Helena Maria Ferreira da Costa Ferreira Carmo

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO NA TOXICIDADE DE DERIVADOS ANFETAMÍNICOS: 4-MTA, 2C-B E MDMA

Porto 2007

U.PORTO
FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Helena Maria Ferreira da Costa Ferreira Carmo

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO NA TOXICIDADE DE DERIVADOS ANFETAMÍNICOS: 4-MTA, 2C-B E MDMA

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Toxicologia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Orientador: Professora Catedrática Doutora Maria de Lourdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos

Co-orientadores: *Doutor Douwe de Boer*

Professor Catedrático Doutor Lesseps José António Lourenço dos Reys

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 09/09/2008
Reg. 6196
Cota

FFD
CAR
6196 ex.2

U.PORTO
FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

2007

Ao João

À Leonor

Os estudos apresentados nesta dissertação foram realizados no Laboratório associado REQUIMTE/Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Parte do trabalho experimental foi conduzida no Laboratório de Análises de Dopagem do Instituto do Desporto de Portugal, no Instituto de Toxicologia da Universidade de Mainz na Alemanha, e no Centro de Toxicologia da Universidade de Leipzig na Alemanha.

Estes estudos contaram com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através da atribuição de uma Bolsa de Doutoramento (PRAXIS XXI/BD/20088/99), do Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional (FEDER) (POCI/SAU-FCF/57187/2004) e do Fundo Social Europeu (FSE) no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio. Os trabalhos realizados em Leipzig contaram ainda com o apoio financeiro das Acções Integradas Luso-Alemãs (Ref A-5/04).

Fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados:

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

I. Carmo H, de Boer D, Remião F, Carvalho F, dos Reys LA, and Bastos ML (2002) Identification of 4-Methylthioamphetamine and Some of its Metabolites in Mice Urine by GC-MS, after Acute Administration. J Anal Toxicol, 26(4): 228-232.

II. Carmo H, de Boer D, Remião F, Carvalho F, dos Reys LA, and Bastos ML (2004) Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 811(2):143-152.

III. Carmo H, Hengstler JG, de Boer D, Ringel M, Carvalho F, Fernandes E, Remiao F, dos Reys LA, Oesch F, Bastos ML (2004) Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 369(2):198-205.

IV. Carmo H, Hengstler JG, de Boer D, Ringel M, Remião F, Carvalho F, Fernandes E, dos Reys LA, Oesch F, and Bastos ML (2005) Hepatic metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) constructed by analysis with hepatocytes of six species including human. Toxicology, 206(1):75-89.

V. Carmo H, Brulport M, Hermes M, Oesch F, Silva R, Ferreira LM, Branco PS, de Boer D, Remiao F, Carvalho F, Schon MR, Krebsfaenger N, Doehmer J, Bastos ML, Hengstler JG (2006) Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity. Pharmacogenet Genomics, 16(11):789-799

VI. Carmo H, Brulport M, Hermes M, Oesch F, de Boer D, Remiao F, Carvalho F, Schon MR, Krebsfaenger N, Doehmer J, Bastos ML, Hengstler JG (2006) CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA). Toxicology, doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

Comunicações em actas de encontros científicos com arbitragem científica

1. Carmo H, Remião F, Carvalho F, Fernandes E, de Boer D, dos Reys LA, Hengstler JG, Oesch F, and Bastos ML (2002) The metabolism of 4-methylthioamphetamine in mice. *In vivo* and *in vitro* studies. *Toxicology Letters*, 135 (suppl. 1):59.

2. Carmo H, Hengstler JG, de Boer D, Ringel M, Remião F, Carvalho F, Fernandes E, dos Reys LA, Oesch F, and Bastos ML (2003) Comparative hepatic metabolism studies of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in six species including human using cryopreserved hepatocytes. *Toxicology Letters*, 44 (Suppl. 1):150.

3. Carmo H, de Boer D, Remião F, Carvalho F, dos Reys LA, and Bastos ML (2004) Metabolic pathways on the designer drug of abuse 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197 (3):310.

4. Bastos ML, Carmo H, Hengstler JG, de Boer D, Ringel M, Carvalho F, Fernandes E, Remião F, dos Reys LA, and Oesch F (2004) Metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA) by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse: a comparative study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197 (3):310.

5. Carmo H, Brulport M, Hermes M, Oesch F, Silva R, Ferreira LM, Branco PS, Boer D, Remiao F, Carvalho F, Schon MR, Krebsfaenger N, Doehmer J, Bastos ML, Hengstler JG (2006) Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 164 (Suppl. 1):295-296.

AGRADECIMENTOS

Tendo terminado este trabalho, porque, na verdade, os agradecimentos se escrevem no final, sinto que é da mais elementar justiça, deixar aqui uma palavra de gratidão, a todos quantos para ele contribuíram e sem os quais a sua realização teria sido impossível. Inspirada pelas célebres palavras de Winston Churchill: "Isto não é o fim. Não é sequer o princípio do fim. Mas é, talvez, o fim do princípio." não posso deixar de pensar, que de certa forma, se adequam a um trabalho de doutoramento que termina. Não se tratando de uma guerra, é certo, travamos muitas vezes batalhas contra o insucesso e a frustração das incontáveis horas de trabalho laboratorial, e festejamos também os sucessos, como se de verdadeiras vitórias se tratassem. Pude, ao longo deste percurso, contar com os mais valiosos dos Aliados. Por tudo quanto com eles aprendi, por toda a ajuda que sempre tive quando mais precisei, pelo incansável apoio e estímulo, a minha gratidão vai muito para além do que as palavras podem expressar. Na esperança de poder um dia retribuir o quanto por mim têm feito, gostaria de agradecer:

À Professora Catedrática Doutora Maria de Lourdes Bastos, pela orientação desta dissertação e de todo o meu trabalho científico e docente e, sobretudo, pelo exemplo de sabedoria, rigor, conhecimento científico e generosidade, que tanto têm contribuído para o enriquecimento da minha vida. À amizade com que me distingue procurarei sempre retribuir, com dedicação e lealdade.

To Doctor Douwe de Boer for the co-supervision of this thesis and for creating all the necessary conditions for the analytical part of these studies to be performed. His guidance in this work was valuable and working under his supervision in the Doping Control Lab provided a unique experience. From him I learned some of the most valuable lessons in science and for his support I am deeply grateful.

Aos Professores Doutor Félix Dias Carvalho e Doutor Fernando Remião, pelo constante incentivo, incansável apoio, orientação do trabalho e, sobretudo, pela sua amizade e infindável paciência. São para mim verdadeiras referências no que respeita à ciência e à docência. A amizade que sempre demonstraram é sinceramente retribuída.

À Engenheira Maria Elisa Soares, pelo seu incansável apoio que tanto me ajudou a superar as adversidades e pelos momentos de alegria tantas vezes partilhados. Retribuo com sinceridade a amizade com que me distingue.

To Professor Jan Georg Hengstler for his cooperation and support that were crucial for these studies. I would also like to express my gratitude to the members of the Toxicology Institute at the University of Mainz, and of the Centre for Toxicology at the University of Leipzig, especially to Marc Brulport and Matthias Hermes. For their kindness, their teaching, and all the help they promptly gave me I am deeply grateful.

Ao Doutor Luís Horta, na qualidade de Director do Laboratório de Análises e Dopagem do Instituto do Desporto de Portugal, e a todos os membros que integram este Laboratório, pelo seu extraordinário acolhimento e por todo o apoio e ajuda prestados, que foram essenciais para o desempenho da parte analítica desta dissertação. Fica a minha particular gratidão, por tudo quanto pude aprender e pela gratificante experiência que foi o trabalho e o convívio com todos.

À Professora Doutora Eduarda Fernandes pela sua amizade, incentivo e apoio. Gostaria de agradecer em particular o seu importante contributo para este trabalho ao sintetizar a 4-MTA.

À Professora Doutora Márcia Carvalho agradeço o companheirismo e os momentos de alegria partilhados ao longo dos anos de trabalho conjunto no laboratório. A sua tese de doutoramento e os seus trabalhos foram uma fonte de inspiração e continuidade dos estudos apresentados nesta dissertação.

Aos mais jovens elementos do Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Helena, Vera, Carla, João e Ricardo, pela alegria e entusiasmo com que contagiam o ambiente de trabalho no nosso laboratório. Gostava ainda de deixar uma palavra de particular gratidão à Renata, porque pela sua dedicação ao trabalho laboratorial contribuiu directamente para a realização do trabalho experimental e porque, por amizade, muito me ajudou no penoso trabalho de formatação e edição desta dissertação.

Às técnicas Júlia Caramez e Graziela Fernandes, pelo apoio, disponibilidade e pela amizade demonstrados ao longo destes anos

Pelo apoio de todos os amigos que me têm acompanhado ao longo deste percurso sou particularmente grata. Pela sua responsabilidade no despertar do meu entusiasmo pela ciência e pelo companheirismo e amizade que perduram para além dos tempos de estudante gostaria de agradecer em particular à Nina, Xana, Cláudia, Raquel e Maria João.

À minha família gostaria de agradecer o apoio incondicional que sempre tive, particularmente da minha irmã Ana Cristina, da Ana Maria e do Francisco. Aos meus pais, serei eternamente grata por me terem sempre ajudado a ultrapassar as dificuldades e por estarem sempre ao meu lado em todas as fases da minha vida. Ao João e à minha filha Leonor agradeço os sacrifícios a que os obriguei para que fosse possível realizar este trabalho e dedico-lhes esta dissertação.

ÍNDICE

ÍNDICE GERAL

RESUMO xv
ABSTRACT xxi
ABREVIATURAS xxvii
PARTE I – ENQUADRAMENTO E INTRODUÇÃO 1
1. ENQUADRAMENTO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO 3
2. INTRODUÇÃO 7
2.1. 4-Metiltioanfetamina (4-MTA) 7
2.1.1. Descrição da 4-metiltioanfetamina (4-MTA) 7
2.1.1.1. Características físico-químicas 7
2.1.1.2. Formas de apresentação e composição 9
2.1.2. Farmacocinética 9
2.1.3. Efeitos biológicos e toxicológicos 13
2.1.4. Efeitos tóxicos em humanos 18
2.1.5. Dependência 20
2.1.5.1. Efeitos psicológicos 22
2.1.5.2. Efeitos comportamentais 22
2.1.5.3. Conhecimento e percepção da 4-MTA entre os seus utilizadores .. 23
2.1.5.4. Disponibilidade e qualidade 24
2.1.5.5. Prevalência e padrão de uso 24
2.1.5.6. Características e comportamento dos consumidores 25
2.1.5.7. Indicadores de consequências para a saúde 25
2.1.5.8. Contexto do uso 25
2.2. 4-Bromo-2,5-Dimetoxifeniletilamina (2C-B) 27
2.2.1. Descrição da 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B) 27
2.2.1.1. Características Físico-Químicas 27
2.2.1.2. Formas de apresentação e composição 29
2.2.1.3. Relação estrutura-actividade 29
2.2.2. Farmacocinética 30
2.2.3. Mecanismos de acção e efeitos biológicos 33
2.2.4. Efeitos tóxicos 34
2.2.5. Dependência 34
2.2.5.1. Efeitos psicológicos 35

2.2.5.2. Prevalência e padrão de uso 35
2.2.5.3. Contexto do uso 35
2.3. 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA) 37
2.3.1. Descrição da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA 38
2.3.1.1. Características físico-químicas 38
2.3.1.2. Relação estrutura-actividade 39
2.3.1.3. Formas de apresentação e composição 40
2.3.2. Farmacocinética 41
2.3.2.1. Absorção 41
2.3.2.2. Distribuição 46
2.3.2.3. Metabolismo 49
2.3.2.4. Excreção 56
2.3.3. Mecanismos de acção e efeitos biológicos 57
2.3.3.1. Efeitos na libertação, transporte e receptores das monoaminas neurotransmissoras 57
2.3.3.2. Efeito inibidor da enzima monoamina oxidase (MAO) 61
2.3.3.3. Efeito inibidor da enzima triptofano hidroxilase 61
2.3.3.4. Efeito na expressão genética 61
2.3.3.5. Efeito neuroendócrino 62
2.3.3.6. Efeito no sistema termorregulador 63
2.3.3.7. Efeito no fluxo sanguíneo e actividade cerebral 64
2.3.4. Efeitos tóxicos 64
2.3.4.1. Efeitos tóxicos agudos 66
2.3.4.2. Efeitos tóxicos a longo prazo 69
2.3.4.3. Interacções medicamentosas 72
2.3.4.4. Mecanismos de toxicidade 74
2.3.4.4.1. Toxicidade hepática 74
2.3.4.4.1.1. Acção das catecolaminas endógenas 75
2.3.4.4.1.2. Bioactivação metabólica da MDMA 80
2.3.4.4.1.3. Hipertermia 82
2.3.4.4.1.4. Indução da apoptose 82
2.3.4.4.2. Neurotoxicidade 83
2.3.4.4.2.1. Formação de um metabolito tóxico da dopamina 85
2.3.4.4.2.2. Formação de metabolitos tóxicos da MDMA 86

2.3.4.4.2.3. Influência da serotonina e dos seus metabolitos 88
2.3.4.4.2.4. Influência da temperatura 90
2.3.4.4.2.5. Influência do glutamato e do monóxido de azoto 90
2.3.4.4.3. Toxicidade para o sistema cardiovascular 92
2.3.4.4.3.1. Hipóxia e alterações hemodinâmicas 93
2.3.4.4.3.2. Efeitos metabólicos 93
2.3.4.4.3.3. Alterações electrolíticas e sobrecarga do cálcio intracelular 94
2.3.4.4.3.4. Fenómenos de stress oxidativo 94
2.3.4.4.3.5. Efeito directo da MDMA e dos seus metabolitos 95
2.3.4.4.3.6. Outros efeitos 96
2.3.4.4.4. Rabdomiólise 96
2.3.4.4.5. Toxicidade renal 98
2.3.4.4.6. Hipertermia 101
2.3.4.4.7. Hiponatrémia 104
2.3.4.4.8. Teratogenia 105
2.3.4.4.9. Imunotoxicidade 105
2.3.5. Dependência 107
2.3.5.1. Efeitos psicológicos 108
2.3.5.2. Efeitos comportamentais 109
2.3.5.3. Disponibilidade e qualidade 111
2.3.5.4. Prevalência e padrão de uso 112
2.3.5.5. Características e comportamento dos consumidores 115
2.3.5.6. Indicadores de consequências para a saúde 115
2.3.5.7. Contexto do uso 116
2.4. Polimorfismo genético no metabolismo e expressão de toxicidade das anfetaminas 117
2.4.1. Polimorfismo genético no genoma humano 117
2.4.2. Diferenças interindividuais na ocorrência de reacções adversas 120
2.4.3. Polimorfismos genéticos em proteínas potencialmente intervenientes na toxicidade das anfetaminas 121
2.4.3.1. Polimorfismo genético do metabolismo 121
2.4.3.1.1. Citocromo P450 123
2.4.3.1.1.1. CYP1A2 127

2.4.3.1.1.2. CYP2B6 128
2.4.3.1.1.3. CYP2D6 129
2.4.3.1.1.3.1. Influência do polimorfismo da CYP2D6 na farmacocinética da MDMA 131
2.4.3.1.1.4. CYP3A4 133
2.4.3.1.2. Catecol-O-metiltransferase 134
2.4.3.1.3. UDP-glucuroniltransferase 136
2.4.3.1.4. Sulfotransferase 136
2.4.3.2. Polimorfismo genético dos alvos de acção farmacológica e toxicológica 137
2.4.3.2.1. Receptor da serotonina 137
2.4.3.2.2. Receptor da dopamina 137
2.4.3.2.3. Tranportador da serotonina 138
2.4.3.2.4. Outros alvos da acção toxicológica das anfetaminas 140

PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL 141

3. OBJECTIVOS 143

4. METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS TRABALHOS EXPERIMENTAIS 145

4.1. Caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B in vivo e in vitro por GC/MS 145

4.2. Utilização de hepatócitos criopreservados para a caracterização do perfil metabólico e da citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B in vitro 150

4.3. Utilização do ensaio da eficácia de crescimento de colónias celulares para a avaliação da influência do polimorfismo da enzima CYP2D6 na citotoxicidade da MDMA e da 4-MTA 155

4.4. Caracterização analítica da 4-MTA, da MDMA, e dos possíveis metabolitos nos estudos de metabolismo realizados com as células V79 158

5. TRABALHO EXPERIMENTAL 159

5.1. Trabalho I - Identification of 4-Methylthioamphetamine and Some of its Metabolites in Mice Urine by GC-MS after Acute Administration **161**

5.2. Trabalho II - Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration **169**

5.3. Trabalho III - Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse **181**

5.4. Trabalho IV - Hepatic metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) constructed by analysis with hepatocytes of six species including human **191**

5.5. Trabalho V - Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity **209**

5.6. Trabalho VI - CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA) **223**

PARTE III – DISCUSSÃO GERAL E REFERÊNCIAS **235**

6. DISCUSSÃO GERAL **237**

6.1. Interesse da avaliação do perfil metabólico de novos derivados anfetamínicos **237**

6.2. Caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B in vivo usando o ratinho como modelo animal **238**

6.3. Avaliação do perfil metabólico de novos derivados anfetamínicos in vitro em hepatócitos isolados de diferentes espécies animais **248**

