Cherqui, D. (1996). Auxiliary liver transplantation: regeneration of the native liver and outcome in 30 patients with fulminant hepatic failure - a multicenter european study. *Hepatology*, **23**, 1119-1127.
- Christophersen, A. (2000). Amphetamine designer drugs - an overview and epidemiology. *Toxicology Letters*, **15**, 127-131.
- Citron, B.P., Halpern, M., McCarron, M., Lundberg, G.D., McCormick, R., Pincus, I.J., Tatter, D. & Haverback, B.J. (1970). Necrotizing angitis associated with drug abuse. *New Eng J Med*, **283**, 1003-1011.
- Cohen, R.S. (1996). Adverse symptomatology and suicide associated with the use of methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy"). *Biol Psychiatry*, **39**, 819-820.
- Colado, M.I., Esteban, B., O'Shea, E., Granados, R. & Green, A.R. (1999a). Studies on the neuroprotective effect of pentobarbitone on MDMA-induced neurodegeneration. *Psychopharmacology*, **142**, 421-425.

- Colado, M.I., Granados, R., O'Shea, E., Esteban, B. & Green, A.R. (1999b). The acute effect in rats of 3,4-methylenedioxyethamphetamine (MDEA, "eve") on body temperature and long term degeneration of 5-HT neurones in brain: a comparison with MDMA ("ecstasy"). *Pharmacology & Toxicology*, **84**, 261-266.
- Colado, M.I., Granados, R., O'Shea, E., Esteban, B. & Green, A.R. (1998). Role of hyperthermia in the protective action of clomethiazole against MDMA ("ecstasy")-induced neurodegeneration, comparison with novel NMDA channel blocker AR-R15896AR. *Br J Pharmacol*, **124**, 479-484.
- Colado, M.I. & Green, A.R. (1995). The spin trap reagent α -phenyl-N-tert-butyl nitron prevents "ecstasy"-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur J Pharmacol*, **280**, 343-346.
- Colado, M.I. & Green, A.R. (1994). A study of the mechanism of MDMA ("ecstasy")-induced neurotoxicity of 5-HT neurones using chlormethiazole, dizocilpine and other protective compounds. *Br J Pharmacol*, **111**, 131-136.
- Colado, M.I., Murray, T.K. & Green, A.R. (1993). 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*, **108**, 583-589.
- Colado, M.I., O'Shea, E., Esteban, B., Granados, R. & Green, A.R. (1999c). In vivo evidence against clomethiazole being neuroprotective against MDMA ("ecstasy")-induced degeneration of rat brain 5-HT nerve terminals by a free radical scavenging mechanism. *Neuropharmacology*, **38**, 307-314.
- Colado, M.I., O'Shea, E., Granados, R., Esteban, B., Martín, A.B. & Green, A.R. (1999d). 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;ecstasy) administration. *Br J Pharmacol*, **126**, 911-924.
- Colado, M.I., O'Shea, E., Granados, R., Misra, A., Murray, T.K. & Green, A.R. (1997a). A study of the neurotoxic effect of MDMA ("ecstasy") on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. *Br J Pharmacology*, **108**, 583-589.
- Colado, M.I., O'Shea, E., Granados, R., Murray, T.K. & Green, A.R. (1997b). *In vivo* evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT

- following administration of MDMA ("ecstasy") and *p*-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br J Pharmacol*, **121**, 889-900.
- Colado, M.I., Williams, J.L. & Green, A.R. (1995). The hyperthermic and neurotoxic effects of "ecstasy" (MDMA) and 3,4-methylenedioxymphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br J Pharmacol*, **115**, 1281-1289.
- Commings, D.L., Vosmer, G., Virus, R.M., Woolverton, W.L., Schuster, C.R. & Seiden, L.S. (1987). Biochemical and histological evidence that methylenedioxymphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **241**, 338-345.
- Comporti, M. (1998). Lipid peroxidation as a mediator of chemical-induced hepatocyte death. In *Toxicology of the liver*. ed. Plaa, G.L. & Hewitt, W.R. pp. 221-: Taylor & Francis.
- Connor, T.J., McNamara, M.G., Finn, D., Currid, A., O'Malley, M., Redmond, A.M., Kelly, J.P. & Leonard, B.E. (1998). Acute 3,4-methylenedioxymphetamine (MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. *Immunopharmacology*, **38**, 253-260.
- Connor, T.J., McNamara, M.G., Kelly, J.P. & Leonard, B.E. (1999). 3,4-methylenedioxymphetamine (MDMA; ecstasy) administration produces dose-dependent neurochemical, endocrine and immune changes in the rat. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*, **14**, 95-104.
- Coore, J.R. (1996). A fatal trip with ecstasy: a case of 3,4-methylenedioxymphetamine/ 3,4-methylenedioxymphetamine toxicity. *J R Soc Med*, **89**, 51-52.
- Cox, D.E. & Williams, K.R. (1996). "ADAM" or "EVE"? - a toxicological conundrum. *Forensic Sci Int*, **77**, 101-108.
- Creighton, F.J., Black, D.L. & Hyde, C.E. (1991). "Ecstasy" psychosis and flashbacks. *J Psychiatry*, **159**, 713-715.
- Dafters, R.I. (1995). Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consumption and chronic dosing. *Physiol Behav*, **58**, 877-882.

- Dafters, R.I. & Lynch, E. (1998). Persistent loss of thermoregulation in the rat induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") but not by fenfluramine. *Psychopharmacology*, **138**, 207-212.
- Dal Cason, T.A. (1989). The characterization of some 3,4-methylenedioxyphenylisopropylamine (MDA) analogs. *JFSCA*, **34**, 928-961.
- Dal Cason, T.A. (1990). An evaluation of the potential for clandestine manufacture of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) analogs and homologs. *JFSCA*, **35**, 675-697.
- Dar, K.J. & McBrien, M.E. (1996). MDMA induced hyperthermia: report of a fatality and review of current therapy. *Intensive Care Med*, **22**, 995-996.
- Delaney, P. & Estes, M. (1980). Intracranial hemorrhage with amphetamine abuse. *Neurology*, **30**, 1125-1128.
- Del Arco, A., González-Mora, J.L., Armas, V.R. & Mora, F. (1999). Amphetamine increases the extracellular concentration of glutamate in striatum of the awake rat: involvement of high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacology*, **38**, 943-954.
- De la Torre, R., Farre, M., Ortuno, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P.N., Segura, J. & Cami, J. (2000). Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br J Clin Pharmacol*, **49**, 104-109.
- De Leve, L. & Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology and Therapeutics*, **52**, 287-305.
- Denborough, M.A. & Hopkinson, K.C. (1997). Dantrolene and "ecstasy". *Med J Aust*, **166**, 165-166.
- Dhalla, K.S., Rupp, H., Beamish, R.E. & Dhalla, N.S. (1996). Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca^{2+} transport due to excess catecholamines. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 231-238.
- Dhalla, N.S., Yates, J.C., Naimark, B., Dhalla, K.S., Beamish, R.E. & Ostadal, B. (1992). Cardiotoxicity of catecholamines and related agents. In *Cardiovascular Toxicology*. ed. Acosta, D. pp. 239-282. New York: Raven Press.
- Dowling, G.P., McDonough, E.T. & Bost, R.O. (1987). "Eve" and "Ecstasy": a report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA. *JAMA*, **257**, 1615-1617.
- Dyckhuizen, R.S., Brunt, P.W., Atkinson, P., Simpson, J.G. & Smith, C.C. (1995). Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. *Gut*, **36**, 939-941.