6.4. Caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B *in vitro* usando hepatócitos criopreservados humanos e de cinco diferentes espécies animais. **249**

6.5. Caracterização da citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B em hepatócitos criopreservados humanos e de cinco espécies animais diferentes **255**

6.6. Caracterização da influência do polimorfismo da enzima CYP2D6 na citotoxicidade da MDMA e da 4-MTA **261**

7. CONCLUSÕES **287**

8. REFERÊNCIAS **291**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da 4-metiltioanfetamina 8

Figura 2. Vias metabólicas propostas para a 4-MTA em humanos de acordo com os resultados do estudo de Ewald e colaboradores (Ewald *et al.* 2005). I, β-hidroxilação da cadeia lateral; II, hidroxilação aromática; III, desaminação oxidativa seguida de redução (IIIa) ou oxidação (IIIb) 12

Figura 3. Estrutura química da 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B) e dos compostos aparentados mescalina, 4-metil-2,5-dimetoxianfetamina (DOM) e 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB) 28

Figura 4. Vias metabólicas de Fase I propostas para a 2C-B *in vivo* no rato e no Homem (de Boer *et al.* 1999c; Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003). As estruturas delineadas por tracejado correspondem a prováveis intermediários que não foram identificados nos estudos. I, 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacetaldeído; II, 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-etanol; III, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético; IV, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico; V, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina; VI, 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxi-feniletilamina; VII, 1-acetoamino-2-(2-metoxi-4-bromo-5-hidroxifenil)-etano ou 5-O-desmetil-N-acetil-2C-B; VIII, 1-acetoamino-2-(2-hidroxi-4-bromo-5-metoxifenil)-etano ou 2-O-desmetil-N-acetil-2C-B. 32

Figura 5. Estrutura química do enantiómero farmacologicamente mais activo da 3,4-metilenodioximetanfetamina, S-(+)-MDMA 38

Figura 6. Esquema das vias metabólicas da MDMA. I, N-desmetilação; II, desmetilenação; III, desaminação oxidativa; IV, O-metilação; V, conjugação com a glicina; MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDA, 3,4-metilenodioxianfetamina; N-Me-α-MeDA ou HHMA, N-metil-α-metildopamina ou dihidroximetanfetamina; α-MeDA, α-metildopamina; HMMA, hidroximetoximetanfetamina; HMA, hidroximetoxianfetamina; PIPAC, piperonilacetona; MDHA, ácido 3,4-metilenodioxihipúrico; DHPA, 3,4-diidroxifenilacetona; DHHA, ácido 3,4-diidroxihipúrico; HMPA, 4-hidroxi-3-metoxifenilacetona; HMHA, ácido 4-hidroxi-3-metoxihipúrico 51

Figura 7. Mecanismo da acção biológica da MDMA ao nível dos neurónios serotonérgicos. A MDMA promove a libertação da serotonina por permuta ao nível do transportador (SERT) (1). Para concentrações mais elevadas a MDMA penetra nas vesículas sinápticas e promove o efluxo de serotonina (2). O aumento da serotonina deve-se também à inibição da degradação metabólica do neurotransmissor pela MAO ao nível da mitocôndria (3). I, inibição da biossíntese da serotonina; II, armazenamento da serotonina nas vesículas; III, estimulação da libertação da serotonina na fenda sináptica; IV, estimulação dos receptores pós-sinápticos; V, inibição do sistema de captação neuronal da serotonina; VI, auto-regulação da libertação da serotonina pelos receptores pré-sinápticos; VII, metabolismo da serotonina; VIII, aumento da formação de metabolitos e produtos de auto-oxidação da serotonina. As setas duplas indicam um efeito de estimulação enquanto as setas cortadas indicam um efeito de inibição. 58

Figura 8. Esquema do metabolismo das catecolaminas e do seu processo de auto-oxidação..... 77

Figura 9. Reactividade dos produtos de oxidação das catecolaminas com grupos nucleófilos endógenos. 80

Figura 10. Representação esquemática dos mecanismos propostos para a rabdomiólise e lesão renal induzidas pela MDMA. Adaptado de (Carvalho 2004)..... 98

Figura 11. Metabolismo do conjugado da N-metil-α-metildopamina com a GSH. 100

Figura 12. Principais tipos de polimorfismos no DNA humano. (a) Polimorfismos num único nucleótido, (b) pequenas sequências nucleotídicas de repetição que ocorrem em série (STR) ou microssatélites e (c) sequências nucleotídicas de número variável de repetição que ocorrem em série (VTNR) ou minissatélites. Adaptado de (Passarge 2001)..... 118

Figura 13. Tipos de mutação que envolvem um único nucleótido. (A) Sequência não mutada (wild type), (B) substituição, (C) deleção e (D) inserção de nucleótido. Adaptado de (Passarge 2001). 119

Figura 14. Mecanismos de reconhecimento de xenobióticos para a regulação das enzimas do citocromo P450 e outras enzimas metabólicas. O aumento da concentração de xenobiótico é reconhecido por receptores citosólicos (AHR, PXR e CAR), que vão

por sua vez activar receptores nucleares para que se dê um aumento da expressão das enzimas metabólicas. Adicionalmente, estas vias podem ser activadas por receptores membranares através de vias de transdução do sinal que resultam na posterior activação dos receptores citosólicos. Adaptado de (Ingelman-Sundberg 2004a)..... 125

Figura 15. Principais mecanismos moleculares responsáveis por alterações no metabolismo humano e respectivos exemplos de variantes alélicas comuns de enzimas do citocromo P450. Os polimorfismos genéticos que causam a ausência de enzima ou a expressão de uma enzima inactiva incluem deleções no gene e vários tipos de mutação (codões stop prematuros, mutações nos locais de processamento). Os polimorfismos que causam trocas de aminoácidos podem originar proteínas instáveis ou alterações no local activo da enzima que alteram a especificidade de substrato. A duplicação ou a multiplicação de genes pode aumentar os níveis de mRNA e da enzima resultando no aumento do metabolismo. Adaptado de (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999)..... 126

Figura 16. Vias metabólicas identificadas *in vivo* no ratinho (Trabalho I) para a 4-MTA e comparação com os estudos efectuados no Homem (Ewald *et al.* 2005). Os metabolitos delineados a traço cheio e com sombra correspondem aos identificados também na urina de ratinho. I, β-hidroxilação; II, hidroxilação aromática ou da cadeia lateral do grupo tiol; III, desaminação oxidativa com formação do composto cetónico que por redução origina um álcool secundário (IIIa) e/ou por oxidação um ácido carboxílico (IIIb)..... 239

Figura 17. Vias metabólicas propostas para a 2C-B *in vivo* no ratinho (Trabalho II) e comparação com os estudos efectuados no rato e no Homem (de Boer *et al.* 1999c; Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003). As estruturas delineadas por tracejado correspondem a prováveis intermediários que não foram identificados nos estudos. Indicam-se para os diferentes metabolitos as espécies onde foi identificada a sua presença. I, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina; II, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacetaldeído; III, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletanol; IV, ácido 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacético; V, 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacetaldeído; VI, 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-etanol; VII, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético; VIII, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenacetúrico; IX, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico; X, β-hidroxi-2C-B; XI, 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxi-feniletilamina; XII, 1-acetoamino-2-(2-metoxi-4-bromo-5-hidroxifenil)-etano ou 5-O-desmetil-N-acetil-2C-B; XIII, 1-

acetoamino-2-(2-hidroxi-4-bromo-5-metoxifenil)-etano ou 2-O-desmetil-N-acetil-2C-B. 240

Figura 18. Vias metabólicas documentadas para a *d*-anfetamina (Fase I) [A; adaptado de (Caldwell 1980)] e para a mescalina [B; adaptado de (Kapadia e Fayez 1970)] no Homem e em diferentes espécies animais. 244

Figura 19. Vias metabólicas identificadas *in vitro* para a 4-MTA nos hepatócitos (Trabalho III) e comparação com os estudos *in vivo* efectuados no Homem (Ewald *et al.* 2005) e no ratinho. Delimitados por parêntesis rectos indicam-se os metabolitos identificados também *in vivo* no ratinho. Indicam-se igualmente as espécies onde foi identificado o ácido 4-metiltiobenzóico, o único metabolito produzido pelos hepatócitos *in vitro*. 251

Figura 20. Vias metabólicas propostas para a 2C-B *in vitro* nos hepatócitos (Trabalho IV) e comparação com um estudo em hepatócitos de rato (Kanamori *et al.* 2005). As estruturas delimitadas a tracejado correspondem a intermediários que não foram identificados nos estudos. Indicam-se para os diferentes metabolitos as espécies onde foi identificada a sua presença. Os metabolitos encontrados no estudo de Kanamori e colaboradores encontram-se assinalados com *. I, 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacetaldeído; II, 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-etanol; III, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético; IV, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina; V, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacetaldeído; VI, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletanol; VII, ácido 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacético; VIII, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico; IX, 4-bromo-2,5-dimetoxifenol; X, 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxi-feniletilamina; XI, 1-acetoamino-2-(2-metoxi-4-bromo-5-hidroxifenil)-etano ou 5-O-desmetil-N-acetil-2C-B; XII, 1-acetoamino-2-(2-hidroxi-4-bromo-5-metoxifenil)-etano ou 2-O-desmetil-N-acetil-2C-B. 252

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Intoxicações relacionadas com a ingestão de 4-MTA 20

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos da MDMA em humanos após administração de dose única 43

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos da MDMA e metabolitos em voluntários humanos após administração de doses repetidas 45

Tabela 4. Concentrações de MDMA encontradas no sangue e em vários tecidos determinadas após autópsia em intoxicações fatais 47

Tabela 5. Concentrações de MDMA encontradas no sangue em estudos clínicos e intoxicações fatais e não fatais 48

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos dos metabolitos da MDMA após administração em humanos 54

Tabela 7. Resumo do perfil metabólico da *d*-anfetamina e análogos em diferentes espécies animais e no Homem 249

Resumo

RESUMO

As drogas de síntese do tipo das anfetaminas têm suscitado preocupação pelo crescente número de relatos de intoxicações severas e fatais e pela possibilidade de ocorrência de efeitos neurotóxicos a longo prazo associados ao seu consumo. A mais mediática destas drogas é a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), vulgarmente designada por *ecstasy*, podendo esta designação abranger outras drogas estruturalmente e/ou farmacologicamente aparentadas. Os derivados anfetamínicos que surgem no mercado ilícito das drogas de abuso são consumidos sem qualquer avaliação de risco. Apesar do abuso destas drogas não constituir um risco generalizado para a população de consumidores, uma vez que o número de intoxicações severas e fatais é pequeno relativamente ao vasto universo de utilizadores, a variabilidade registada na ocorrência destas intoxicações faz prever a existência de indivíduos particularmente susceptíveis e predispostos à sua toxicidade. Por outro lado, a ineficácia muitas vezes registada no tratamento das intoxicações tem sido atribuída ao desconhecimento dos mecanismos de toxicidade subjacentes. Quando se iniciaram os trabalhos experimentais conducentes à presente dissertação, dois novos derivados anfetamínicos tinham adquirido recentemente notoriedade entre os consumidores deste tipo de drogas, a 4-metiltioanfetamina (4-MTA) e a 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B). O seu potencial de toxicidade levou a que o seu uso e tráfico tenham sido rapidamente impedidos. Para a caracterização toxicológica destes compostos é fundamental o conhecimento do seu metabolismo. A potencial formação de metabolitos activos e/ou tóxicos pode ter graves consequências na expressão de toxicidade e nos resultados de estudos toxicológicos clínicos e forenses. Deste modo, foram objectivos desta dissertação: (i) estabelecer uma possível relação entre o perfil metabólico destas drogas e a sua acção toxicológica e (ii) avaliar a influência da biotransformação na variabilidade interindividual observada na susceptibilidade aos efeitos tóxicos, nomeadamente no que respeita à influência do polimorfismo genético do metabolismo humano. Foram, para este efeito, inicialmente realizados trabalhos experimentais para a caracterização do perfil metabólico *in vivo* da 4-MTA e da 2C-B, usando o ratinho como modelo animal e recorrendo a metodologias de GC/MS para a identificação dos metabolitos. Observou-se que, no ratinho, a 4-MTA é pouco metabolizada *in vivo*, enquanto a 2C-B é excretada após extensa biotransformação. As vias metabólicas identificadas nestes estudos são semelhantes às descritas para a *d*-anfetamina e seus

análogos e incluem a desaminação oxidativa e a hidroxilação alifática para a 4-MTA e, adicionalmente, a O-desmetilação e conjugação com a glicina para a 2C-B. Por comparação com os dados disponíveis na literatura sobre a metabolização *in vivo* destas drogas em humanos, o ratinho, como modelo animal, aproxima-se qualitativamente do humano em termos de perfil metabólico. Seguidamente, procedeu-se à caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B *in vitro*, usando hepatócitos criopreservados humanos e de cinco diferentes espécies animais (macaco, cão, coelho, rato e ratinho). Observou-se que as diferenças inter-espécies no metabolismo da 4-MTA e da 2C-B em hepatócitos isolados são diminutas. As vias metabólicas identificadas para a 4-MTA e para a 2C-B *in vitro* são semelhantes às observadas *in vivo*, pelo que o modelo *in vitro* utilizado nestes estudos permite prever o metabolismo *in vivo*. Estes estudos permitiram caracterizar a citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B através da quantificação do conteúdo intracelular de ATP. Verificou-se que a 4-MTA e a 2C-B são citotóxicas no modelo dos hepatócitos isolados, em todas as espécies avaliadas, sendo a sua citotoxicidade superior à documentada para os análogos *d*-anfetamina e MDMA. As diferenças inter-espécies na citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B em hepatócitos isolados são moderadas. Pelo contrário, as diferenças na citotoxicidade observadas entre hepatócitos provenientes de diferentes dadores humanos permitem antecipar uma variabilidade interindividual na susceptibilidade aos efeitos tóxicos. Os estudos subsequentes destinaram-se à avaliação da influência da variabilidade genética do metabolismo catalizado pela enzima polimórfica CYP2D6 na expressão da citotoxicidade da 4-MTA e da MDMA, através do modelo das células V79 geneticamente modificadas para a expressão de diferentes variantes desta enzima. Observou-se que a expressão polimórfica da enzima CYP2D6 influencia a citotoxicidade da 4-MTA e da MDMA, avaliada pelo ensaio da formação de colónias celulares. Neste modelo, a expressão da enzima CYP2D6 *wild type*, metabolicamente mais activa relativamente às variantes mutadas, resultou na potenciação da citotoxicidade destas drogas. Um metabolito envolvido no efeito citotóxico observado com a MDMA foi identificado, a N-metil-α-metildopamina. Este composto apresenta uma citotoxicidade muito superior à da MDMA nas mesmas condições experimentais, o que permite antecipar que os indivíduos que possuem um fenótipo de metabolizador ultra-rápido para a CYP2D6 podem apresentar uma maior susceptibilidade aos efeitos citotóxicos da MDMA.

Em síntese, a 4-MTA e a 2C-B apresentam no seu perfil de biotransformação semelhanças ao dos seus análogos anfetamínicos. A citotoxicidade destas duas drogas

parece ser, no entanto, superior à dos compostos análogos. A grande variabilidade na susceptibilidade dos humanos aos efeitos tóxicos das anfetaminas continua uma questão em aberto. No entanto, os estudos da presente dissertação permitiram pela primeira vez estabelecer, para a MDMA e para a 4-MTA, uma relação causal entre as alterações farmacocinéticas determinadas pelo polimorfismo do metabolismo humano catalizado pela CYP2D6 e as respectivas consequências toxicológicas, o que permite propor uma explicação para as acentuadas diferenças interindividuais na ocorrência de intoxicações com estas drogas de abuso.