- Elliott, A.J., Scheiber, S.A., Thomas, C. & Pardini, R.S. (1992). Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem Pharmacol*, **44**, 1603-1608.
- Ellis, A., Wendon, J., Portmann, B. & Williams, R. (1996). Acute liver damage and ecstasy ingestion. *Gut*, **38**, 454-458.
- Ensslin, H.K., Maurer, H.H., Gouzoulis, E., Hermle, L. & Kovar, K.-A. (1996). Metabolism of racemic 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in humans. *Drug Metabol Dispos*, **24**, 813-820.
- Eriksson, M., Jonsson, B., Steneroth, G. & Zetterström, R. (1994). Cross-sectional growth of children whose mothers abused amphetamines during pregnancy. *Acta Paediatr*, **83**, 612-617.
- Fallon, J.K., Kicman, A.T., Henry, J.A., Milligan, P.J., Cowan, D.A. & Hutt, A.J. (1999). Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in Humans. *Clinical Chemistry*, **45**, 1058-1069.
- Faraj, B.A., Olkowski, Z.L. & Jackson, R.T. (1994). Active [3H]-dopamine uptake by human lymphocytes: correlates with serotonin transporter activity. *Pharmacology*, **48**, 320-327.
- Farfel, G.M. & Seiden, L.S. (1995). Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. I. Experiments using 3,4-methylenedioxymethamphetamine, dizocilpine, CGS 19755 and NBQX. *J Pharmacol Exp Ther*, **272**, 860-867.
- Ferigolo, M., Medeiros, F.B. & Barros, H.M. (1998). Êxtase: revisão farmacológica. *Rev Saude Publica*, **32**, 487-495.
- Fernandes, E.R., Carvalho, F.D., Remião, F., Bastos, M.L., Pinto, M. & Gottlieb, O.R. (1995). Hepatoprotective activity of xanthenes and xanthonolignoids against tert-butylhydroperoxide-induced toxicity in rat isolated hepatocytes - comparison with silybin. *Pharm Res*, **12**, 1756-1760.
- Fidler, H., Dhillon, A., Gertner, D. & Burroughs, A. (1996). Chronic ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) abuse: a recurrent and unpredictable cause of severe acute hepatitis. *J Hepatology*, **25**, 563-566.

- Fineschi, V., Centini, F., Mazzeo, E. & Turillazzi, E. (1999). Adam (MDMA) and Eve (MDA) misuse: an immunohistochemical study on three fatal cases. *Forensic Science International*, **104**, 65-74.
- Fineschi, V. & Masti, A. (1996). Fatal poisoning by MDMA (ecstasy) and MDEA: a case report. *Int J Legal Med*, **108**, 272-275.
- Fitzgerald, J.L. & Reid, J.J. (1990). Effects of methylenedioxymethamphetamine on the release of monoamines from rat brain slices. *Eur J Pharmacol*, **191**, 217-220.
- Fitzgerald, J.L. & Reid, J.J. (1994). Sympathomimetic actions of methylenedioxymethamphetamine in rat and rabbit isolated cardiovascular tissues. *J Pharm Pharmacol*, **46**, 826-832.
- Flanagan, S.W., Moseley, P.L. & Buettner, G.R. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.*, **431**, 285-286.
- Flohé, L. & F, O. (1984). Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, **105**, 93-104.
- Flohé, L. & Gunzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol*, **105**, 114-121.
- Foley, R.J., Kapatkin, K., Verani, R. & Weinman, E.J. (1984). Amphetamine-induced acute renal failure. *South Med J*, **77**, 258-260.
- Fredericks, W.M. & Bosch, K.S. (1997). Localization of superoxide dismutase activity in rat tissues. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 241-248.
- Freire-Garabal, M., Balboa, J.L., Núñez, M.J., Cataño, M.T., Llovo, J.B., Fernández-Rial, J.C. & Belmonte, A. (1991). Effects of amphetamine on T-cell immune response in mice. *Life Sci.*, **49**, 107-112.
- Freire-Garabal, M., Núñez, M.J., Balboa, J.L., Fernández-Rial, J.C. & Belmonte, A. (1992). Effects of amphetamine on the activity of phagocytosis in mice. *Life Sci.*, **51**, 145-148.
- Fuller, R.W. & Henderson, M.G. (1994). Neurochemistry of halogenated amphetamines. In *Amphetamine and its analogs*. ed. Cho, A.K. & Segal, D.S. San Diego.: Academic Press.
- Ganapathy, V., Prasad, P.D., Ganapathy, M.E. & Leibach, F.H. (1999). Drugs of abuse and placental transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1**, 99-100.

- Garrett, E.R., Seyda, K. & Marroum, P. (1991). High performance liquid chromatographic assays of the illicit designer drug "ecstasy", a modified amphetamine, with applications to stability, partitioning and plasma protein binding. *Acta Pharm Nord*, **3**, 9-14.
- Gartside, S.E., McQuade, R. & Sharp, T. (1996). Effects of repeated administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 5-hydroxytryptamine neuronal activity and release in the rat brain *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*, **279**, 277-283.
- Gledhill, J.A., Moore, D.F., Bell, D. & Henry, J.A. (1993). Subarachnoid haemorrhage associated with MDMA abuse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **56**, 1036-1037.
- Glennon, R.A. (1999). Arylalkylaminodrugs of abuse: an overview of drug discrimination studies. *Pharmacol Biochem Behav*, **64**, 251-256.
- Glennon, R.A., Liebowitz, S.M. & Anderson, G.M. (1980). Serotonin receptor affinities of psychoactive phenalkylamine analogues. *J Med Chem*, **23**, 294-299.
- Gordon, C.J., Watkinson, W.P., O'Callaghan, J.P. & Miller, D.B. (1991). Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, **38**, 339-344.
- Green, A., Cross, A. & Goodwin, G. (1995). Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy"). *Psychopharmacology*, **119**, 247-260.
- Grob, C.S., Bravo, G.L., Walsh, R.N. & Liester, M.B. (1992). The MDMA-neurotoxicity controversy: implications for clinical research with novel psychoactive drugs. *J Nerv Ment Dis*, **180**, 355-356.
- Grob, C.S., Poland, R.E., Chang, L. & Ernst, T. (1996). Psychobiologic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans: methodological considerations and preliminary observations. *Behavioural Brain Research*, **73**, 103-107.
- Gudelsky, G.A. (1996). Effect of ascorbate and cysteine on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of brain serotonin. *J Neural Transm*, **103**, 1397-1404.
- Gudelsky, G.A. & Nash, J.F. (1996). Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J Neurochem*, **66**, 243-249.

- Gudelsky, G.A., Yamamoto, B.K. & Nash, J.F. (1994). Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by 5-HT₂ receptor agonists. *Eur J Pharmacol*, **264**, 325-330.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**, 7130-7139.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in Human disease. *American Journal of Medicine*, **91**, 14S-22S.
- Hanyu, S., Ikeguchi, K., Imai, H., Imai, N. & Yoshida, M. (1995). Cerebral infarction associated with 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") abuse. *Eur Neurol*, **35**, 173.
- Hastings, T.G., Lewis, D.A. & Zigmond, M.x. (1996). Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1956-1961.
- Hegadoren, K.M., Baker, G.B. & Bourin, M. (1999). 3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. *Neurosci Biobehav Rev*, **23**, 539-553.
- Helmlin, H.-J., Bracher, K., Bourquin, D., Vonlanthen, D., Brenneisen, R. & Styk, J. (1996). Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, **20**, 432-440.
- Henry, J.A., Jeffreys, K.J. & Dawling, S. (1992). Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet*, **340**, 384-387.
- Hewitt, K.E. & Green, A.R. (1994). Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA ('Ecstasy') to rats. *Neuropharmacology*, **33**, 1589-1595.
- Heye, N. & Hankey, G.J. (1996). Amphetamine-associated stroke. *Cerebrovasc. Dis.*, **6**, 149-155.
- Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Unger, S.E. & Cho, A.K. (1990). Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther*, **254**, 521-527.
- Hirata, H., Ladenheim, B., Rothman, R.B., Epstein, C. & Cadet, J.L. (1995). Methamphetamine-induced serotonin neurotoxicity is mediated by superoxide radicals. *Brain Res*, **677**, 345-347.

- Hoffman, B.B. & Lefkowitz, R.J. (1996). Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. ed. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. & Gilman, A.G. pp. 199-248. New York: McGraw-Hill.
- Holden, R. & Jackson, M.A. (1996). Near-fatal hyponatraemic coma due to vasopressin over-secretion after "ecstasy" (3,4-MDMA). *Lancet*, **347**, 1052.
- Holland, J. (1999). Positron emission tomography findings in heavy users of MDMA. *Lancet*, **353**, 592.
- House, R.V., Thomas, P.T. & Bhargava, H.N. (1994). Comparison of immune functional parameters following in vitro exposure to natural and synthetic amphetamines. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **16**, 1-21.
- House, R.V., Thomas, P.T. & Bhargava, H.N. (1995). Selective modulation of immune function resulting from in vitro exposure to methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *Toxicology*, **96**, 59-69.
- Huether, G., Zhou, D. & Rüther, E. (1997). Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its congeners. *J Neural Transm*, **104**, 771-794.
- Iio, M., Kawaguchi, H., Sakota, Y., Otonari, J. & Nitahara, H. (1993). Effects of polyphenols, including flavonoids, on glutathione S-transferase and glutathione reductase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1678-1680.
- Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. & McLellan, R.A. (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *TiPS*, **20**, 342-349.
- Insel, T.R., Battaglia, G., Johannessen, J.N., Marra, S. & DeSouza, E.B. (1989). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") selectively destroys brain serotonin terminals in Rhesus Monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, **249**, 713-720.
- Irwin, M., Hauger, R.L., Jones, M., Provencio, M. & Britton, K.T. (1990). Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 101-107.
- Jansen, K.L.R. (1999). Ecstasy (MDMA) dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, **53**, 121-124.

- Jauregui, H.O., Hayner, N.T., Driscoll, J.L., Williams-Holland, R., Lipsky, M.H. & Galletti, P.M. (1981). Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes - freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro*, **17**, 1100-1110.
- Jayanthi, S., Ladenheim, B., Andrews, A.M. & Cadet, J.L. (1999). Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *Neuroscience*, **91**, 1379-1387.
- Ji, L.L. & Leichtweis, S. (1997). Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*, **20**, 91-106.
- Johnson, M., Letter, A.A., Merchant, K., Hanson, G.R. & Gibb, J.W. (1988). Effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine isomers on central serotonergic, dopaminergic and nigral neurotensin systems of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **244**, 977-982.
- Jones, A.L., Jarvie, D.R., McDermid, G. & Proudfoot, A.T. (1994). Hepatocellular damage following amphetamine intoxication. *Clin Toxicol*, **32**, 435-444.
- Jones, A.L. & Simpson, K.J. (1999). Review article: mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications. *Aliment Pharmacol Ther*, **13**, 129-133.
- Kalant, H. & Kalant, O.J. (1975). Death in amphetamine users: causes and rates. *Can. Med. Assoc. J.*, **112**, 299-304.
- Kaplowitz, N., Aw, T.Y. & Ookhtens, M. (1985). The regulation of hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **25**, 715-44.
- Karch, S.B. (1993). The pathology of drug abuse. ed. Karch, S.B. pp. 156-218. Boca Raton: CRC Press.
- Kaul, N., Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Slezak, J. & Singal, P.K. (1993). Free radicals and heart. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **30**, 55-67.
- Kendrick, W.C., Hull, A.R. & Knochel, J.P. (1977). Rhabdomyolysis and shock after intravenous amphetamine administration. *Ann Int Med*, **86**, 381-387.
- Kerr, J.S., Boswell, G.A., Ackerman, N.R. & Stevens, T.M. (1988). Induction of superoxide dismutase activity by paraquat or EDU in human gingival fibroblasts. *Basic Life Sci*, **49**, 695-698.