Abstract

ABSTRACT

The amphetamine-like drugs have raised concern due to the increasing number of severe and fatal intoxications reports, and also due to the possibility of long-term development of neurotoxic effects, that have been associated with their abuse. The most popular of these drugs is undoubtedly 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), commonly known as ecstasy, although this designation can be attributed to other drugs that are structurally and/or pharmacologically related. The amphetamine derivatives that appear in the illicit drug market are consumed without any prior risk evaluation. Although the abuse of these drugs does not imply a generalized risk for their consumers, given that the number of severe and fatal intoxications is relatively low when the vast universe of users is considered, the variability in the susceptibility to these intoxications makes it likely that some individuals are particularly susceptible and predisposed to the toxicity of these drugs. On the other hand, the difficulties that are often reported in the treatment of these intoxications have been attributed to the lack of knowledge on the underlying mechanisms of toxicity. When the experimental work of the present thesis was started, two new amphetamine derivatives had recently become popular among ecstasy users: 4-methylthioamphetamine (4-MTA) and 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B). Their toxic potential led to the prompt control of their use and traffic. Knowledge on the metabolism of these drugs is crucial for their toxicological characterization. The potential formation of active and/or toxic metabolites may have serious implications in their toxic effects and in the results of clinical and forensic toxicological studies. Therefore, the aims of the present thesis were: (i) to establish a possible relationship between the metabolic profile of these drugs and their toxicological action and (ii) to evaluate the influence of biotransformation in the interindividual variability in the susceptibility to their toxicity, namely in what concerns the influence of polymorphic human metabolism. To this purpose experimental work aimed at the *in vivo* characterization of the metabolic profile of 4-MTA and 2C-B was initially conducted using the mouse as the animal model and GC/MS methods for the identification of the metabolites. It was observed that 4-MTA was poorly metabolized *in vivo* while 2C-B was excreted after extensive biotransformation. The metabolic pathways identified in the present studies are similar to those described for *d*-amphetamine and related compounds and include oxidative deamination and alifatic hydroxylation for 4-MTA, and additionally O-demethylation

and conjugation with glycine for 2C-B. Comparing these results with data available on the literature on the human metabolism of these two drugs it can be concluded that from a qualitative perspective the mouse animal model strongly resembles the human in terms of metabolic profile. Subsequently, the metabolic profile of 4-MTA and 2C-B was evaluated *in vitro* using human cryopreserved and freshly isolated hepatocytes and also cryopreserved hepatocytes from five different animal species (monkey, dog, rabbit, rat and mouse). There were only minor interspecies differences in the metabolism of 4-MTA and 2C-B in the isolated hepatocytes. The metabolic pathways identified *in vitro* for 4-MTA and for 2C-B are similar to those observed *in vivo* and therefore it can be assumed that this *in vitro* model is suitable for the prediction of *in vivo* metabolism. These studies further allowed the evaluation of the cytotoxicity of 4-MTA and 2C-B through the quantification of the ATP intracellular content. It was observed that both drugs are cytotoxic to the hepatocytes of all the tested species, and that their cytotoxicity is higher than what has been reported for the related compounds *d*-amphetamine and MDMA. The interspecies differences in the cytotoxicity of 4-MTA and 2C-B in isolated hepatocytes are moderate. In contrast, the observed differences in cytotoxicity between the hepatocytes from the different human donors anticipate that there is an interindividual variability in the susceptibility to their toxic effects. The subsequent studies aimed at evaluating the influence of genetic variability in metabolism catalyzed by the polymorphic CYP2D6 enzyme in the cytotoxicity of 4-MTA and MDMA, by using the V79 cells genetically modified to express different CYP2D6 enzyme variants. It was observed that the polymorphic expression of this enzyme influenced the cytotoxicity of 4-MTA and MDMA, as evaluated by the colony formation assay. In the V79 cell model, the expression of the wild type CYP2D6, which has greater enzyme activity than the mutant variants, greatly increased the cytotoxicity of these drugs. One metabolite involved in the cytotoxic effect of MDMA was identified as N-methyl-α-methyldopamine. The cytotoxicity of this compound is much higher than that of MDMA under the same experimental conditions which anticipates that individuals of the ultra-rapid phenotype for CYP2D6 may have increased susceptibility towards the cytotoxic effects of MDMA.

In conclusion, the drugs 4-MTA and 2C-B present a similar metabolic pattern to that of other amphetamine-related compounds. However, the cytotoxicity of these two drugs seems to be greater than that of other analogous compounds. The great variability in human susceptibility to the toxic effects of the amphetamines remains an open issue.

However, the studies here presented allowed us to establish for the first time, for 4-MTA and MDMA, a causal relationship between the pharmacokinetic changes determined by the polymorphism of human CYP2D6 and their toxicological consequences which allows to propose an explanation for the great interindividual differences in the susceptibility towards the intoxications with these drugs of abuse.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ACTH; hormona adrenocorticotrófica (*adrenocorticotrophic hormone*)

ADH; hormona antidiurética (vasopressina)

ADP; adenosina 5'-difosfato

AhR; receptor dos arilhidrocarbonetos (*aryl hydrocarbon receptor*)

AMPc; monofosfato de adenosina cíclico

ATP; adenosina 5'-trifosfato

BHE; barreira hemato-encefálica

BDMPEA; 4-bromo-2,5-dimetoxi-beta-feniletilamina

CAR; receptor constitutivo dos androstanos (*constitutive androstane receptor*)

2C-B; 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina

CD4+; linfócitos T *helper*

CID; coagulação intravascular disseminada

CK; creatina fosfocinase

COMT; catecol-*o*-metiltransferase

CRL; hormona de libertação de corticotropina

2C-T-2; 4-etiltio-2,5-dimetoxifeniletilamina

2C-T-7; 4-propiltio-2,5-dimetoxifeniletilamina

CYP; citocromo P450

DAT; transportador da dopamina

DL_{50}; dose letal 50

DMSO; dimetilsulfóxido

DNA; ácido desoxirribonucleico

DOB; 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina

DOM; 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)-2-aminopropano

EGTA; ácido etileno-glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético

EPA; *Environmental Protection Agency*;

EUA; Estados Unidos da América

GABA; ácido γ-aminobutírico

GC/MS; cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa

GOT; transaminase glutâmica-oxaloacética

GPX; glutationa peroxidase

GR; glutationa redutase

GSH; glutationa reduzida

GST; glutationa-S-transferase

γ-GT; γ-glutamiltranspeptidase

5-HIAA; ácido 5-hidroxiindoleacético

H_2O_2; peróxido de hidrogénio

HPLC; cromatografia líquida de alta resolução

HPLC/UV; cromatografia líquida de alta resolução com detecção por espectrofotometria de ultra-violeta

Hsp; proteínas de choque térmico

5-HT; 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5HTT; transportador da serotonina

5HTTLPR; região polimórfica do gene do transportador da serotonina (*5HTT gene-linked polymorphic region)*

IL; interleucina (citocina)

IV; infra-vermelhos

K_i; constante de inibição

K_m; constante de Michaelis-Menten

LAD; Laboratório de Análises e Dopagem

LC/MS; cromatografia líquida acoplada ao detector de massa

LD; desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*)

L-NAME; éster metílico N^G-nitro-L-arginina

LSD; dietilamina do ácido lisérgico

MAO; monoamina oxidase

MBDB; N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina

MBTFA; N-metil-bis-trifluoroacetamida

MDA; metilenodioxianfetamina

MDEA; metilenodioxietilanfetamina

MDMA; 3,4-metilenodioximetanfetamina

ME; metabolizador extensivo

α-MeDA; α-metildopamina

MI; metabolizador intermédio

MMAI; 5-metoxi-6-metil-2-aminoindano

MP; metabolizador pobre

mRNA; RNA mensageiro

MSTFA; N-metil-(N-trimetilsilil)trifluoroacetamida

4-MTA; 4-metiltioanfetamina

NADH; nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida

NADPH; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida

NH_2; grupo amina

NK; células *natural killer*

NMDA; N-metil-D-aspartato

N-Me-α-MeDA; N-metil-α-metildopamina

NO; monóxido de azoto

NOS; sintetase do monóxido de azoto

NPD; detector de azoto/fósforo (*nitrogen-phosphorus detector*)

$O_2^{\cdot-}$; radical superóxido

OCDE; Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico;

OH; grupo hidroxilo

$OH^{\cdot}$; radical hidroxilo

$ONOO^-$; anião peroxinitrito

PAPS; adenosina 3'-fosfato 5'-fosfossulfato

PARP; poli-ADP-ribose-polimerase

PET; tomografia de emissão de positrões

PKC; proteína cínase C

PMMA; N-metil-1-(4-metoxifenil)-2-aminopropano (*p*-metoximetanfetamina)

p-MTA; *p*-metiltioanfetamina

PTC; células tubulares proximais renais

PXR; receptor do pregnano X (*prenane X receptor*)

REDOX; oxidação-redução

RMN; ressonância magnética nuclear

RNS; espécies reactivas de azoto

ROS; espécies reactivas de oxigénio

S9; fracções microssomais pós mitocondriais

SERT; transportador pré-sináptico da serotonina

SH; grupo tiol

SIADH; síndrome da secreção inapropriada de hormona antidiurética

SIM; método da selecção de iões (*selected ion mode*)

S-MTC; S-metil-L-tiocitrulina

SNP; polimorfismos num único nucleótido

SOD; superóxido dismutase

SPE, *solid phase extraction*

SPECT; tomografia de emissão de fotão único

SSRIs; inibidores selectivos da recaptação da serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors*)

SULT; sulfotransferases

TFA; trifluoroacilo

TFAA; anidrido trifluoroacético

TGF-β_1; *transforming growth factor-*β_1

TMS; trimetilsilil

TMSC; trimetilclorosilano

TNF-α_1; factor de necrose tumoral α_1

UCP; proteína dissociadora mitocondrial

UGT; UDP-glucuronosiltransferases

UM; metabolizador ultra-rápido

UPLC; cromatografia líquida de ultra resolução

UV; ultra-violeta

V_{max}; velocidade máxima da reacção

PARTE I

Enquadramento e Introdução

1. ENQUADRAMENTO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O uso de drogas de síntese do tipo das anfetaminas tornou-se alvo da atenção da comunidade científica, dos meios de comunicação social, e da sociedade em geral, no final da década de 1980. Estas drogas, também designadas por drogas de desenho ou *designer drugs*, têm a propriedade de facilitar o relacionamento social. A busca de empatia traduz a crescente falta de comunicação e proximidade que caracterizam os relacionamentos pessoais e profissionais na nossa sociedade. A imagem do "bem-estar químico" tornou-se um estereótipo de uma sociedade cuja vitalidade e valores se encontram em declínio e que sobrevaloriza o desempenho individual (Velea *et al.* 1999). Os jovens são as principais vítimas deste fenómeno, para o qual muito contribuem factores de ordem económica e social.

O uso destas drogas tem sido designado de recreativo uma vez que o seu consumo está associado ao divertimento nocturno e durante o fim-de-semana, especialmente em festas de música denominadas *rave*. Dentro deste tipo de drogas, a mais mediática é indubitavelmente a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), vulgarmente designada por *ecstasy*. No entanto, esta designação abrange muitas vezes outras drogas que podem corresponder a qualquer outro análogo, estruturalmente e/ou farmacologicamente aparentado, e que são consumidas para o mesmo fim.

A principal característica associada ao consumo destas drogas é o não reconhecimento do perigo que estas representam, sendo por vezes consideradas "drogas que não são drogas". No entanto, estas constituem um perigo real (com reacções adversas severas e fatais bem documentadas), que é reforçado pela facilidade com que são adquiridas e mesmo sintetizadas. Os processos de síntese destes compostos são, na sua maioria, simples e facilmente acedidos através de consulta na *Internet*.

A análise qualitativa dos comprimidos apreendidos revela que apenas uma parte corresponde a anfetaminas. A maior parte apresenta na sua composição compostos usados como excipientes (açúcares e poliálcoois) e fármacos e/ou drogas, estimulantes ou não (por exemplo, cafeína, testosterona, efedrina, LSD, cloroquina, paracetamol e vasodilatadores) (Giroud *et al.* 1997). A análise quantitativa revela também uma enorme disparidade na quantidade de substância activa por comprimido (Giroud *et al.* 1997).

Para além do crescente número de relatos de intoxicações severas e fatais associadas ao consumo deste tipo de drogas, os resultados de diversas investigações

forenses em amostras de sangue colhidas a indivíduos que se suspeitava estarem a conduzir sob o efeito de substâncias psicotrópicas, revelaram com grande frequência a presença de concentrações plasmáticas significativas destes estimulantes (Giroud *et al.* 1997; Jones 2005; Jones e Holmgren 2005). Estes estudos apontam para que um número significativo de acidentes de viação possa ser causado por indivíduos intoxicados com anfetaminas (Jones 2005; Jones e Holmgren 2005).

Num estudo retrospectivo conduzido no Departamento de Medicina Legal do distrito de Ghent na Bélgica, publicado em 2006, foram analisadas todas as fatalidades relacionadas com o consumo de anfetaminas entre 1976 e 2004 (de Letter *et al.* 2006). Os autores concluíram que a maior parte das vítimas eram do sexo masculino e com idade inferior a 25 anos. As mortes resultaram, na sua maior parte, de intoxicações não intencionais, mas também de suicídio, acidente de viação e actos criminosos. Estes autores verificaram ainda que as concentrações plasmáticas das diversas anfetaminas variavam muito. A causa de morte mais frequentemente associada a estas intoxicações foi a falha do sistema cardiopulmonar, seguido de traumatismos, asfixia e hipertermia. Os autores concluíram ainda que, apesar do número de intoxicações envolvendo o consumo de anfetaminas representar apenas uma pequena fracção de todos os casos analisados no seu departamento, o número de casos registados tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos (de Letter *et al.* 2006).

Ao contrário do que acontece com os fármacos que são exaustivamente estudados em ensaios clínicos, particularmente no que respeita à caracterização da sua farmacocinética, as anfetaminas são consumidas sem qualquer tipo de avaliação de risco. Por exemplo, o conhecimento do metabolismo, que é um pré-requisito para qualquer procedimento de despiste toxicológico e de avaliação de risco, é na maior parte das vezes inexistente para os novos derivados anfetamínicos que surgem no mercado ilícito das drogas de abuso. Esta informação é particularmente valiosa, uma vez que alterações na formação de metabolitos activos e/ou tóxicos, ou a existência de potencial para o desenvolvimento de interacções medicamentosas, podem ter graves consequências na expressão e interpretação dos resultados analíticos provenientes dos estudos de toxicologia clínica e forense, e até mesmo no controlo de dopagem destas substâncias.

Quando se iniciaram os trabalhos experimentais conducentes à presente dissertação, dois novos derivados anfetamínicos tinham adquirido recentemente notoriedade entre os consumidores deste tipo de drogas de abuso, a 4-

metiltioanfetamina (4-MTA) e a 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B). Muito pouco se sabia acerca da sua acção farmacológica e toxicológica, mas o seu potencial de toxicidade despertou a preocupação das entidades reguladoras ao nível internacional, tendo o seu uso e tráfico sido impedido pouco tempo após a sua introdução. Não obstante a sua curta popularidade, o conhecimento da farmacocinética e a caracterização toxicológica destes compostos assume uma elevada importância dado que, para contornar as medidas legais tomadas no sentido de controlar os compostos recentemente colocados à disposição no mercado de drogas ilícitas, são rapidamente introduzidos novos análogos estruturalmente aparentados mas ainda não legislados. Por outro lado, é dever da comunidade científica alertar para os riscos do consumo de drogas que são genericamente consideradas como "drogas seguras". Tendo em vista o consumo generalizado destas drogas, não é de facto legítimo concluir que estas constituem um risco generalizado para a população de consumidores uma vez que o número de intoxicações severas e fatais ocorridas é pequeno relativamente ao vasto universo de utilizadores. No entanto, a enorme variabilidade registada na ocorrência destas intoxicações faz prever a existência de indivíduos particularmente susceptíveis e predispostos à ocorrência de toxicidade. O conhecimento da toxicidade destes compostos e a identificação dos potenciais factores de susceptibilidade passam pela sua caracterização toxicológica e farmacocinética. Só com base neste conhecimento podem ser estabelecidas bases científicas fundamentadas para a divulgação aos potenciais consumidores destas drogas e também para o estabelecimento de estratégias adequadas para o tratamento destas intoxicações.

Os trabalhos experimentais realizados no âmbito desta dissertação tiveram por objectivo caracterizar a biotransformação dos dois novos derivados anfetamínicos, 4-MTA e 2C-B, e estabelecer uma possível relação entre o perfil metabólico destas drogas e a sua acção toxicológica. A influência da bioactivação metabólica das anfetaminas na variabilidade interindividual observada na susceptibilidade aos seus efeitos tóxicos foi subsequentemente estudada com as drogas 4-MTA e MDMA.

A presente dissertação encontra-se dividida em três partes. A primeira parte consiste numa introdução à dissertação em que é feita uma revisão da informação disponível na literatura científica acerca da farmacologia e toxicologia das três drogas de abuso estudadas, a 4-MTA, a 2C-B, e a MDMA, bem como da influência da variabilidade genética na susceptibilidade à ocorrência de reacções adversas aos xenobióticos, com particular ênfase no que respeita às anfetaminas. Na segunda parte,

dedicada ao trabalho experimental, são apresentados os objectivos dos trabalhos experimentais e as metodologias utilizadas na realização dos mesmos. Os resultados obtidos são posteriormente apresentados na forma das publicações que originaram. Apresentam-se nesta forma a descrição detalhada dos protocolos experimentais, os resultados obtidos e o respectivo tratamento estatístico, bem como a discussão dos resultados no âmbito de cada trabalho. Por fim, a terceira parte consiste na discussão geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos experimentais, sendo também apresentadas as conclusões finais desta dissertação e as referências bibliográficas consultadas.