- Khakoo, S., Coles, C., Armstrong, J. & Barry, R. (1995). Hepatotoxicity and accelerated fibrosis following 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") usage. *J Clin Gastroenterol*, **20**, 244-247.
- Kintz, P. & Samyn, N. (1999). Determination of "ecstasy" components in alternative biological specimens. *J Chromatogr B*, **733**, 137-143.
- Kono, Y. & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem*, **257**, 5751-5754.
- Kovar, K.A. (1998). Chemistry and pharmacology of hallucinogens, entactogens and stimulants. *Pharmacopsychiat*, **31**, 69-72.
- Kretzschmar, M. & Klinger, W. (1990). The hepatic glutathione system - influences of xenobiotics. *Exp Pathol*, **38**, 145-164.
- Krinsky, N.I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *P. S. E. B. M.*, **200**, 248-254.
- Kuczenski, R. & Segal, D.S. (1994). Neurochemistry of amphetamine. In *Amphetamine and its analogs*. ed. Cho, A.K. & Segal, D.S.: Academic Press.
- Kunsman, G.W., Levine, B., Kuhlman, J.J., Jones, R.L., Hughes, R.O., Fujiyama, C.I. & Smith, M.L. (1996). MDA-MDMA concentrations in urine specimens. *Journal of Analytical Toxicology*, **20**, 517-521.
- Lapostolle, F., Eliez, C.A., Massioui, Y.E., Adnet, F., Leclerc, G., Efthymiou, M.L. & Baud, F. (1997). Toxicité de l'ecstasy. *Presse Med*, **26**, 1881-1884.
- Lardinois, O.M., Mestdagh, M.M. & Rouxhet, P.G. (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1295**, 222-238.
- LaVoie, M.J. & Hastings, T.G. (1999). Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci*, **19**, 1484-1491.
- Leeuwenburgh, C. & Ji, L.L. (1996). Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J Nutr*, **126**, 1833-1843.
- Lefkowitz, R., Hoffman, B. & Taylor, P. (1996). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill.

- Leonardi, E.T. & Azmitia, E.C. (1994). MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and MAO type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology*, **10**, 231-238.
- Levine, B.S. (1995). Animal Clinical Pathology. In *CRC Handbook of Toxicology*. ed. Derelanko, M.J. & Hollinger, M.A. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Liester, M.B., Grob, C.S., Bravo, G.L. & Walsh, R.N. (1992). Phenomenology and sequelae of 3,4-methylenedioxymethamphetamine use. *J Nerv Ment Dis*, **180**, 345-352.
- Lim, H.K. & Foltz, R.L. (1998). In vivo and in vitro metabolism of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification of metabolites using an ion trap detector. *Chem Res Toxicol*, **1**, 370-378.
- Lim, H.K., Zeng, S., Chei, D.M. & Foltz, R.L. (1992). Comparative investigation of disposition of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine (MDMA) in the rat and the mouse by a capillary gas chromatography-mass spectrometry assay based on perfluorotributylamine-enhanced ammonia positive ion chemical ionization. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **10**, 657-665.
- Lin (1992). Enzymatic and chemical demethylenation of MDA and MDMA by rat brain microsomes. *Chem Res Toxicol*, **5**, 401-406.
- Lowry, O.H.N., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Lu, D. & Das, D.K. (1993). Induction of differential heat shock gene expression in heart, lung, liver, brain and kidney by a sympathomimetic drug, amphetamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **192**, 808-812.
- Lynskey, M., White, V., Hill, D., Letcher, T. & Hall, W. (1999). Prevalence of illicit drug use among youth: results from the Australian school students' alcohol and drugs survey. *Aust N Z J Public Health*, **23**, 519-524.
- Maker, H.S., Weiss, C., Silides, D.J. & Cohen, G. (1981). Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem*, **36**, 589-593.
- Malberg, J.E., Sabol, K.E. & Seiden, L.S. (1996). Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **278**, 258-267.

- Malberg, J.E. & Seiden, L.S. (1998). 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*, **18**, 5086-5094.
- Malpass, A., White, J.M., Irvine, R.J., Somogyi, A.A. & Bochner, F. (1999). Acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and Dark Agouti rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **64**, 29-34.
- Mascio, P.D., Murphy, M.E. & Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*, **53**, 194S-200S.
- Maurer, H.H., Bickeboeller-Friedrich, J., Kraemer, T. & Peters, F.T. (2000). Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ("ecstasy"). *Toxicology Letters*, **112-113**, 133-142.
- Maxwell, D.L., Polkey, M.I. & Henry, J.A. (1993). Hyponatraemia and catatonic stupor after taking "ecstasy". *Br Med J*, **307**, 1399.
- McCann, U.D. & Ricaurte, G.A. (1991). Major metabolites of ($\pm$)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) do not mediate its toxic effects on brain serotonin neurons. *Brain Research*, **545**, 279-282.
- McCann, U.D. & Ricaurte, G.A. (1992). MDMA ("ecstasy") and panic disorder: induction by a single dose. *Biol Psychiatry*, **32**, 950-953.
- McCann, U.D. & Ricaurte, G.A. (1994 a). Use and abuse of ring-substituted amphetamines. In *Amphetamine and its analogs*. ed. Cho, A.K. & Segal, D.S. pp. 371-385. San Diego: Academic Press.
- McCann, U.D., Ridenour, A., Shaham, Y. & Ricaurte, G.A. (1994 b). Serotonin neurotoxicity after MDMA: a controlled study in humans. *Neuropsychopharmacology*, **10**, 129-138.
- McCann, U.D., Szabo, Z., Scheffel, U., Dannals, R.F. & Ricaurte, G.A. (1998). Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet*, **352**, 1433-37.
- McCarthy, M. & Wilkinson, M.L. (1999). Hepatology. *BMJ*, **318**, 1256-9.
- McElhatton, P.R., Bateman, D.N., Evans, C., Pughe, K.R. & Thomas, S.H. (1999). Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure. *Lancet*, **354**, 1441-1442.
- McKenna, D.J. & Peroutka, S.J. (1990). Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J Neurochem*, **54**, 14-22.

- Meister, A. (1989). On the biochemistry of glutathione. In *Glutathione Centennial. Molecular perspectives and clinical implications*. ed. Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y. & Meister, A. pp. 3-21. San Diego, California: Academic Press.
- Michiels, C. & Remacle, J. (1988). Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. *Eur J Biochem*, **177**, 435-441.
- Milroy, C., Clark, J.C. & Forrest, A.R.W. (1996). Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *Journal of Clinical Pathology*, **49**, 149-153.
- Moeller, M.R., Steinmeyer, S. & Kraemer, T. (1998). Determination of drugs of abuse in blood. *J Chromatogr B*, **713**, 91-109.
- Moldéus, P., Hogberg, J. & Orrenius, S. (1978). Isolation and use of liver cells. *Methods in enzymology*, **52**, 60-71.
- Molliver, M.E., Berger, U.V., Mamounas, L.A., Molliver, D.C., O'Hearn, E. & Wilson, M.A. (1990). Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann N Y Acad Sci*, **600**, 661-664.
- Monks, T.J., Highet, R.J. & Lau, S.S. (1988). 2-Bromo-(diglutathion-S-yl)hydroquinone nephrotoxicity: physiological, biochemical, and electrochemical determinants. *Molecular Pharmacology*, **34**, 492-500.
- Monks, T.J. & Lau, S.S. (1997). Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol*, **10**, 1296-1313.
- Monks, T.J. & Lau, S.S. (1992). Toxicology of quinone-thioethers. *Critical Rev Toxicol*, **22**, 243-270.
- Moore, K.A., Mozayani, A., Fierro, M.F. & Poklis, A. (1996). Distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning. *Forensic Sci Int*, **83**, 111-119.
- Morgan, M.J. (1999). Memory deficits associated with recreational use of "ecstasy" (MDMA). *Psychopharmacology*, **141**, 30-36.
- Morgan, M.J. (1998). Recreational use of "ecstasy" (MDMA) is associated with elevated impulsivity. *Neuropsychopharmacology*, **19**, 252-264.
- Muck-Seler, D., Takahashi, S. & Diksic, M. (1998). The effect of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) on the 5-HT synthesis rate in the rat brain: an autoradiographic study. *Brain Research*, **810**, 76-86.

- Murthy, B.V.S., Wilkes, R.G. & Roberts, N.B. (1997). Creatine kinase isoform changes following ecstasy overdose. *Anaesth Intens Care*, **25**, 156-159.
- Nakagawa, Y. & Moldéus, P. (1992). Cytotoxic effects of phenyl-hydroquinone and some hydroquinones on isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, **44**, 1059-1065.
- Nash, J.F. & Brodtkin, J. (1991). Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, **259**, 820-825.
- Nash, J.F., Meltzer, H.Y. & Gudelsky, G.A. (1990). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem*, **54**, 1062-1067.
- Nash, J.F. & Yamamoto, B.K. (1993). Effect of *d*-amphetamine on the intracellular concentrations of glutamate and dopamine in iprindole-treated rats. *Brain Res.*, **627**, 1-8.
- Navarro, J.F. & Maldonado, E. (1999). Behavioral profile of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in agonistic encounters between male mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat*, **23**, 327-334.
- Nichols, D.E., Hoffman, A.J., Oberlender, R.A., Jacob, P. & Shulgin, A.T. (1986). Derivatives of 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine: representative of a novel therapeutic class. *J Med Chem*, **29**, 2009-2015.
- Nichols, D.E., Lloyd, D.H., Hoffman, A.J., Nichols, M.B. & Yim, G.K.W. (1982). Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [³H] serotonin from rat brain synaptosomes. *J Med Chem*, **25**, 530-535.
- Nichols, D.E. & Oberlender, R. (1990). Structure-activity relationships of MDMA and related compounds: a new class of psychoactive drugs? *Ann N Y Acad Sci*, **600**, 613-623.
- Nichols, D.E. & Oberlender, R. (1989). Structure-activity relationships of MDMA-like substances. *NIDA Res Monogr.*, **94**, 1-29.
- Nishisawa, S., Mzengeza, S. & Diksic, M. (1999). Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on brain serotonin synthesis in the dog studied by positron emission tomography. *Neurochemistry International*, **34**, 33-40.
- O.E.D.T. (1999). Relatório anual sobre a evolução do fenómeno da droga na União Europeia. Lisboa: Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência.

- O'Brien, C.P. (1996). Drug addiction and drug abuse. In *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. ed. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. & Gilman, A.G. pp. 557-577. New York: McGraw-Hill.
- O'Neill, M.E., Arnold, L.F., Coles, D.M. & Nikolic, G. (1983). Acute amphetamine cardiomyopathy in a drug addict. *Clin. Cardiol.*, **6**, 189-191.
- O'Shea, E., Granados, R., Esteban, B., Colado, M.I. & Green, A.R. (1998). 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*, **37**, 919-926.
- Odeh, M. (1991). The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *N Engl J Med*, **324**, 1417-1422.
- O'Hearn, E., Battaglia, G., Souza, E.B.D., Kuhar, M.J. & Molliver, M.E. (1988). Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J. Neurosci.*, **8**, 2788-2803.
- Ommen, B.V., Ploemen, J.H.T.M., Bogaards, J.J.P., Monks, T.J., Gau, S.S. & Bladeren, P.J.V. (1991). Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. *Biochem J*, **276**, 661-666.
- Pacifici, R., Zuccaro, P., Farre, M., Pichini, S., DiCarlo, S., Roset, P.N., Ortuno, J., Segura, J. & R, R.d. (1999). Immunomodulating properties of MDMA alone and in combination with alcohol: a pilot study. *Life Sci*, **65**, 309-316.
- Packe, G., Garton, M.J. & Jennings, K. (1990). Acute myocardial infarction caused by intravenous amphetamine abuse. *Br. Heart. J.*, **64**, 23-24.
- Pallanti, S. & Mazzi, D. (1992). MDMA (ecstasy) precipitation of panic disorder. *Biol Psychiatry*, **32**, 91-95.
- Parker, M.A., Marona-Lewicka, D., Kurrasch, D., Shulgin, A.T. & Nichols, D.E. (1998). Synthesis and pharmacological evaluation of ring-methylated derivatives of 3,4-(methylenedioxy)amphetamine (MDA). *J Med Chem*, **41**, 1001-1005.
- Pentel, P.R., Jentzen, J. & Sievert, J. (1987). Myocardial necrosis due to intraperitoneal administration of phenylpropanolamine in rats. *Fundam Appl Toxicol*, **9**, 167-172.