2. INTRODUÇÃO

2.1. 4-Metiltioanfetamina (4-MTA)

No dia 13 de Setembro de 1999, o Concelho de Ministros da União Europeia (Ministros da Justiça e da Administração Interna) adoptou a decisão que definia a 4-metiltioanfetamina (4-MTA) como uma nova droga de síntese à qual deveriam ser aplicadas medidas de controlo e sanções criminais pelos Estados-membros, ao abrigo do previsto na Convenção de 1971 das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas (European Communities 1999). Esta decisão resultou da preocupação suscitada, até aquela data, pelo número dramático de intoxicações fatais e não fatais que ocorreram na Bélgica, na Holanda e no Reino Unido, no espaço de apenas nove meses. Em 2001, o Comité para a Dependência de Drogas da Organização Mundial de Saúde elaborou um relatório (32º relatório) com a recomendação de que a 4-MTA fosse colocada na tabela I da Convenção de 1971, o que corresponde à classificação desta droga como uma substância que não apresenta reconhecida utilidade terapêutica e cujo potencial de abuso constitui um sério risco para a saúde pública (WHO 2001).

Numa primeira abordagem, a designação de nova droga de síntese parece pouco adequada para uma molécula que foi sintetizada em 1963 como um potencial agente anoréctico (Holland *et al.* 1963). Em 1992, Nichols e colaboradores sintetizaram novamente esta molécula, no Departamento de Farmacologia e Toxicologia e no Departamento de Química Medicinal e Farmacognosia da Universidade de Purdue, no Estado de Indiana, nos Estados Unidos da América (EUA), desta vez com vista à obtenção de novas moléculas farmacologicamente activas no tratamento da depressão (Huang *et al.* 1992). Só mais tarde a 4-MTA surgiria como uma droga de abuso.

2.1.1. Descrição da 4-metiltioanfetamina (4-MTA)

2.1.1.1. Características físico-químicas

A 4-metiltioanfetamina (Figura 1) (CAS 14116-06-4) é quimicamente uma tioariletilamina estruturalmente aparentada com a *d*-anfetamina e com a *p*-

metoxianfetamina e farmacologicamente semelhante à 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA). É também conhecida como *p*-metiltioanfetamina (*p*-MTA), 1-(4-metiltiofenil)-2-aminopropano, α-metil-4-metiltiofeniletilamina e vulgarmente designada pela abreviatura 4-MTA. Esta molécula tem o peso molecular de 181,3 unidades de massa atómica, apresenta um centro quiral, e pode existir na forma de dois enantiómeros distintos e de racemato. Os relatos da sua síntese referem somente a síntese da mistura racémica dos enantiómeros da 4-MTA. Os compostos percursores da síntese incluem o ácido 4-metiltiofenilacético e o 4-metiltiobenzaldeído. Outros reagentes empregues na síntese da 4-MTA são o nitroetano, a N-butilamina, 1-(4-metiltiofenil)-2-nitropropeno, aluminohidreto de lítio, metanol e ácido clorídrico. O processo de síntese usado pelo Professor David Nichols foi descrito por Poortman, em 1998, que sintetizou a 4-MTA na forma de base e na forma de cloridrato (Poortman 1998; Poortman e Lock 1999).

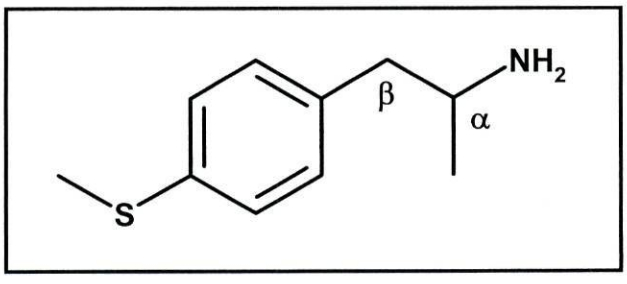


Figura 1. Estrutura química da 4-metiltioanfetamina

A 4-MTA pode ser identificada pelo desenvolvimento de cor azul com o reagente de tiocianato de cobalto, cor púrpura com uma solução de iodoplatina acidificada (Poortman e Lock 1999), e não apresenta cor com o reagente de Marquis (Groombridge 1998; Poortman e Lock 1999). O espectro da 4-MTA no ultra-violeta (UV) apresenta um máximo de absorvância a 255 nm (Poortman e Lock 1999). Outros métodos de identificação e quantificação descritos incluem, imunoensaios (de Boer *et al.* 1999a; Elliott 2000; Kavanagh *et al.* 1999), cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC/MS) (de Boer *et al.* 1999a; Ewald *et al.* 2005; Groombridge 1998; Kavanagh *et al.* 1999; Peters *et al.* 2003; Poortman 1998; Poortman e Lock 1999), ou por detector de azoto/fósforo (NPD; *nitrogen-phosphorus detector*) (Elliott 2000), ressonância magnética nuclear (RMN) (de Boer *et al.* 1999a; Groombridge 1998; Poortman e Lock 1999), espectrometria de UV (Poortman e Lock 1999), espectrometria de infra-vermelhos (IV) (Poortman 1998; Poortman e Lock 1999), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção por UV (Elliott

2000; Soares *et al.* 2004) e mais recentemente por cromatografia líquida de ultra resolução (UPLC) acoplada a dois detectores de massa dispostos em série (*tandem mass spectrometry*; MS/MS) (Apollonio *et al.* 2006).

2.1.1.2. Formas de apresentação e composição

A 4-MTA é comercializada sob a forma de comprimidos destinados a ingestão oral. Os nomes sob os quais é comercializada no mercado de drogas ilícitas são: *flatliners*, *S-5, Golden Eagle, "The one and only dominator"* e *MK*, sendo esta droga associada a um composto do tipo da *ecstasy* (designação comum da droga de abuso MDMA que é também utilizada para designar outros compostos química e/ou farmacologicamente aparentados e consumidos para os mesmos fins).

Tem-se verificado que os comprimidos apreendidos em diferentes circunstâncias contêm diferentes dosagens de 4-MTA, tendo sido encontradas quantidades entre 20 mg e 140 mg de 4-MTA por comprimido (EMCDDA 1999; Poortman 1998; Poortman e Lock 1999). Outros compostos presentes nos comprimidos incluem, lactose (Poortman e Lock 1999), álcool 4-metiltiobenzílico (Kirkbride *et al.* 2001), ácido palmítico (EMCDDA 1999), ácido esteárico (EMCDDA 1999), 4-metiltiobenzaldeído (Kirkbride *et al.* 2001), 4-metiltiofenil-2-nitropropanona (Kirkbride *et al.* 2001), 1-(4-metiltiofenil)propeno ou 1-(4-metiltiofenil)-2-propeno (de Letter *et al.* 2001), cafeína (de Boer *et al.* 1999a; Groombridge 1998; Poortman 1998) e polietilenoglicol (Groombridge 1998). Durante o processo de síntese da 4-MTA pode também resultar a formação de derivados nitrogenados que são potencialmente tóxicos (EMCDDA 1999).

2.1.2. Farmacocinética

O perfil farmacocinético da 4-MTA foi avaliado no cão, num único animal, após administração aguda de uma dose de 0,8 mg/kg (inferior à dose de cerca de 2 mg/kg que se supõe ser normalmente ingerida em humanos) (Kavanagh *et al.* 1999). A quantificação da 4-MTA na urina em três diferentes tempos de amostragem permitiu

concluir que a maior parte do composto administrado foi eliminado sem biotransformação (Kavanagh *et al.* 1999). A análise conduzida por GC/MS permitiu antecipar a presença de metabolitos que não foram, no entanto, identificados neste estudo.

Num caso de intoxicação fatal com 4-MTA em que foi analisada uma amostra de sangue, foi detectada uma concentração de 1,5 mg/L desta droga, tendo sido também encontrada uma igual concentração sanguínea de *d*-anfetamina (Poortman 1998; Poortman e Lock 1999). O relato de uma intoxicação fatal ocorrida na Bélgica indicou as concentrações de 4-MTA no sangue (5,36 mg/L), urina (95,5 mg/L) e no fígado (30,8 mg/kg) determinadas posteriormente à autópsia que foi realizada dois dias após a morte (de Letter *et al.* 2001). Neste caso foi efectuado um estudo pormenorizado da distribuição da 4-MTA em variadas amostras analisadas após autópsia (Decaestecker *et al.* 2001). Os autores concluíram que a 4-MTA sofria fenómenos de redistribuição *post-mortem* resultando em concentrações no sangue cardíaco aumentadas devido à difusão da droga por via vascular a partir do fígado e dos pulmões. A 4-MTA apresentou um elevado grau de concentração no fígado e na bile (36,4 mg/L) que faz prever uma significativa excreção por via biliar. A concentração de 4-MTA nas várias regiões cerebrais analisadas (entre 31,7 e 36,5 mg/kg) era também muito elevada comparativamente às concentrações detectadas no sangue (Decaestecker *et al.* 2001).

Num outro caso de intoxicação fatal em que foi identificada unicamente a 4-MTA, foram detectadas as concentrações de 4,6 mg/L no sangue femoral e de 87,2 mg/L na urina (análise *post-mortem* realizada dois dias após a morte) (Elliott 2000). A concentração sanguínea de 4-MTA nos momentos que antecederam a morte (4,2 mg/L) foi muito semelhante à concentração determinada *post-mortem* indicando que não houve um efeito de redistribuição *post-mortem* significativo, ao contrário do que foi previamente mencionado na intoxicação fatal descrita por Decaestecker e colaboradores (Decaestecker *et al.* 2001) e do que acontece em muitos casos de intoxicação com anfetaminas (de Letter *et al.* 2004; de Letter *et al.* 2002; Garcia-Repetto *et al.* 2003; Sticht *et al.* 2003). Foram ainda detectados dois possíveis metabolitos, um derivado sulfóxido e um derivado hidroxilado da 4-MTA, cuja identidade foi posteriormente confirmada em amostras provenientes de três intoxicações não fatais, embora a sua estrutura química não tenha sido inequivocamente identificada (Elliott 2000; Elliott 2001). Nestes três casos foram também detectadas outras anfetaminas nomeadamente, *d*-anfetamina, MDMA e pseudoefedrina (Elliott 2001). As concentrações plasmáticas

encontradas de 4-MTA variaram entre 0,131 e 0,760 mg/L. No momento da colheita do sangue o estado clínico de todos os indivíduos era considerado grave, requerendo ventilação artificial e sedação após a ocorrência de convulsões (Elliott 2001). Num destes casos foram recolhidas várias amostras de sangue em tempos diferentes, o que permitiu elaborar uma estimativa do perfil farmacocinético da 4-MTA em humanos (Elliott 2001). Neste indivíduo a concentração plasmática de 4-MTA no momento de chegada ao hospital era de 0,760 mg/L. Uma amostragem posterior revelou um decréscimo da concentração plasmática para 0,280 mg/L. Sete horas mais tarde a concentração plasmática tinha sido reduzida para metade do valor anterior (0,144 mg/L), o que permitiu estimar, ainda que grosseiramente, o tempo de semi-vida plasmática da 4-MTA em 7 h. Nas três horas seguintes a concentração plasmática de 4-MTA aumentou ligeiramente para 0,154 mg/L o que se poderá dever a um fenómeno de redistribuição (Elliott 2001). Com base nestes dados limitados no que diz respeito à ocorrência de intoxicações em humanos, este autor estipulou que níveis plasmáticos entre 0,2 e 0,6 mg/L de 4-MTA estariam associados à ocorrência de intoxicações moderadas, severas para concentrações superiores a 0,6 mg/L e potencialmente fatais para concentrações superiores a 1,5 mg/L (Elliott 2001). Em sete indivíduos que sobreviveram à intoxicação com 4-MTA as concentrações sanguíneas determinadas variaram entre 0,43 mg/L e 2,08 mg/L e as concentrações urinárias variaram entre 4 e 40 mg/L (de Letter *et al.* 2001).

Num estudo em que foram analisadas cinco amostras de urina de indivíduos que ingeriram entre um a cinco comprimidos de 4-MTA e que foram recolhidas entre 8 a 15 h após a ingestão, foram identificados por GC/MS, para além da 4-MTA, os seguintes metabolitos: (i) desamino-oxo-4-MTA (1-[4-(metiltio)-fenil]propano-2-ona), (ii) desamino-hidroxi-4-MTA (1-[4-(metiltio)-fenil]propano-2-ol), (iii) metabolito hidroxilado no anel aromático (2-aminopropil-metiltiofenol), (iv) metabolito hidroxilado no carbono β da cadeia lateral (2-amino-1-[4-(metiltio)fenil]-propano-1-ol; 4-metiltionorefedrina), e (v) ácido 4-metiltiobenzóico (Ewald *et al.* 2005). Com base nestes dados foram propostas as seguintes vias metabólicas para a 4-MTA em humanos (Figura 2): (i) desaminação oxidativa com formação de uma cetona e subsequente redução a um álcool ou (ii) degradação da cadeia lateral com formação do ácido metiltiobenzóico, (iii) hidroxilação aromática com formação de um fenol e (iv) β-hidroxilação da cadeia lateral com formação de 4-metiltionorefedrina. O metabolito desamino-hidroxi-4-MTA parece ser preferencialmente excretado na forma conjugada

como um glucuronídeo e/ou sulfato. Estas vias metabólicas são semelhantes às da *d*-anfetamina e muitos dos seus derivados (Caldwell 1980; Dring *et al.* 1970; Foster *et al.* 1993; Staack e Maurer 2005). Uma outra observação importante neste estudo foi que a 4-MTA não parece ser extensivamente metabolizada em humanos e a identificação e/ou quantificação da 4-MTA em urina ou soro constitui o melhor marcador de exposição a esta droga de abuso (Ewald *et al.* 2005).

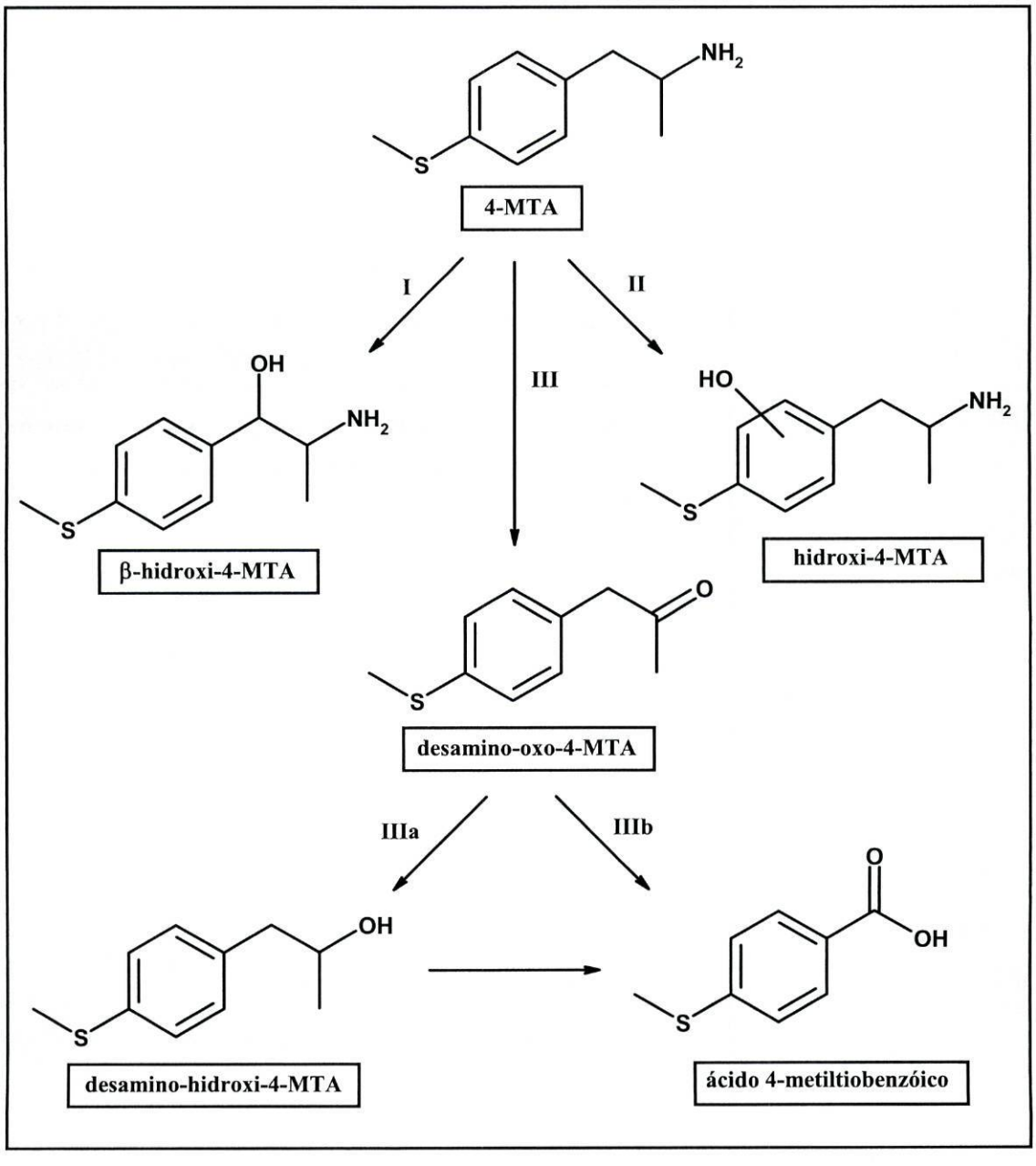


Figura 2. Vias metabólicas propostas para a 4-MTA em humanos de acordo com os resultados do estudo de Ewald e colaboradores (Ewald *et al.* 2005). I, β-hidroxilação da cadeia lateral; II, hidroxilação aromática; III, desaminação oxidativa seguida de redução (IIIa) ou oxidação (IIIb).