- Pessayre, D. (1995). Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis. *J Hepatology*, **23**, 16-24.
- Pezzzone, M.A., Rush, K.A., Kusnecov, A.W., Wood, P.G. & Rabin, B.S. (1992). Corticosterone-independent alterations of lymphocyte mitogenic function by amphetamine. *Brain Behav Immun*, **6**, 293-299.
- Plaa, G.L. & Charbonneau, M. (1994). Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and methods of toxicology*. ed. Hayes, A.W. pp. 839-870. New York: Raven Press.
- Pletscher, A., Bartholini, G., Bruderer, H., Burkard, W.P. & Gey, K.F. (1964). Chlorinated arylalkylamines affecting the cerebral metabolism of 5-hydroxytryptamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **145**, 344-350.
- Ploemen, J.H.T.M., Ommen, B.V., Haan, A.D., Schefferlie, J.G. & Bladeren, P.J.V. (1993). In vitro and in vivo reversible and irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase isoenzymes by caffeic acid and its 2-S-glutathionyl conjugate. *Fd Chem Toxic*, **31**, 475-482.
- Poblete, J.C. & Azmitia, E.C. (1995). Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT_{2A} receptor. *Brain Research*, **680**, 9-15.
- Poggetti, R.S., Moore, E.E., Moore, F.A., Koike, K., Tuder, R., Anderson, B.O. & Banerjee, A. (1995). Quantifying oxidative injury in the liver. *Am J Physiol*, **268**, G471-G479.
- Porter, N.A. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*. pp. 273-282: Academic Press.
- Powers, R.H., Stadnicka, A., Kalbfleish, J.H. & Skibba, J.L. (1992). Involvement of xanthine oxidase in oxidative stress and iron release during hyperthermic rat liver perfusion. *Cancer Res*, **52**, 1699-1703.
- Quinlan, T., Spivack, S. & Mossman, B.T. (1994). Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environ Health Perspect*, **102**, 79-87.
- Ramamoorthy, J.D., Ramamoorthy, S., Leibach, F.H. & Ganapathy, V. (1995). Human placental monoamine transporters as targets for amphetamines. *Am J Obstet Gynecol*, **173**, 1782-1787.

- Ramamoorthy, S., Leibach, F.H., Mahesh, V.B. & Ganapathy, V. (1992). Active transport of dopamine in human placental brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol*, **262**, 1189-1196.
- Ramcharan, S., Meenhorst, P., Otten, J., Koks, C., Boer, D.d., Maes, R. & Beijnen, J. (1998). Survival after massive ecstasy overdose. *Clinical Toxicology*, **36**, 727-731.
- Randall, T. (1992). Ecstasy-fueled "rave" parties become dances of death for english. *J Am Med Assoc*, **268**, 1505-1506.
- Reed, D.J. (1998). Evaluation of chemical-induced oxidative stress as a mechanism of hepatocyte death. In *Toxicology of the liver*. ed. Plaa, G.L. & Hewitt, W.R. pp. 187-217: Taylor & Francis.
- Reed, D.J. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Toxicol*, **30**, 603-631.
- Reiter, R.J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, **9**, 526-533.
- Remião, F. (1998). O coração como órgão alvo de toxicidade. Utilização de suspensões de cardiomiócitos isolados de Rato adulto para estudos de cardiotoxicidade. In *Faculdade de Farmácia*. pp. 98. Porto: Universidade do Porto.
- Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F.D. & Bastos, M.L. (1999). Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *J Enzyme Inhibition*, **15**, 47-61.
- Ricaurte, G., McCann, U., Szabo, Z. & Scheffel, U. (2000). Toxicodynamics and long-term toxicity of the recreational drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Toxicology Letters*, **112-113**, 143-146.
- Ricaurte, G.A., Forno, L.S., Wilson, M.A., DeLanney, L.E., Irwin, I., Molliver, M.E. & Langston, J.W. (1988). (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *JAMA*, **260**, 51-55.
- Ricaurte, G.A. & McCann, U.D. (1992). Neurotoxic amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. *Ann NY Acad Sci*, **648**, 371-382.
- Ricaurte, G.A., Sabol, K.E. & Seiden, L.S. (1994). Functional consequences of neurotoxic amphetamine exposure. In *Amphetamine and its analogs*. ed. Cho, A.K. & Segal, D.S. pp. 297-313. San Diego: Academic Press.
- Riordan, S.M. & Williams, R. (1999). Cause and prognosis in acute liver failure. *Liver Transplantation and Surgery*, **5**, 86-89.

- Ritz, J., Schmidt, R.E., Michon, J., Hercend, T. & Schlossman, S.F. (1988). Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol*, **42**, 181-211.
- Rochester, J.A. & Kirchner, J.T. (1999). Ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine): History, Neurochemistry, and Toxicology. *J Am Board Fam Pract*, **12**, 137-142.
- Rohrig, T.P. & Prouty, R.W. (1992). Tissue distribution of methylenedioxymethamphetamine. *Journal of Analytical Toxicology*, **16**, 52-53.
- Roques, V., Perney, P., Beaufort, P., Hanslik, B., Ramos, J., Durand, L., Bricquir, Y.L. & Blanc, F. (1998). Hépatite aigue à l'ecstasy. *Presse Med*, **27**, 468-470.
- Rudnick, G. & Wall, S.C. (1992). The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 1817-1821.
- Rupp, H., Dhalla, K.S. & Dhalla, N.S. (1994). Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *J Cardiovasc Pharmacol*, **24**, S16-S24.
- Sabol, K.E., Lew, R., Richards, J.B., Vosmer, G.L. & Seiden, L.S. (1996). 3,4-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*, **276**, 846-854.
- Sadeghipour, F. & Veuthey, J.-L. (1998). Automated on-line dialysis and liquid chromatography of methylenedioxyated amphetamines in plasma and serum samples. *J Pharm Biomed Anal*, **17**, 801-810.
- Schardein, J.L. (1980). *Drugs as teratogens*. Florida: CRC Press.
- Schechter, M.D. (1988). Serotonergic-dopaminergic mediation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy"). *Pharmacol Biochem Behav*, **31**, 817-824.
- Scheffel, U., Lever, J.R., Stathis, M. & Ricaurte, G.A. (1992). Repeated administration of MDMA causes transient down-regulation of serotonin 5-HT₂ receptors. *Neuropharmacology*, **31**, 881-893.
- Schifano, F. (1991). Chronic atypical psychosis associated with MDMA ("ecstasy") abuse. *Lancet*, **338**, 1335.