2.1.3. Efeitos biológicos e toxicológicos

No rato, o principal efeito farmacológico da 4-MTA ao nível neurológico é o aumento da libertação de serotonina, a inibição do sistema de captação neuronal da serotonina (Huang *et al.* 1992; Murphy *et al.* 2002; Scorza *et al.* 1999), e a inibição reversível da enzima monoamina oxidase A (MAO A) (Scorza *et al.* 1997; Scorza *et al.* 1999). Estudos *in vitro* e *ex vivo* demonstraram que o aumento da libertação de serotonina induzido pela 4-MTA era dependente da dose e que a magnitude deste efeito era semelhante à observada com a MDMA e com a *p*-cloroanfetamina (Huang *et al.* 1992; Scorza *et al.* 1999). Contudo, estudos *in vitro* mais recentes em que foi avaliada a capacidade de libertação de serotonina a partir de sinaptossomas, demonstraram que a MDMA é muito mais potente na libertação de serotonina do que a 4-MTA neste modelo experimental (Gobbi *et al.* 2002; Murphy *et al.* 2002). No que respeita à inibição do sistema de captação neuronal da serotonina, a 4-MTA é cerca de duas vezes mais potente do que a *p*-cloroanfetamina e seis vezes mais potente do que a MDMA (Huang *et al.* 1992; Murphy *et al.* 2002). Estudos em ratos revelaram que o valor basal de serotonina no hipocampo sofre um aumento máximo de 200% após administração de uma dose de 5 mg/kg por via intraperitoneal, que é seguido por um declínio lento dos valores deste neurotransmissor (Scorza *et al.* 1999). A 4-MTA tem uma elevada capacidade inibitória da enzima MAO A, sendo um inibidor mais potente dos que os derivados anfetamínicos metoxilados e com outros substituintes tioalquilo (Scorza *et al.* 1997; Scorza *et al.* 1999). O enantiómero S (dextrorotatório; S-(+)-MTA) é cerca de 18 vezes mais potente na inbição da MAO A do que o enantiómero R [R-(-)-MTA] e duas vezes mais potente do que a mistura racémica (Hurtado-Guzman *et al.* 2003). A propriedade dadora de electrões dos substituintes que contêm enxofre na posição *para* do anel aromático parece ser responsável por este aumento da potência de inibição da MAO A relativamente a outros derivados anfetamínicos (Scorza *et al.* 1997; Scorza *et al.* 1999).

Os derivados anfetamínicos, como por exemplo a MDMA, promovem a libertação de serotonina através de um processo designado por difusão por permuta (Rudnick e Wall 1992, 1993; Schuldiner *et al.* 1993). Neste processo as anfetaminas são transportadas pelo transportador membranar da serotonina para o interior do neurónio ao serem reconhecidas. Este transportador fica então disponível na superfície interna da membrana para se ligar à serotonina livre e transportá-la para o espaço sináptico. Este

processo é dependente do sódio e pode ser bloqueado pelos inibidores do sistema de captação neuronal da serotonina, como por exemplo, a fluoxetina e a imipramina (Rudnick e Wall 1992, 1993; Schuldiner *et al.* 1993). Por outro lado, ao possuir a capacidade de penetrar nas vesículas que armazenam este neurotransmissor ao nível neuronal, as anfetaminas podem, quer por interacção directa com o transportador, quer por um efeito de aumento do pH intravesicular (uma vez que são quimicamente bases fracas e a serotonina é mantida no interior das vesículas através de um gradiente de protões regulado por uma bomba de protões dependentes do sódio), induzir a libertação da serotonina para o espaço intraneuronal e posteriormente para o espaço sináptico (Rudnick e Wall 1992, 1993; Schuldiner *et al.* 1993). Ao inibir a MAO A no interior do neurónio a libertação da serotonina será ainda mais facilitada, uma vez que escapa à acção metabolizadora desta enzima. Esta poderá ser a explicação para o efeito muito superior e sustentado na libertação de serotonina que é observado com a administração de 4-MTA comparativamente ao que resulta da administração de outros compostos anfetamínicos indutores da libertação de serotonina (Scorza *et al.* 1997; Scorza *et al.* 1999). Não sendo este um efeito imediato, pode também explicar porque existe um atraso na produção do máximo efeito estimulante desejado pelos consumidores deste tipo de drogas. Existe também a possibilidade de interacções medicamentosas potencialmente graves com outros inibidores da MAO através da potenciação da síndrome da serotonina (associada a um estado de hiperestimulação serotonérgica, extremamente grave e potencialmente fatal) e a ocorrência de crises de hipertensão que podem dever-se à ingestão simultânea de alimentos ricos em tiramina ou de fármacos antidepressivos inibidores da MAO (Scorza *et al.* 1997).

A estimulação da libertação de serotonina pela 4-MTA resulta no aumento da secreção de várias hormonas nomeadamente, hormona adrenocorticotrófica (ACTH; *adrenocorticotrophic hormone*), ocitocina, corticosterona e renina, de uma forma dependente da dose, tendo estes efeitos sido observados em ratos (Li *et al.* 1996). A fluoxetina, um inibidor do sistema de captação neuronal da serotonina, inibe algumas destas respostas de libertação hormonal pelo que se concluiu que esta libertação se deve à activação da neurotransmissão serotonérgica. Este não parece ser o caso da ACTH cuja libertação não foi inibida pelo tratamento com fluoxetina (Li *et al.* 1996).

A 4-MTA interfere apenas moderadamente com a libertação e captação neuronal das catecolaminas neurotransmissoras dopamina e noradrenalina (Huang *et al.* 1992). Pensa-se que a neurotoxicidade ao nível serotonérgico está dependente da libertação de

dopamina, razão pela qual a 4-MTA foi considerada como sendo desprovida de neurotoxicidade (Huang *et al.* 1992). Após a administração aguda da 4-MTA a ratos, foram avaliados marcadores de neurotoxicidade serotonérgica, nomeadamente a deplecção a longo prazo da serotonina, dopamina, noradrenalina, e respectivos metabolitos, ao nível cerebral, e nenhum destes marcadores de neurotoxicidade foi modificado pela administração aguda de 4-MTA (Huang *et al.* 1992). Pelo contrário, a administração de *p*-cloroanfetamina nas mesmas condições experimentais produziu um efeito acentuado na depleção de serotonina e do seu metabolito ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) (Huang *et al.* 1992). No entanto, os estudos em animais considerados como modelo apropriado para a avaliação da neurotoxicidade de compostos em humanos recorrem a dosagens múltiplas e tais estudos não foram efectuados para a 4-MTA. Por outro lado, estudos *in vitro* mais recentes indicaram que a 4-MTA exerceu citotoxicidade de uma forma dependente da concentração numa linha celular obtida a partir de células do hipotálamo de rato adulto (Hurtado-Guzman *et al.* 2002). Esta linha celular expressa marcadores dopaminérgicos como por exemplo, receptores dopaminérgicos, tirosina hidroxilase e DOPA descarboxilase (Hurtado-Guzman *et al.* 2002). A citotoxicidade da 4-MTA foi atribuída à sua capacidade inibitória da MAO A e ao consequente aumento da concentração intracelular da dopamina que resulta num maior grau de autoxidação ao respectivo aminocromo com produção simultânea de espécies reactivas de oxigénio (Hurtado-Guzman *et al.* 2002).

A capacidade de inibição do sistema de captação da dopamina pela 4-MTA é sete vezes menor do que a da *p*-cloroanfetamina (Huang *et al.* 1992), duas vezes menor do que da MDMA e três vezes menor do que a da metilenodioxianfetamina (MDA, o metabolito N-desmetilado da MDMA). Contudo, a inibição da MAO A pela 4-MTA pode indirectamente aumentar a actividade dopaminérgica. Tal poderá também explicar a razão pela qual o aumento da libertação da ACTH induzido pela 4-MTA em ratos não foi inibido pela fluoxetina, uma vez que o aumento das concentrações plasmáticas desta hormona depende da activação dos receptores dopaminérgicos do tipo D_2 (Jezova e Vigas 1988; Li *et al.* 1996). A capacidade de inibição do sistema de captação da noradrenalina pela 4-MTA é também diminuta, sendo esta dez vezes menos potente do que a *p*-cloroanfetamina (Huang *et al.* 1992) e cinco vezes menos potente do que a MDMA nesta inibição. Estudos *in vitro* mais recentes demonstraram que a 4-MTA tem a capacidade de aumentar a concentração extracelular de noradrenalina a nível central e

periférico, o que pode estar na origem de efeitos tóxicos a nível cardiovascular (Quinn *et al.* 2006).

A administração de 4-MTA a animais de experiência resultou na indução de convulsões e subsequente depressão respiratória. No rato, a administração de uma dose de 42,6 mg/kg provocou convulsões e morte em todos os animais testados [Mallaret, resultados não publicados; ver em (EMCDDA 1999)]. No ratinho, a administração de doses de 21,3; 42,6; e 63,9 mg/kg induziu convulsões e "comportamentos serotonérgicos" mas não provocou a morte dos animais (EMCDDA 1999). O fármaco diazepam, dotado de actividade anticonvulsivante, não foi capaz de reverter as convulsões induzidas pela 4-MTA quando administrado numa dose de 40 mg/kg e a administração concomitante dos dois compostos resultou num aumento da mortalidade dos ratinhos (EMCDDA 1999). O efeito da inibição dos receptores serotonérgicos com metisergide, em ratinhos aos quais foi administrada uma dose de 63,9 mg/kg de 4-MTA, resultou num aumento dos tremores mas não provocou convulsões, tendo aumentado grandemente a locomoção dos animais. Este efeito poder-se-á dever à indução da síndrome da serotonina (EMCDDA 1999). A administração concomitante a ratinhos da 4-MTA (63,9 mg/kg) e da cetamina (80 mg/kg), um inibidor dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), aumentou a toxicidade da 4-MTA, induzindo ataxia e tremores e aumentando dramaticamente a letalidade (EMCDDA 1999). A cetamina também não reverteu as convulsões induzidas pela 4-MTA. O antagonista dos receptores NMDA, MK-801, quando administrado numa dose de 2 mg/kg induziu ataxia severa, tremores e algumas convulsões, não revertendo os efeitos tóxicos da 4-MTA (EMCDDA 1999).

A 4-MTA induziu hipertermia em ratos Wistar uma a duas horas após a ocorrência de convulsões. Uma vez que as convulsões podem, por si só, aumentar a temperatura corporal, não ficou esclarecido se o efeito hipertérmico observado se devia a uma acção directa da 4-MTA ou se seria uma consequência das convulsões [Mallaret, resultados não publicados; ver em (EMCDDA 1999)]. No âmbito do projecto da presente dissertação foram efectuados estudos em ratinhos da estirpe CD1 que visaram caracterizar os possíveis efeitos da 4-MTA na temperatura corporal desta espécie animal. Verificou-se que a 4-MTA induz um aumento marcado da temperatura corporal dos ratinhos de forma dependente da dose (Carmo *et al.* 2003). Tal como tinha sido já observado com a *d*-anfetamina (Cox e Tha 1975) e com a MDMA (Malberg e Seiden 1998; Malpass *et al.* 1999), após a administração da dose mais baixa de 4-MTA (20 mg/kg com administração intraperitoneal) ocorreu hipotermia, seguindo-se um aumento

gradual da temperatura corporal (Carmo *et al.* 2003). Estes efeitos termogénicos da 4-MTA são muito provavelmente resultantes da activação das vias serotonérgicas ao nível do sistema nervoso central (Green *et al.* 1995; Nash *et al.* 1988; Schmidt *et al.* 1990b). No entanto, estudos efectuados com a MDMA sugerem que o efeito termogénico deste derivado anfetamínico está mais dependente da activação dos receptores dopaminégicos do tipo D_1 do que da estimulação da libertação de serotonina (Mechan *et al.* 2002). Dado que a activação dos receptores serotonérgicos do tipo 5-HT_2 pode aumentar a libertação de dopamina (Gudelsky *et al.* 1994; Nash 1990), a hipótese destes efeitos termogénicos resultarem de uma estimulação indirecta das vias dopaminérgicas não pode ser excluída. Por outro lado, as acções das catecolaminas ao nível periférico podem também contribuir para o aumento da temperatura corporal (por exemplo, ao nível da contracção muscular e da activação da lipólise) (Gordon *et al.* 1991; Walubo e Seger 1999). No sentido de averiguar o efeito da modulação das vias serotonérgicas e adrenérgicas no efeito hipertérmico observado nos ratinhos, foi testada a influência de bloqueadores dos receptores serotonéricos (metisergide, inibidor inespecífico dos receptores do tipo 5-HT_1 e 5-HT_2) e adrenérgicos (prazosina, inibidor dos receptores do tipo α_1; yoimbina, inibidor dos receptores do tipo α_2; dl-propranolol, bloqueador dos receptores do tipo β). Foi ainda testada a influência de um inibidor irreversível da MAO (pargilina), a enzima que inactiva metabolicamente as catecolaminas endógenas (Carmo *et al.* 2003). Tal como esperado, o pré-tratamento dos ratinhos com estes agentes moduladores da neurotransmissão modificaram acentuadamente a resposta termogénica à 4-MTA. A inibição dos receptores serotonérgicos e a inibição da MAO potenciaram grandemente o aumento da temperatura corporal enquanto que os antagonistas adrenérgicos do tipo α_1 e β reverteram o efeito hipertérmico da 4-MTA. A inibição dos receptores do tipo α_2 não modificou a hipertermia induzida pela 4-MTA (Carmo *et al.* 2003). Ficou por isso demonstrado que, no ratinho, a 4-MTA induz um aumento significativo da temperatura corporal, o que pode influenciar grandemente a sua toxicidade [a hipertermia pode estar na origem de neurotoxicidade, rabdomiólise, falência renal aguda, coagulação intravascular disseminada, falência multiorgânica e acidose, pelo que este efeito é considerado como um dos potencialmente mais graves na intoxicação com anfetaminas (Burnat *et al.* 1996; Carvalho *et al.* 2002a; Dar e McBrien 1996; Henry *et al.* 1992; Kendrick *et al.* 1977)]. Este efeito termogénico parece ser altamente dependente da acção da 4-MTA na neurotransmissão, ao nível do sistema

nervoso central e periférico, através do efeito modulador das catecolaminas endógenas cuja libertação é directa ou indirectamente estimulada pela 4-MTA (Carmo *et al.* 2003).

Os efeitos da 4-MTA ao nível cardiovascular, avaliados no rato após a administração de uma dose de 5 mg/kg, consistiram na diminuição da pressão sanguínea e do ritmo cardíaco (Li *et al.* 1996). Um estudo *in vitro* demonstrou que a 4-MTA, ao contrário da MDMA, inibe fortemente a contracção da aorta de rato estimulada pela serotonina (Murphy *et al.* 2002), indicando um mecanismo de acção ao nível periférico distinto para estas duas substâncias. Os autores deste estudo propuseram como explicação para este efeito, um possível antagonismo dos receptores serotonérgicos do subtipo 5-HT_{2A} para os quais a 4-MTA poderá ter afinidade, levantando a hipótese destes efeitos estarem relacionados com a toxicidade em humanos através de uma acção ao nível da vasculatura periférica (Murphy *et al.* 2002).

2.1.4. Efeitos tóxicos em humanos

A 4-MTA foi associada a sete intoxicações fatais, das quais cinco ocorreram no Reino Unido (Elliott 2000; Elliott 2001; EMCDDA 1999), uma na Bélgica (de Letter *et al.* 2001) e uma na Holanda (Poortman 1998). Num destes casos, a 4-MTA foi a única droga detectada (Elliott 2000) enquanto que nos outros casos foram encontradas outras drogas nomeadamente, MDMA (de Letter *et al.* 2001; Elliott 2001), cannabis (de Letter *et al.* 2001), outras anfetaminas (Elliott 2001; Poortman e Lock 1999), álcool e metadona (EMCDDA 1999). A sintomatologia descrita nestas intoxicações fatais apontava para o desenvolvimento da síndrome da serotonina associada a uma depressão respiratória que aparentemente constituiu a principal causa de morte (EMCDDA 1999). Esta síndrome resulta de uma hiperestimulação serotonérgica e pode ser uma reacção adversa extremamente grave e potencialmente fatal dos fármacos e drogas serotonérgicas (Sporer 1995). Os sintomas incluem, euforia, sonolência, movimentos rápidos oculares sustentados, aumento dos reflexos, contracção muscular súbita, agitação, sensação de embriaguez e tonturas, sudorese, rigidez, elevação da temperatura corporal, tremores e alterações comportamentais incluindo confusão e hipomania (Sporer 1995). Os estudos realizados em animais indicam que a 4-MTA induz alguns dos sintomas típicos desta síndrome (Gobbi *et al.* 2002; Huang *et al.* 1992). A ingestão

concomitante de outras drogas pode também contribuir para a morte provocada pela 4-MTA. Por exemplo, o álcool pode contribuir para a depressão respiratória. Foram relatadas, desde 1997, 11 intoxicações não fatais envolvendo a 4-MTA (três no reino Unido (Elliott 2001), sete na Bélgica (de Letter *et al.* 2001) e uma na Holanda (de Boer *et al.* 1999a), que resultaram em hospitalização e medidas de ressuscitação. O risco de intoxicação por *overdose* parece estar associado ao atraso na produção do efeito estimulante desejado pelos consumidores deste tipo de drogas que terão sido por isso encorajados a ingerir um maior número de comprimidos, partindo do princípio que a dose inicial teria sido insuficiente para surtir o efeito desejado. Os estudos realizados em animais indicam que enquanto o aumento da libertação de serotonina é rápido (Scorza *et al.* 1999), os efeitos cardiovasculares e na libertação de hormonas são mais lentos (Li *et al.* 1996), o que poderá contribuir para um aumento no consumo de comprimidos antes que haja uma percepção dos sintomas de toxicidade.