- Schifano, F., Furla, L.D., Forza, G., Minicuci, N. & Bricolo, R. (1998). MDMA ("ecstasy") consumption in the context of polydrug abuse: a report on 150 patients. *Drug and Alcohol Dependence*, **52**, 85-90.
- Schmidt, C.J. (1994). Neurochemistry of ring-substituted amphetamine analogs. In *Amphetamine and its analogs*. ed. Cho, A.K. & Segal, D.S. pp. 151-175. San Diego: Academic Press.
- Schmidt, C.J. (1987). Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, **240**, 1-7.
- Schmidt, C.J., Abbate, G.M., Black, C.K. & Taylor, V.L. (1990). Selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in Rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **255**, 478-483.
- Schmidt, C.J., Taylor, V.L., Abbate, G.M. & Nieduzak, T.R. (1991). 5-HT₂ antagonists stereoselectively prevent the neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine by blocking the acute stimulation of dopamine synthesis: reversal by L-dopa. *J Pharmacol Exp Ther*, **256**, 230-235.
- Schwartz, R.H. & Miller, N.S. (1997). MDMA (ecstasy) and the rave: a review. *Pediatrics*, **100**, 705-708.
- Sciuto, A.M. (1997). Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection. In *Oxidants, antioxidants and free radicals*. ed. Baskin, S.I. & Salem, H. London: Taylor & Francis.
- Screaton, G.R., Cairns, H.S., Sarnes, M., Singer, M., Thrasher, A. & Cohen, S.L. (1992). Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after MDMA ("ecstasy") abuse. *Lancet*, **339**, 677-678.
- Segal, D.S. & Kuczenski, R. (1994). Behavioral pharmacology of amphetamine. In *Amphetamine and its analogs*. ed. Cho, A.K. & Segal, D.S. pp. 115-150. San Diego: Academic Press.
- Seiden, L.S., Sabol, K.E. & Ricaurte, G.A. (1993). Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **32**, 639-677.
- Selim, K. & Kaplowitz, N. (1999). Hepatotoxicity of psychotropic drugs. *Hepatology*, **29**, 1347-1351.
- Series, H., Boeles, S., Dorkins, E. & Peveler, R. (1994). Psychiatric complications of "ecstasy" use. *J Psychopharmacol*, **8**, 60-61.

- Shankaran, M. & Gudelsky, G.A. (1998). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on hippocampal dopamine and serotonin. *Pharmacol Biochem Behav*, **61**, 361-366.
- Shankaran, M., Yamamoto, B.K. & Gudelsky, G.A. (1999). Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *European Journal of Pharmacology*, **385**, 103-110.
- Shankaran, M., Yamamoto, B.K. & Gudelsky, G.A. (1999). Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum. *J Neurochem*, **72**, 2516-2522.
- Shen, X.-M., Zhang, F. & Dryhurst, G. (1997). Oxidation of dopamine in the presence of cysteine: characterization of new toxic products. *Chem Res Toxicol*, **10**, 147-155.
- Shields, R.O. (1990). Amphetamines. In *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. ed. Haddad, L.M. & Winchester, J.F. pp. 771-780. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Shiyyama, S., Soejima-Ohkuma, T., Honda, S., Kumagai, Y., Cho, A.K., Yamada, H., Oguri, K. & Yoshimura, H. (1997). Major role of the CYP2C isozymes in deamination of amphetamine and benzphetamine: evidence for the quinidine-specific inhibition of the reactions catalysed by rabbit enzyme. *Xenobiotica*, **27**, 379-387.
- Sies, H., Akerboom, T. & Ishikawa, T. (1989). Glutathione conjugates: transport from the cell and intracellular effects. In *Glutathione Centennial*: Academic Press.
- Simpson, D.L. & Rumack, B.H. (1981). Methylenedioxyamphetamine. Clinical description of overdose, death, and review of pharmacology. *Arch Intern Med*, **141**, 1507-1509.
- Sinet, P.M. & Garber, P. (1981). Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to O_2^- and H_2O_2 . *Arch Biochem Biophys*, **212**, 411-416.
- Sinet, P.M., Heikkila, R.E. & Cohen, G. (1980). Hydrogen peroxide production by rat brain *in vivo*. *J Neurochem*, **34**, 1421-1428.
- Skibba, J.L., Powers, R.H., Stadnicka, A., Cullinane, D.W., Almagro, U.A. & Kalbfleisch, J.H. (1991). Oxidative stress as a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. *Int J Hyperthermia*, **7**, 749-761.

- Skibba, J.L., Stadnicka, A., Kalbfleisch, J.H. & Powers, R.H. (1989). Effects of hyperthermia on xanthine oxidase activity and glutathione levels in the perfused rat liver. *J Biochem Toxicol*, **4**, 119-125.
- Smith, H.J., Roche, A.H.G., Jagusch, M.F. & Herdson, P.B. (1976). Cardiomyopathy associated with amphetamine administration. *Am. Heart J.*, **91**, 792-797.
- Somani, S.M., Husain, K. & Schlorff, E.C. (1997). Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In *Oxidants, antioxidants and free radicals*. ed. Baskin, S.I. & Salem, H. pp. 125-141. London: Taylor & Francis.
- Sonsalla, P.K., Riordan, D.E. & Heikkila, R.E. (1991). Competitive and noncompetitive antagonists at N-methyl-D-aspartate receptors protect against methamphetamine-induced dopaminergic damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **256**, 506-512.
- Sprague, J.E., Everman, S.L. & Nichols, D.E. (1998). An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology*, **19**, 427-442.
- Sprague, J.E., Huang, X., Kanthasamy, A. & Nichols, D.E. (1994). Attenuation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity with serotonin precursors tryptophan and 5-hydroxytryptophan. *Life Sciences*, **55**, 1193-1198.
- Sprague, J.E. & Nichols, D.E. (1995). Inhibition of MAO-B protects against MDMA-induced neurotoxicity in the striatum. *Psychopharmacology*, **118**, 357-359.
- St.Omer, V., Ali, S., Holson, R., Duhart, H., Scalzo, F. & Slikker, W.J. (1991). Behavioral and neurochemical effects of prenatal methylenedioxymethamphetamine (MDMA) exposure in rats. *Neurobehav Toxicol Teratol*, **13**, 13-20.
- Stephans, S.E. & Yamamoto, B.K. (1994). Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse*, **17**, 203-209.
- Steranka, L.R. & Sanders-Bush, E. (1980). Long-term effects of continuous exposure to amphetamine on brain dopamine concentration and synaptosomal uptake in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **65**, 439-443.
- Stewart, J.L. & Meeker, J.E. (1997). Fetal and infant deaths associated with maternal methamphetamine abuse. *J Anal Toxicol*, **21**, 515-517.
- Stone, D.M., Johnson, M., Hanson, G.R. & Gibb, J.W. (1988). Role of endogenous dopamine in the central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, **247**, 79-87.