Os relatos dos indivíduos que consumiram a 4-MTA, testemunhas da intoxicação e médicos assistentes, apontam para um efeito mais forte e prolongado do que o provocado pela MDMA, sendo também a 4-MTA frequentemente associada a efeitos mais desagradáveis e graves incluindo, náusea, nistagmo, hipertermia, pressão no globo ocular, sede, tremores, confusão, perda de memória, convulsões, depressão respiratória e aumento do ritmo cardíaco (de Boer *et al.* 1999a; de Letter *et al.* 2001; Elliott 2000; EMCDDA 1999). Foram também relatados pelos indivíduos que consumiram a 4-MTA, efeitos amnésicos com duração prolongada (até duas semanas) (de Boer *et al.* 1999a; de Letter *et al.* 2001). A longa duração de acção e do tempo de semi-vida da 4-MTA podem ter sérias implicações na capacidade de condução de veículos e uso de máquinas (EMCDDA 1999).

Na Tabela 1 encontram-se resumidos os dados relativos às intoxicações associadas à ingestão de 4-MTA disponíveis na literatura.

Tabela 1. Intoxicações relacionadas com a ingestão de 4-MTA

País	Ano	Idade	Sexo	Nº de comprimidos	Concentração de 4-MTA (mg/L)		Outras substâncias identificadas	Sobrevivência	Referência
					Sangue	Urina	Sangue (mg/L)		
Holanda	1997	38	M	7-8?	1,4		Anfetamina (1,540) Etanol (161)	Morte	(Poortman e Lock 1999)
Reino Unido	1998	22	M		4,2/4,6	87,2		Morte	(Elliott 2000)
Reino Unido	1998	21	M		1,561		Etanol Metadona	Morte	(EMCDDA 1999)
Reino Unido	1998	27	M		2,8		MDMA (0,72) MDA Anfetamina (0,02) Canabinóides	Morte	(EMCDDA 1999)
Reino Unido	1998	37	M		3,9/3,5		Etanol (2330) Anfetamina (0,030)	Morte	(EMCDDA 1999)
Reino Unido					2,0			Morte	(EMCDDA 1999)
Bélgica	1999	27	M	≥6	5,36	95,5	MDMA (0,012) Canabinóides	Morte	(Decaestecker *et al.* 2001)
Bélgica	1999	18	M	≥2	0,63	10	Canabinóides	Sobrevivência	(de Letter *et al.* 2001)
Bélgica	1999	22	F	1	1,08	4	Canabinóides	Sobrevivência	(de Letter *et al.* 2001)
Bélgica	1999	15	F	1	2,08	8	Canabinóides	Sobrevivência	(de Letter *et al.* 2001)
Bélgica	1999	19	M	1-1,5?	1,93	4	Canabinóides	Sobrevivência	(de Letter *et al.* 2001)
Bélgica	1999	22	M	3,5,6?	1,26	40	Canabinóides	Sobrevivência	(de Letter *et al.* 2001)
Bélgica	1999	19	M	≥2	0,43	32	Canabinóides	Sobrevivência	(de Letter *et al.* 2001)
Reino Unido	1998				0,131		Anfetamina (0,05) Pseudoefedrina	Sobrevivência	(Elliott 2001)
Reino Unido	1998				0,760		Anfetamina (0,24) MDMA (0,04)	Sobrevivência	(Elliott 2001)
Reino Unido	1998				0,189	6,5	MDMA (0,06)	Sobrevivência	(Elliott 2001)
Holanda	1998	22	M	1				Sobrevivência	(de Boer *et al.* 1999a)

2.1.5. Dependência

Não existem até à data estudos sistematizados do potencial de dependência da 4-MTA em animais ou em humanos. Em estudos de discriminação de fármacos em ratos, a 4-MTA demonstrou possuir propriedades semelhantes à MDMA (Huang *et al.* 1992; Khorana *et al.* 2004). O efeito moderado na libertação de dopamina faz prever um reduzido potencial para induzir dependência dado o papel conhecido deste neurotransmissor nos efeitos de reforço ao nível do sistema nervoso central (EMCDDA 1999). Os relatos obtidos dos consumidores de 4-MTA indicam que o abuso desta droga se deve aos seus efeitos estimulantes e euforizantes (EMCDDA 1999).

Um composto com acção estimulante ao nível do sistema nervoso central pode apresentar um efeito de estímulo discriminativo. Foram efectuados estudos para averiguar se a 4-MTA substituía drogas alucinogénias e/ou estimulantes (Dukat *et al.* 2002; EMCDDA 1999; Huang *et al.* 1992; Khorana *et al.* 2004). Nestes estudos os animais são treinados para discriminar entre um determinado composto com acção conhecida a nível do sistema nervoso central e uma solução salina, por exemplo, treinando-os para pressionar uma determinada alavanca que dá acesso a comida quando é administrado o composto e outra quando é administrada a solução salina. Se com a administração da droga em estudo o animal exibe o mesmo comportamento (por exemplo, pressiona a mesma alavanca) observado com o composto de acção conhecida para o qual foi previamente treinado para discriminar, então a actividade de ambos os compostos é semelhante.

Huang e colaboradores estudaram o efeito da 4-MTA em ratos treinados para discriminar a MDMA (Huang *et al.* 1992; Khorana *et al.* 2004), a N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina (MBDB), e o 5-metoxi-6-metil-2-aminoindano (MMAI) (Huang *et al.* 1992). Foram também efectuados estudos com a *d*-anfetamina, N-metil-1-(4-metoxifenil)-2-aminipropano (PMMA; *p*-metoximetanfetamina) (Dukat *et al.* 2002), a dietilamina do ácido lisérgico (LSD), a fenciclidina (EMCDDA 1999), o composto alucinogénio 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)-2-aminopropano (DOM), e a cocaína (Khorana *et al.* 2004). A 4-MTA substitui completamente a MDMA (Huang *et al.* 1992; Khorana *et al.* 2004), a MBDB, o MMAI (Huang *et al.* 1992) e a PMMA (Dukat *et al.* 2002) nos animais treinados para discriminar estes compostos e não substitui a *d*-anfetamina (Dukat *et al.* 2002), a LSD, a fenciclidina (EMCDDA 1999), o DOM, nem a cocaína (usada para avaliar a discriminação do efeito estimulante) (Khorana *et al.* 2004). Os efeitos no comportamento parecem ser superiores para a 4-MTA relativamente aos induzidos pelos compostos MDMA, MBDB e MMAI, e equivalentes aos da *p*-cloroanfetamina (Huang *et al.* 1992). A 4-MTA parece ser por isso desprovida de actividade alucinogénia.

Nestes estudos de discriminação de compostos ocorrem com frequência falsos positivos pelo que não constituem um modelo animal validado para a previsão da actividade dos compostos em humanos. No entanto, estes modelos animais constituem uma excelente abordagem inicial para a elucidação da actividade dos compostos ao nível comportamental. Destes estudos foi concluído que (i) a 4-MTA é eficaz em doses baixas, (ii) é um composto com uma acção potente a nível do sistema nervoso central, e

(iii) é predominantemente um indutor da libertação de serotonina, razão pela qual a 4-MTA substitui a MDMA nestes estudos (EMCDDA 1999). Os efeitos comportamentais observados indicam que a 4-MTA possui uma maior semelhança aos compostos entactogéneos MDMA e MBDB, sendo os seus efeitos marcadamente diferentes dos efeitos estimulantes da *d*-anfetamina e cocaína e dos efeitos alucinogénios da LSD, do DOM e da fenciclidina (Dukat *et al.* 2002; EMCDDA 1999; Huang *et al.* 1992; Khorana *et al.* 2004).

2.1.5.1. Efeitos psicológicos

Não existem até à data estudos sistematizados dos efeitos neurológicos e psicológicos da 4-MTA em humanos. Os estudos disponíveis, realizados em animais, sugerem efeitos criadores de sentimentos de empatia característicos de um grupo de compostos anfetamínicos classificados como entactogéneos, entre os quais se inclui a MDMA (EMCDDA 1999).

2.1.5.2. Efeitos comportamentais

Os estudos comportamentais destinados a avaliar a relação estrutura-actividade e o potencial neurotóxico da 4-MTA indicam que se trata de uma substância psicoactiva potente.

Em doses elevadas, a 4-MTA induz em ratos "comportamentos serotonérgicos" que se manifestam por uma alteração da postura corporal, salivação, abdução dos membros posteriores e alterações na marcha (Huang *et al.* 1992). Estes sintomas são semelhantes, na sua natureza e intensidade, aos induzidos por outros agentes serotonérgicos, como por exemplo a *p*-cloroanfetamina, embora estes induzam outro tipo de sintomas (por exemplo, movimentos circulatórios aleatórios, tremor e ataxia) que não foram observados com a 4-MTA (Huang *et al.* 1992).

Os ratos parecem ser mais susceptíveis do que os ratinhos a estes efeitos da 4-MTA. A administração intraperitoneal de uma dose de 42,6 mg/kg a ratos resultou rapidamente em convulsões e subsequente morte dos animais (EMCDDA 1999). No

ratinho observaram-se igualmente os mesmos "sintomas serotonérgicos" mas estes são aparentemente menos severos nesta espécie animal (EMCDDA 1999). No ratinho foi também observada uma hiperestimulação da locomoção (EMCDDA 1999).

Marona-Lewica e Nichols observaram que a 4-MTA era 10 vezes mais potente, no teste de natação forçada em ratinhos, do que o fármaco antidepressivo imipramina (EMCDDA 1999). Este feito tem sido atribuído à potente inibição da MAO A pela 4-MTA. Deste modo, este teste demonstra que a MTA é uma substância com uma acção muito potente a nível do sistema nervoso central (EMCDDA 1999).

Uma vez que a 4-MTA é um agente que provoca a libertação rápida de serotonina, a sua possível acção antidepressiva poderia ser mais rápida relativamente aos inibidores selectivos da recaptação da serotonina (SSRIs, *selective serotonin reuptake inhibitors*). Para testar estes efeitos foi realizado um estudo comportamental baseado num modelo de depressão que recorreu à indução moderada de stress crónico a ratos da estirpe Sprague-Dawley (Marona-Lewicka e Nichols 1997). Nestes animais, a indução de stress resulta na incapacidade de experimentar sensações de prazer que, no caso deste modelo, se traduz na incapacidade de saborear uma solução açucarada, havendo por isso um consumo maior e mais rápido desta solução nos animais com comportamento depressivo. Neste estudo foi demonstrado que a 4-MTA administrada em duas doses diárias de 5 mg/kg revertia este comportamento depressivo ao diminuir o consumo da solução de sacarose. A magnitude e a rapidez de produção destes efeitos pela 4-MTA foram superiores às registadas com a administração de uma dose diária de 10 mg/kg do fármaco SSRI sertralina (Marona-Lewicka e Nichols 1997).

2.1.5.3. Conhecimento e percepção da 4-MTA entre os seus utilizadores

O conhecimento dos utilizadores deste tipo de drogas de abuso relativamente à 4-MTA parece ser reduzido, e a maior parte acredita que está a ingerir MDMA. Estes indivíduos têm a percepção de que estes comprimidos possuem um efeito particularmente forte e duradouro (EMCDDA 1999). Entre os consumidores de drogas do tipo da *ecstasy*, a 4-MTA foi gradualmente adquirindo uma imagem mais negativa (EMCDDA 1999).

Num estudo epidemiológico realizado no Reino Unido, em que foi efectuado um inquérito a mais de 1000 consumidores de drogas do tipo da *ecstasy*, cerca de 10% declararam ter consumido 4-MTA e cerca de um quarto destes indivíduos declararam que a consumiriam novamente (Winstock *et al.* 2002). Dentro desta população, cerca de 76% dos indivíduos declararam ter conhecimento acerca da 4-MTA e dentro destes cerca de 50% declararam ter conhecimento que os efeitos da 4-MTA seriam nocivos, 2,6 % declararam que os efeitos da 4-MTA seriam agradáveis, e os restantes 46,6% declararam que a 4-MTA teria simultaneamente efeitos agradáveis e desagradáveis (Winstock *et al.* 2002).

2.1.5.4. Disponibilidade e qualidade

A 4-MTA foi apreendida em seis Estados-membros da União Europeia e na Austrália, tendo a maioria dos casos clínicos e apreensões sido registados na Bélgica, na Holanda e no Reino Unido. Em alguns destes casos, os comprimidos apreendidos possuíam apenas 4-MTA, enquanto noutros foi encontrada uma associação com cafeína. Ambos os tipos de comprimidos possuíam uma dosagem de 4-MTA entre os 20 e 140 mg (EMCDDA 1999; Poortman 1998; Poortman e Lock 1999).

As apreensões registadas de 4-MTA ocorreram durante os anos de 1997 e 1998. No final de 1998, pensava-se que a 4-MTA teria saído dos mercados de drogas ilícitas. No entanto, em 1999, durante uma análise realizada em comprimidos cedidos voluntariamente pelos seus consumidores, foram encontrados nove comprimidos contendo 4-MTA, mostrando que esta estaria ainda em circulação no ano de 1999. Esta foi contudo a última referência à identificação da 4-MTA em comprimidos (Ramsey *et al.* 2001).

2.1.5.5. Prevalência e padrão de uso

O consumo de 4-MTA parece restrito a uma muito pequena parcela do mercado de consumo da MDMA. O padrão de uso é semelhante ao da MDMA e parece ser mais do tipo esporádico e ocasional do que um tipo de consumo frequente (EMCDDA 1999).

2.1.5.6.Características e comportamento dos consumidores

De uma forma geral, os utilizadores de *ecstasy* são jovens com idades compreendidas entre os 16 e os 30 anos, havendo uma menor discriminação no uso por parte de ambos os sexos comparativamente ao que acontece com outro tipo de drogas de abuso. A ingestão concomitante com outro tipo de drogas associadas às festas *rave* (eventos sociais que decorrem ao som de música do tipo electrónico tocada de forma alta e repetitiva, e acompanhada de espectáculos de luz), como por exemplo, outras anfetaminas, cannabis e álcool parece ser frequente (EMCDDA 1999).

2.1.5.7. Indicadores de consequências para a saúde

Os efeitos adversos relatados nos casos clínicos associados à ingestão de 4-MTA foram relatados num curto espaço de tempo (nove meses) e numa população aparentemente muito pequena de utilizadores. Não existe qualquer informação acerca de consequências de intoxicações a longo prazo (EMCDDA 1999).

2.1.5.8. Contexto do uso

O uso da 4-MTA é feito num contexto de utilização semelhante ao da MDMA em que são já esperados determinados efeitos, num dado intervalo de tempo. Como consequência, a ingestão da 4-MTA pode ser associada a uma falta de eficácia do comprimido que se pensaria conter MDMA. Isto pode estar na origem da ingestão de um maior número de comprimidos, e consequentemente num mais elevado risco de ocorrência de intoxicações graves e potencialmente fatais (EMCDDA 1999).

2.2. 4-Bromo-2,5-Dimetoxifeniletilamina (2C-B)

A 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B) é uma droga de abuso com características estimulantes e alucinogénias. Foi sintetizada por Alexander Shulgin em 1974, tendo a primeira publicação sobre a 2C-B surgido em 1975 por Shulgin e Carter (Shulgin e Carter 1975). A sua utilização como droga de abuso foi pela primeira vez documentada nos EUA em 1978 (WHO 1999). No final da década de 1980, a 2C-B era comercializada como uma droga do tipo da MDMA (*ecstasy*) e conquistou alguma popularidade entre os consumidores de drogas estimulantes e alucinogénias. Em Janeiro de 1994, a sua posse e venda é considerada ilegal nos EUA, sendo esta decisão tomada de forma definitiva a partir de Junho de 1995. A mesma decisão foi tomada em 1997 na Holanda e em 1998 no Japão. Em Portugal, a 2C-B foi incluída na Tabela de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas Ilícitas apenas em 2004, após recomendação do Comité para a Dependência de Drogas da Organização Mundial de Saúde (WHO 1999, 2001).

2.2.1. Descrição da 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B)

2.2.1.1. Características Físico-Químicas

A 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B) (CAS 66142-81-2) é quimicamente uma ariletilamina (Figura 3). Outros nomes para esta substância incluem, 4-bromo-2,5-dimetoxi-beta-feniletilamina (BDMPEA), *Erox*, *MFT*, *Nexus*, *Venus*, *Bees*, e *Performax*. Esta molécula não apresenta nenhum centro quiral pelo que não existem estereoisómeos (WHO 2001).

A 2C-B não apresenta reactividade aos imunoensaios comercialmente disponíveis para a detecção de anfetaminas (Giroud *et al.* 1998). A 2C-B desenvolve coloração com o Reagente de Marquis (entre o laranja e o castanho) e com o Reagente de Mecke (entre o verde e amarelo, formando finalmente uma coloração azul) que não sendo suficientemente específica para identificar o composto, permite distingui-lo da mescalina e do DOM (Ragan *et al.* 1985). Outros métodos analíticos empregues para a

identificação da 2C-B em amostras apreendidas incluem, a espectrofotometria de UV e IV, RMN e GC/MS (Bell *et al.* 2000; Giroud *et al.* 1998; Ragan *et al.* 1985). Os espectros de UV e IV da 2C-B são muito semelhantes aos do DOM pelo que a identificação desta substância deverá recorrer à RMN ou à espectrometria de massa (Ragan *et al.* 1985). A identificação do espectro de massa da 2C-B é facilitada pela presença do átomo de bromo na estrutura molecular que origina pares de iões de fragmentação de intensidade semelhante e distantes em duas unidades de massa atómica (como resultado da ocorrência de dois isótopos do bromo: ^{79}Br e ^{81}Br) (Giroud *et al.* 1997). No entanto, a utilização da espectrometria de massa isoladamente pode não permitir a distinção entre eventuais isómeros posicionais da 2C-B (Giroud *et al.* 1998).

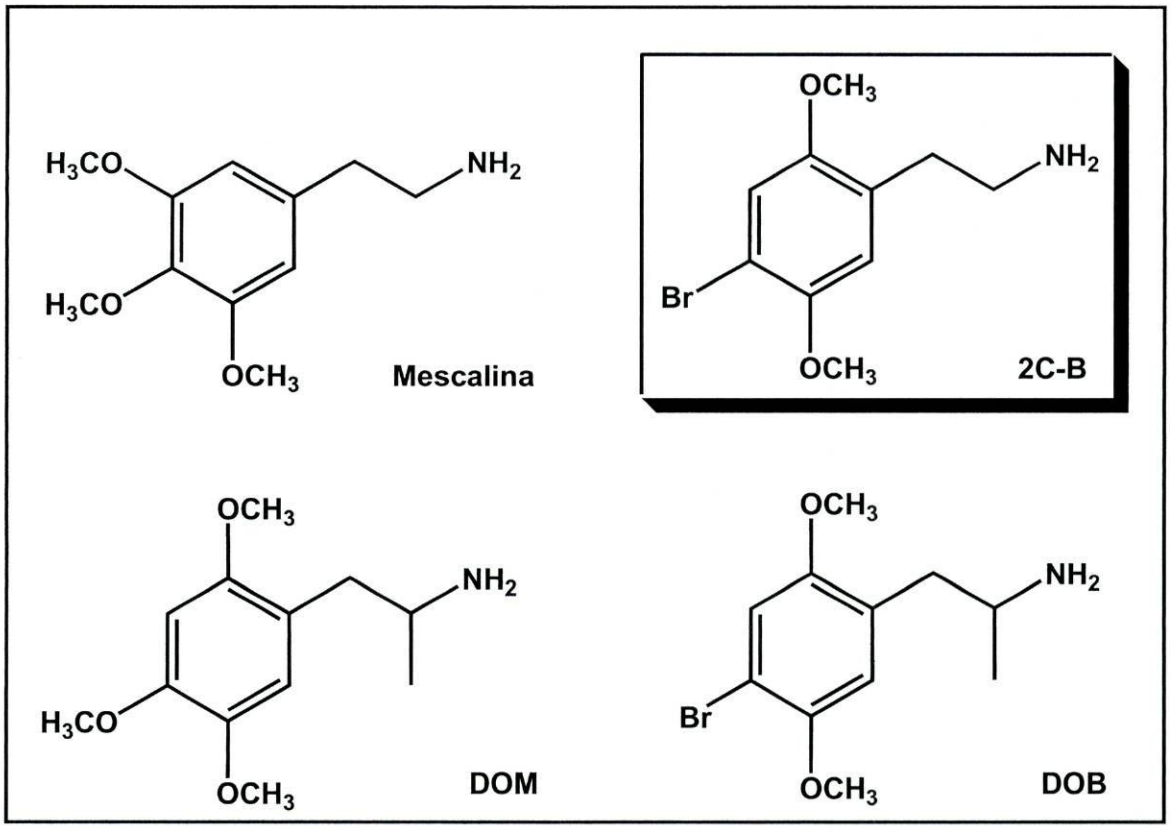


Figura 3. Estrutura química da 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-B) e dos compostos aparentados mescalina, 4-metil-2,5-dimetoxianfetamina (DOM) e 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB).

Foram também desenvolvidos métodos para a identificação e quantificação da 2C-B em amostras biológicas recorrendo a metodologias de HPLC/UV (Soares *et al.* 2004), GC/MS (Gijzels 1997; Namera *et al.* 2002; Pilon 1997; Soares *et al.* 2004; Theobald *et al.* 2006) e electroforese capilar com detecção por fluorescência (Tsai *et al.* 2006).

2.2.1.2.Formas de apresentação e composição

A 2C-B é comercializada vulgarmente na forma de comprimidos ou cápsulas sob a designação de *Ecstasy*, *Bromo*, *Erox*, *Vénus*, *Eve*, *MFT*, *XTC*, *Nexus* e *Performax* (Velea *et al.* 1999; WHO 1999). O conteúdo dos comprimidos em substância activa é altamente variável. Num estudo em que foram analisados comprimidos obtidos em duas apreensões realizadas na Suíça, foram encontradas quantidades que variaram entre 3 e 8 mg por comprimido, o que está dentro da quantidade mínima necessária para se obter os efeitos característicos desta droga (Giroud *et al.* 1998). Num outro estudo foram encontradas dosagens semelhantes, entre 5 e 14 mg, em comprimidos analisados na Holanda (de Boer *et al.* 1999b).

Para além da substância activa, os comprimidos analisados demonstraram conter também impurezas de síntese e outros estimulantes (de Boer *et al.* 1999b; Giroud *et al.* 1998).

2.2.1.3. Relação estrutura-actividade

A 2C-B é estruturalmente semelhante aos estimulantes obtidos por síntese, 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB) e ao DOM, bem como ao estimulante de origem natural mescalina [alcalóide alucinogénio obtido do cacto peiote (*Lophophora williamsii*) utilizado na antiguidade em rituais de iniciação ameríndios] (Velea *et al.* 1999; WHO 2001) (Figura 3). Em doses elevadas é uma droga com elevada potência alucinogénia (WHO 2001).

A estrutura 2,5-dimetoxifeniletilamina é responsável pela capacidade de ligação da 2C-B aos receptores serotonérgicos (de Boer e Bosman 2004). A presença do grupo metilo no carbono α da cadeia lateral aumenta a eficácia dos análogos DOB e DOM ao nível da sua acção nos receptores serotonérgicos relativamente à 2C-B (Acuna-Castillo *et al.* 2002), uma vez que este grupo substituinte da cadeia alifática confere resistência ao metabolismo pela MAO (Caldwell 1980).

A actividade alucinogénia das feniletilaminas deve-se à presença de um grupo amina separado do anel aromático por dois átomos de carbono, à presença de dois grupos metoxilo substituintes do anel aromático nas posições 2 e 5 relativamente à

cadeia lateral, e ainda à presença de um grupo substituinte com carácter hidrófobo na posição 4 (no caso da 2C-B um halogénio, e substituintes alquilo, alcoxilo e tioalquilo no caso de outros compostos análogos) (Jacob 3rd e Shulgin 1994; Monte *et al.* 1996; Nichols 1981).

2.2.2. Farmacocinética

Os dados disponíveis respeitantes à farmacocinética da 2C-B restringem-se ao seu metabolismo. A 2C-B é extensamente metabolizada no Homem e no rato.

Num estudo *in vitro* em que a 2C-B foi incubada com homogeneizado de fígado de rato foi identificado o metabolito ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético (de Boer *et al.* 1998). Neste estudo foram também encontrados vários outros metabolitos cujas estruturas moleculares foram deduzidas a partir do respectivo espectro de massa. Esses metabolitos incluem o derivado do ácido benzóico, bem como o seu respectivo metabolito O-desmetilado (Gijzels 1997; Pilon 1997). O metabolismo da 2C-B foi também avaliado em suspensões de hepatócitos de rato onde foram identificados os metabolitos resultantes da desaminação oxidativa (ácido carboxílico e álcool), o metabolito O-desmetilado no metoxilo substituinte na posição 2 do anel aromático (2-hidroxi-2C-B) e o seu derivado N-acetilado (2-hidroxi-N-acetil-2C-B), bem como o metabolito 5-hidroxi-N-acetil-2C-B (Kanamori *et al.* 2005).

O estudo do perfil metabólico da 2C-B *in vivo*, no rato, demonstrou que as vias metabólicas são semelhantes às identificadas *in vitro* (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003). Após administração oral de uma dose de 10 mg/kg, a 2C-B foi extensamente metabolizada e apenas uma pequena parte foi excretada sem biotransformação (cerca de 0,2% da dose administrada). Os metabolitos encontrados na urina de rato foram o derivado carboxílico (ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético; correspondente a 1,9% da dose administrada), o álcool correspondente [4-bromo-2,5-(dimetoxifenil)-etanol; 0,8 % da dose administrada], os metabolitos desmetoxilados 2-hidroxi-2C-B (4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina; 3,5% da dose administrada) e 5-hidroxi-2C-B (4-bromo-5-hidroxi-2-metoxifeniletilamina; 1,2% da dose administrada) e ainda os dois metabolitos resultantes da N-acetilação da 2- e 5-hidroxi-2C-B (este último corresponde ao metabolito mais abundante, 13,2% da dose, enquanto

a excreção da N-acetil-2-hidroxi-2C-B corresponde a 5,8% da dose administrada) (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003). A maior fracção dos metabolitos hidroxilados foi excretada na forma de conjugados com o ácido glucurónico e com sulfatos (Kanamori *et al.* 2003). A excreção fecal foi também avaliada, tendo sido detectados os metabolitos 5-hidroxi-N-acetil-2C-B e 2-hidroxi-N-acetil-2C-B (Kanamori *et al.* 2003).

Num estudo *in vivo* mais recente, os metabolitos da 2C-B (após administração por intubação gástrica, de uma dose de 0,3 mg/kg que corresponde aproximadamente a uma dose de 20 mg em humanos) identificados na urina de rato foram os dois isómeros O-desmetilados e o derivado do ácido fenilacético mono O-desmetilado (Theobald *et al.* 2006).

O perfil metabólico da 2C-B em humanos foi apenas estudado na urina de um indivíduo que ingeriu 2C-B. Para além da 2C-B, foram identificados os metabolitos ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico, e a 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxifeniletilamina (de Boer *et al.* 1998, 1999c).

Deste modo, as principais vias metabólicas para a 2C-B incluem a desaminação oxidativa (com oxidação e formação dos derivados dos ácidos fenilacético e benzóico ou redução aos respectivos álcoois), a desmetilação dos substituintes metoxilo do anel aromático, e a N-acetilação (de Boer *et al.* 1998; Theobald *et al.* 2006) (ver Figura 4).

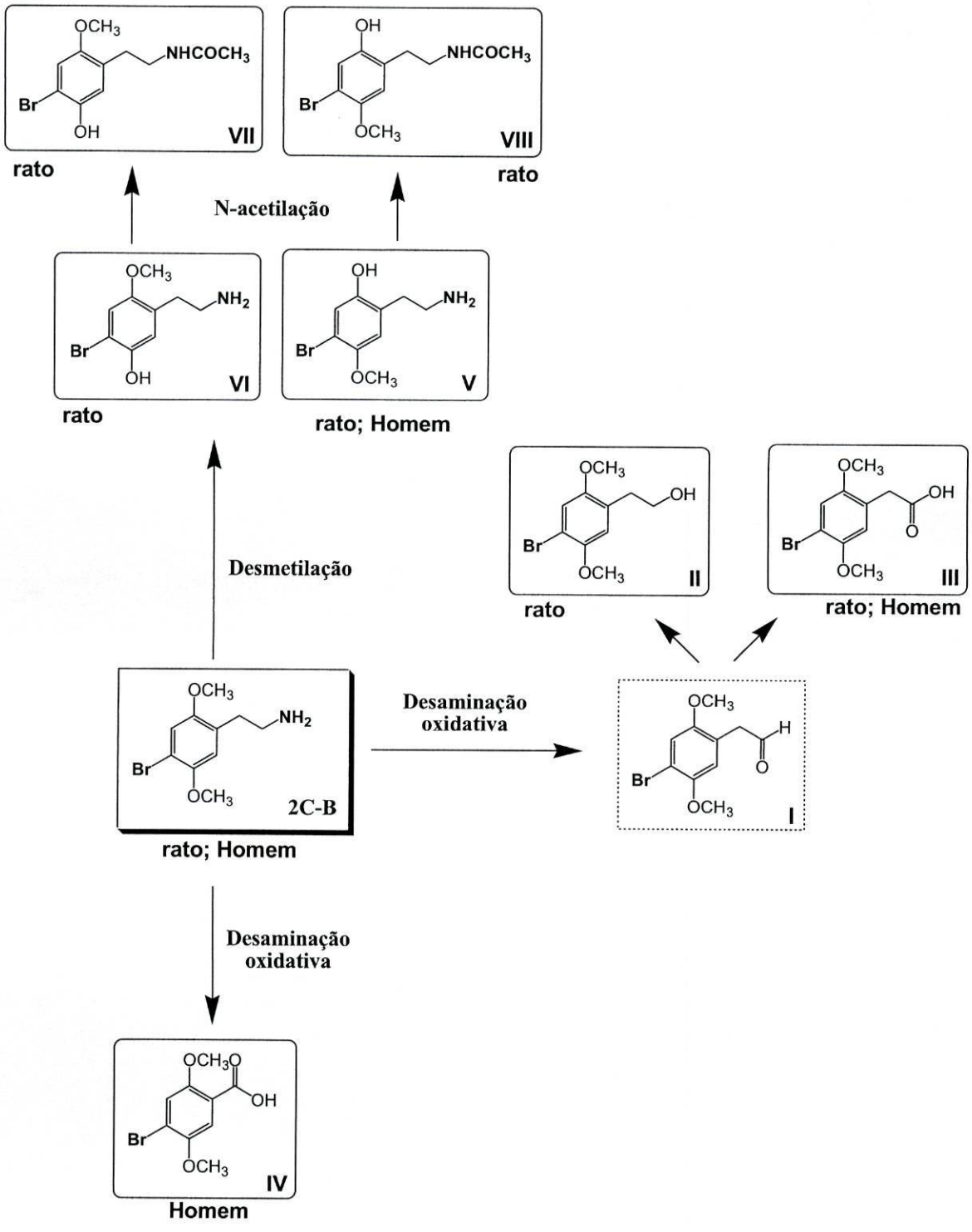


Figura 4. Vias metabólicas de Fase I propostas para a 2C-B *in vivo* no rato e no Homem (de Boer *et al.* 1999c; Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003). As estruturas delineadas por tracejado correspondem a prováveis intermediários que não foram identificados nos estudos. I, 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacetaldeído; II, 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-etanol; III, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético; IV, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico; V, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina; VI, 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxi-feniletilamina; VII, 1-acetoamino-2-(2-metoxi-4-bromo-5-hidroxifenil)-etano ou 5-O-desmetil-N-acetil-2C-B; VIII, 1-acetoamino-2-(2-hidroxi-4-bromo-5-metoxifenil)-etano ou 2-O-desmetil-N-acetil-2C-B.

2.2.3. Mecanismos de acção e efeitos biológicos

Os primeiros estudos efectuados para avaliar os efeitos farmacológicos da 2C-B demonstraram que esta droga possuía elevada afinidade para os receptores serotonérgicos centrais do tipo 5-HT_2 (Glennon *et al.* 1988). Ao contrário da DOB, que é muito selectiva para os receptores do tipo 5-HT_2, a 2C-B exibiu também afinidade para os receptores serotonérgicos dos subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1C}, sendo por isso menos selectiva (Glennon *et al.* 1988). A avaliação dos efeitos comportamentais em ratos revelou que a 2C-B apresenta semelhanças aos análogos DOB e DOM, produzindo efeitos semelhantes. Os autores concluíram que esta droga teria muito provavelmente propriedades alucinogénias, uma vez que esta acção está associada aos receptores 5-HT_2 (Glennon *et al.* 1988). Outros estudos comportamentais confirmaram a acção alucinogénia da 2C-B por comparação com a acção de estimulantes e alucinogénios (Bronson *et al.* 1995).