- Sturgill, M.G. & Lambert, G.H. (1997). Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical Chemistry*, **43**, 1512-1526.
- Suarez, R. & Riemersma, R. (1988). "Ecstasy" and sudden cardiac death. *Am J Forensic Med Pathol*, **9**, 339-341.
- Tate, S.S. (1980). Enzymes of mercapturic acid formation. In *Enzymatic basis of detoxification*. ed. Jakoby, W.B. pp. 95-120. Orlando, Florida: Academic Press.
- Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K. & Shiozaki, H. (1977). Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr*, **107**, 51-60.
- Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A. & Sakamoto, Y. (1974). Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem (Tokyo)*, **75**, 93-103.
- Taylor, W.M., Reinhart, P.H. & Bygrave, F.L. (1983). Stimulation by α -adrenergic agonists of Ca^{2+} fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem J*, **212**, 555-565.
- Terada, Y., Shinohara, S., Matui, N. & Ida, T. (1988). Amphetamine-induced myoglobinuric acute renal failure. *Jpn J Med*, **27**, 305-308.
- Terland, O., Flatmark, T., Tangeras, A. & Gronberg, M. (1997). Dopamine oxidation generates an oxidative stress mediated by dopamine semiquinone and unrelated to reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol*, **29**, 1731-1738.
- Terrence, J.C. & Lau, S.S. (1992). Toxicology of quinone-thioethers. *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**, 243-240.
- Tse, D.C., McCreery, R.L. & Adams, R.N. (1976). Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J Med Chem*, **19**, 37-40.
- Tseng, L., Menon, M.K. & Loh, H.H. (1976). Comparative actions of monomethoxyamphetamines on the release and uptake of biogenic amines in brain tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **197**, 263-271.
- Tucker, G. (1996). Adam and Eve make Love. Analysis of the enantiomers of 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDE, "Eve") and its metabolite 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in rat brain. *Hum Exp Toxicol*, **15**, 455-457.
- Tucker, G.T., Lennard, M.S., Ellis, S.W., Woods, H.F., Cho, A.K., Lin, L.Y., Hiratsuka, A., Schmitz, D.A. & Chu, T.Y.Y. (1994). The demethylation of

- methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem Pharmacol*, **47**, 1151-1156.
- Varela-Rey, M., Montiel-Duarte, C., Beitia, G., Cenarruzabeitia, E. & Iraburu, M.J. (1999). 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") stimulates the expression of $\alpha 1$ (I) procollagen mRNA in hepatic stellate cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **259**, 678-682.
- Velea, D., Hautefeuille, M., Vazeille, G. & Lantran-Davoux, C. (1999). Nouvelles drogues synthétiques empaçoogènes. *L'Encéphale*, **25**, 508-514.
- Verebey, K., Alrazi, J. & Jaffe, J.H. (1988). The complications of "ecstasy" (MDMA). *JAMA*, **259**, 1649-1650.
- Vollenweider, F.X., Gamma, A., Liechti, M. & Huber, T. (1998). Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naive healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*, **19**, 241-251.
- Walder, P. & Amendt, G. (1999). *Ecstasy & C.^a*. Porto: Campo das Letras.
- Walubo, A. & Seger, D. (1999). Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "ecstasy": case report and review of the literature. *Hum Exp Toxicol*, **18**, 119-125.
- Weinmann, W. & Bohnert, M. (1998). Lethal monointoxication by overdose of MDEA. *Forensic Science International*, **91**, 91-101.
- Weissman, A.D. & Caldecott-Hazard, S. (1995). Developmental neurotoxicity to methamphetamines. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.*, **22**, 372-374.
- Welling, T.H., Williams, D.M. & Stanley, J.C. (1998). Excessive oral amphetamine use as a possible cause of renal and splanchnic arterial aneurysms: a report of two cases. *J Vasc Surg*, **28**, 727-731.
- White, J.M., Bochner, F. & Irvine, R.J. (1997). The agony of "ecstasy". *MJA*, **166**, 117-118.
- White, S.R., Obradovic, T., Imel, K.M. & Wheaton, M.J. (1996). The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, **49**, 455-479.

- Williams, A. & Unwin, R. (1997). Prolonged elevation of serum creatinine kinase (CK) without renal failure after ingestion of ecstasy. *Nephrol Dial Transplant*, **12**, 361-362.
- Williamson, S., Gossop, M., Powis, B., Griffiths, P., Fountain, J. & Strang, J. (1997). Adverse effects of stimulant drugs in a community of drug users. *Drug Alcohol Depend.*, **44**, 87-94.
- Wills, E.J., Findlay, J.M. & McManus, J.P.A. (1976). Effects of hyperthermia therapy on the liver. *J Clin Path*, **29**, 1-10.
- Winstock, A.R. & King, L.A. (1996). Tablets often contain substances in addition to, or instead of, ecstasy. *BMJ*, **313**, 423-424.
- Woods, J.D. & Henry, J.A. (1992). Hyperpyrexia induced by 3,4-methylenedioxymphetamine ("Eve"). *Lancet*, **340**, 305.
- Wu, D., Otton, S.V., Inaba, T., Kalow, W. & Sellers, E.M. (1997). Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochemical Pharmacology*, **53**, 1605-1612.
- Yamamoto, B.K., Nash, J.F. & Gudelsky, G.A. (1995). Modulation of methylenedioxymphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J Pharmacol Exp Ther*, **273**, 1063-1070.
- Yamamoto, B.K. & Zhu, W. (1998). The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*, **287**, 107-114.
- Yau, J.L.W., Noble, J. & Seckl, J.R. (1997). Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following 3,4-methylenedioxymphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neuroscience*, **78**, 111-121.
- Yen, D.J., Wang, S.J., Ju, T.H., Chen, C.C., Liao, K.K., Fuh, J.L. & Hu, H.H. (1994). Stroke associated with methamphetamine inhalation. *Eur. Neurol.*, **34**, 16-22.
- Zalis, E.G., Lundberg, G.D. & Knutson, R.A. (1967). The pathophysiology of acute amphetamine poisoning with pathologic correlation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **158**, 115-127.