Estudos posteriores para a caracterização farmacológica desta droga revelaram que a 2C-B é um agonista parcial para os receptores serotonérgicos do tipo 5-HT_2 e α_1-adrenérgicos (Lobos *et al.* 1992). Estudos mais recentes descrevem uma acção antagonista potente e reversível para o receptor 5-HT_{2A} e parcialmente agonista para o receptor 5-HT_{2C} (Acuna-Castillo *et al.* 2002; Villalobos *et al.* 2004). Estes resultados, que foram reproduzidos para uma série de análogos da 2C-B, questionaram o envolvimento dos receptores 5-HT_{2A} nas propriedades alucinogénias das feniletilaminas, sendo muito provável o envolvimento de outros mecanismos, nomeadamente, a libertação de monoaminas neurotransmissoras e a modulação por outros receptores como por exemplo os receptores NMDA (Acuna-Castillo *et al.* 2002; Villalobos *et al.* 2004).

A 2C-B actua nas doses entre 0,1 e 0,2 mg/kg, o que equivale a uma potência dez vezes inferior à do composto análogo DOB (Ragan *et al.* 1985; Shulgin e Carter 1975). Por outro lado, a potência desta droga relativamente à da mescalina é cerca de 15 a 16 vezes superior (de Boer e Bosman 2004). A dose necessária para obter o efeito alucinogénio desejado é cerca de 10 a 20 mg, havendo uma tolerância progressiva com o consumo continuado (Velea *et al.* 1999). Tem também sido sugerido que para doses entre 10-20 mg os efeitos da 2C-B se assemelham aos produzidos pela MDMA, enquanto os efeitos alucinogénios se verificam apenas para doses superiores a 30 mg

(Giroud *et al.* 1997). A duração de acção varia entre três a oito horas (Ragan *et al.* 1985; Velea *et al.* 1999).

2.2.4. Efeitos tóxicos

Os sintomas de intoxicação com a 2C-B estão associados a um estado de relaxamento e passividade sem sinais de estimulação (Ragan *et al.* 1985). Alguns relatos indicam que a 2C-B induz um estado de euforia acompanhada de um aumento das sensações tácteis, olfactivas, auditivas e visuais que podem ser muito intensas após a ingestão de doses muito elevadas (Ragan *et al.* 1985; Shulgin e Carter 1975).

Em doses elevadas, a 2C-B pode causar efeitos simpaticomiméticos incluindo taquicardia, hipertensão arterial e hipertermia (Velea *et al.* 1999).

Não existem relatos de ocorrência de intoxicações graves com a 2C-B, o que pode ser explicado pelas doses relativamente baixas em que é consumida (de Boer *et al.* 1999b). Por outro lado, a 2C-B não apresenta reactividade nos testes vulgarmente empregues para a detecção de anfetaminas em casos de intoxicação, pelo que estas intoxicações podem não ser detectadas e/ou associadas à ingestão de 2C-B (de Boer *et al.* 1999b).

2.2.5. Dependência

Não existem estudos em animais ou humanos que documentem o potencial de dependência da 2C-B.

Os alucinogénios não estão normalmente associados a um padrão de consumo compulsivo ou de dependência, existindo um potencial de abuso moderado, particularmente associado ao consumo de múltiplas drogas (WHO 2001).

2.2.5.1. Efeitos psicológicos

Em humanos, a 2C-B é mais potente do que a mescalina, mas menos potente do que a DOB. Em doses elevadas é um alucinogénio potente, produzindo alucinações visuais particularmente marcadas e sensação de distorção de formas e superfícies (Velea *et al.* 1999; WHO 2001). O uso da 2C-B está também conotado com o aumento da libido e do desempenho sexual (WHO 2001).

2.2.5.2. Prevalência e padrão de uso

No final da década de 1970 e durante a década de 1980 o consumo de 2C-B, apesar de documentado, era considerado restrito. Nos EUA este padrão mudou abruptamente no início da década de 1990 em que se registaram apreensões de elevadas quantidades de 2C-B na forma de comprimidos e cápsulas (WHO 1999). A informação que acompanhava estes comprimidos indicava tratar-se de uma substância "natural" e o seu uso recomendado como afrodisíaco, destinado a problemas do foro sexual. Outras apreensões registaram-se posteriormente noutros países incluindo, a Austrália, Canadá, Alemanha, Japão, República da Coreia e Reino Unido (WHO 1999).

A proibição da posse e venda da 2C-B contribuiu bastante para a diminuição da sua popularidade quer na Europa, quer no Japão, tendo sido no entanto substituída pela introdução dos compostos análogos 4-etiltio-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-T-2) e 4-propiltio-2,5-dimetoxifeniletilamina (2C-T-7) (de Boer e Bosman 2004; de Boer *et al.* 1999b; Katagi e Tsuchihashi 2002).

2.2.5.3. Contexto do uso

Para além do consumo por populações jovens em festas *rave*, a procura da 2C-B como substância afrodisíaca faz prever o seu consumo em locais privados e por uma população menos jovem do que a que consome a 2C-B no contexto das festas *rave* (Velea *et al.* 1999).

2.3. 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA)

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) foi sintetizada pela primeira vez em 1912 pela firma química alemã Merck, tendo sido patenteada em 1914. O objectivo da sua síntese seria a descoberta de uma nova molécula com actividade anoréctica (Hegadoren *et al.* 1999) ou como agente precursor para novos medicamentos (Green *et al.* 2003). No entanto, a MDMA nunca foi utilizada como tal e surgiu como droga de abuso muito mais tarde, no final da década de 1970. Em 1965 o químico Alexander Shulgin sintetizou a MDMA no laboratório onde durante décadas se dedicou à síntese de drogas de abuso psicoactivas, nomeadamente de feniletilaminas. O primeiro relato da actividade psicoestimulante da MDMA pertence a este autor (Shulgin e Nichols 1978). Durante as décadas de 1970 e 1980 a MDMA ganhou popularidade entre a comunidade psiquiátrica que advogava o seu uso como coadjuvante terapêutico ao aumentar a capacidade de introspecção e induzir sentimentos de confiança e empatia entre pacientes e terapeutas (Green *et al.* 2003). Esta propriedade resultou na classificação da MDMA como uma molécula pertencente a uma nova classe farmacológica, os "entactogénios" (do grego "contacto com o íntimo") (Nichols *et al.* 1986). No final da década de 1970, o consumo da MDMA como droga de abuso encontrava-se generalizado nos EUA. A sua semelhança estrutural com um composto dotado de neurotoxicidade, a MDA, resultou, em 1985, na colocação da MDMA na tabela I da Convenção de 1971 (Shulgin 1986), o que corresponde à classificação desta droga como uma substância com elevado potencial de abuso, sem utilizações clínicas reconhecidas e sem segurança aceitável, mesmo sob supervisão médica. Dada a controvérsia em torno do potencial terapêutico da MDMA, esta classificação foi temporariamente alterada com a colocação numa classe menos restritiva (tabela III), sendo por isso autorizado o seu uso sob supervisão médica. No entanto, em 1988, a MDMA voltaria a ser colocada na tabela I, classificação que se mantém presentemente.

Não obstante as restrições ao seu uso e comercialização, a MDMA adquiriu uma enorme popularidade como droga de abuso, nomeadamente nas faixas etárias mais jovens, a nível mundial. Os seus efeitos estimulantes, o aumento do estado de vigília, a indução de sensação de bem-estar e de sentimentos de confiança e empatia, a diminuição das inibições, associados a uma percepção falsa de inocuidade, são os responsáveis por esta popularidade que é apenas ultrapassada pela cannabis (Green *et al.* 2003).

2.3.1. Descrição da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA

2.3.1.1. Características físico-químicas

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (CAS 42542-10-9) é estruturalmente aparentada à *d*-anfetamina e à mescalina, o que lhe confere propriedades estimulantes e alucinogénias. É também conhecida como N-metil-3,4-metilenodioxianfetamina, N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-aminopropano, 3,4-methylenodioxi-N-α-dimetil-β-feniletilamina, α-dimetil-1,3,benzodioxol-5-etanamina, *ecstasy*, e vulgarmente designada pela abreviatura MDMA. Esta molécula tem o peso molecular de 193,25 unidades de massa atómica, apresenta um centro quiral, e pode existir na forma de dois enantiómeros distintos (S-(+)-MDMA e R-(-)-MDMA) e de racemato (Figura 5). Na literatura podem ser encontrados seis métodos diferentes para a síntese da MDMA (Shulgin 1986). Dependendo do procedimento utilizado, os compostos precursores da sua síntese incluem a MDA, safrole, isosafrole, piperonal e piperonil acetona. Outros reagentes usados na síntese da MDMA são o ácido bromídrico, metilamina, cloroformato de etilo, aluminoidreto de lítio, tetraidrofurano, cianoboroidreto de sódio, metanol, N-metilformamida, entre outros reagentes (Shulgin 1986). A MDMA na forma de base é um óleo incolor viscoso, com ponto de ebulição entre 100 e 110 ºC, solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em água. Na forma de sal (existem diferentes sais que podem ser formados por reacção com diferentes ácidos) pode apresentar-se no estado sólido (pó cristalino) ou óleo de cor branca, solúvel na água e de gosto amargo (Shulgin 1986).

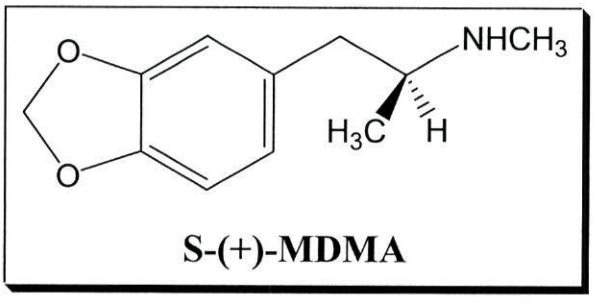


Figura 5. Estrutura química do enantiómero farmacologicamente mais activo da 3,4-metilenodioximetanfetamina, S-(+)-MDMA

Após reacção com o Reagente de Marquis a MDMA origina uma coloração negra com halo púrpura (Clarke's 2004). O espectro da MDMA no UV apresenta um

máximo de absorvância a 286 nm característico do grupo metilenodioxifenilo (Shulgin 1986). Para a identificação e/ou quantificação deste composto em comprimidos ou em amostras biológicas foram desenvolvidos vários métodos analíticos de elevada sensibilidade por GC/MS (Hensley e Cody 1999; Jurado *et al.* 2000; Marquet *et al.* 1997), HPLC/UV ou HPLC com detector de fluorescência (Clauwaert *et al.* 2000; Garrett *et al.* 1991; Soares *et al.* 2004; Tagliaro *et al.* 1999), ou ainda electroforese capilar com detecção por fluorescência (Fang *et al.* 2002).

2.3.1.2. Relação estrutura-actividade

A MDMA é uma feniletilamina com estrutura química semelhante à da *d*-anfetamina e da mescalina o que lhe confere uma actividade estimulante central moderada e efeitos alucinogénios observáveis apenas para doses muito elevadas (Glennon 1999).

Relativamente ao protótipo dos compostos anfetamínicos, a *d*-anfetamina, a presença do anel metilenodioxol aumenta a afinidade da MDMA para os locais serotonérgicos e diminui a afinidade para os receptores adrenérgicos do tipo α_2 (Green *et al.* 2003).

A maior parte dos derivados anfetamínicos (tendo como estrutura base a molécula da feniletilamina com diferentes substituintes) tem sido classificada como alucinogénio ou estimulante. A MDMA apresenta um comportamento distinto de ambas as classes (Nichols e Oberlender 1989). Com base nas propriedades psicoactivas da MDMA foi criada uma nova classe farmacológica para estes derivados anfetamínicos que não apresentam características unicamente dos alucinogénios ou dos psicoestimulantes e que têm a característica de aumentar a capacidade de introspecção e os sentimentos de empatia. Esta classe passaria a ser designada por entactogénios (Nichols e Oberlender 1989).

As principais características estruturais que diferem na MDMA relativamente aos derivados anfetamínicos com propriedades alucinogénias são (i) a substituição no anel aromático nas posições -3,4 comparativamente às substituições nas posições -3,4,5 ou -2,4,5 características dos derivados alucinogénios, (ii) a presença de um grupo metilo no grupo amina terminal (os derivados anfetamínicos alucinogénios mais potentes são

aminas primárias) e (iii) o estereoisómero mais activo da MDMA é o S-(+)-MDMA enquanto nos derivados anfetamínicos alucinogénios a potência do estereoisómero R-(-)- é maior (Nichols e Oberlender 1989).

Ao contrário de outros compostos igualmente classificados como entactogénios como, por exemplo, o análogo da MDMA com um substituinte α-etilo, 2-metilamino-1-(3,4-metilenodioxifenil)butano (MBDB), a MDMA apresenta características psicoestimulantes do tipo da *d*-anfetamina comprovadas por estudos de discriminação de drogas realizados em animais (Glennon 1999; Nichols e Oberlender 1989).

A presença do grupo metilo no carbono α da cadeia alifática impede a degradação da MDMA e dos seus análogos pela MAO, o que explica a acção mais potente das isopropilaminas relativamente aos análogos com estrutura de feniletilamina, que são preferencialmente metabolizados pela isoenzima MAO-B (Caldwell 1980).

2.3.1.3. Formas de apresentação e composição

A MDMA é traficada sob a forma de comprimidos de várias cores, formatos e tamanhos, decorados com uma vasta variedade de desenhos ou logótipos, destinados à ingestão oral (Green *et al.* 2003). Os nomes mais comuns pelos quais é designada no mercado de drogas ilícitas são: *ecstasy*, *XTC, E, Adam* e *droga do amor*. A sua utilização na forma de pó para dissolver em água é também conhecida (Ramsey *et al.* 2001).

Dado que se trata de uma droga sintetizada clandestinamente, a dose e o grau de pureza variam consideravelmente. Geralmente, os comprimidos contêm dosagens entre 80 mg e 150 mg de MDMA, tendo sido também encontradas dosagens superiores (até 250 mg por comprimido) (Green *et al.* 2003). Outros compostos presentes nos comprimidos incluem, compostos psicoactivos análogos da MDMA (presentes numa elevada percentagem dos comprimidos de *ecstasy*), cafeína, efedrina, pseudoefedrina, LSD, cocaína e heroína, ou ainda compostos que se destinam a exacerbar os efeitos pretendidos pelos utilizadores da MDMA (como por exemplo o dextrometorfano) (Baggott *et al.* 2000; Parrott 2004). Outros compostos encontrados em comprimidos de *ecstasy* incluem, a cetamina, paracetamol, atropina e salicilatos (Baggott *et al.* 2000; Parrott 2004). Uma vez que o termo *ecstasy* é muitas vezes utilizado para designar

outros compostos química e farmacologicamente aparentados, os consumidores da MDMA podem, inadvertidamente ou não, ingerir outras substâncias que não a MDMA mas que são comercializadas sob a mesma designação.

2.3.2. Farmacocinética

Ao nível farmacocinético os compostos anfetamínicos apresentam um comportamento muito homogéneo. Possuem elevada biodisponibilidade por via oral, elevado volume de distribuição (cerca de 4L/kg) e baixa percentagem de ligação às proteínas plasmáticas (menos de 20%). O tempo de semi-vida de eliminação oscila entre 6 e 12 h e a eliminação ocorre por via hepática e por via renal. Apesar de muitos destes compostos serem extensamente metabolisados a nível hepático, uma percentagem significativa da droga é geralmente excretada sem biotransformação (de la Torre *et al.* 2004a).

Uma vez que os derivados anfetamínicos são quimicamente compostos com características básicas, com valor de pKa aproximado a 9,9 e com peso molecular relativamente baixo, estes compostos atravessam facilmente as membranas das células e as camadas lipídicas, atingindo também os tecidos ou fluidos biológicos com pH mais acídico do que o sangue, incluindo a saliva e o suor (de la Torre *et al.* 2004a).

Abaixo descrevem-se as principais características farmacocinéticas avaliadas para a MDMA.

2.3.2.1. Absorção

A ingestão de MDMA é normalmente feita numa dose única de 100-200 mg (1,4-2,8 mg/kg), no entanto, muitos dos seus utilizadores fazem uma administração repetida da droga. O intervalo de tempo até ao início dos seus efeitos é de cerca de 30 minutos (entre 20 a 60 minutos), com um pico de efeito máximo entre 60 a 90 minutos após ingestão (Green *et al.* 2003). A duração de acção é de cerca de seis horas (Hegadoren *et al.* 1999). Os efeitos farmacológicos e as concentrações plasmáticas de

MDMA parecem seguir um perfil paralelo, com picos de concentração plasmática e de efeito farmacológico a ocorrerem entre 1 a 2 h após a ingestão e um declínio de ambos até aos valores basais durante um período de 4 a 6 h (Mas *et al.* 1999).

Na Tabela 2 resumem-se os parâmetros farmacocinéticos descritos para a MDMA após administração única a voluntários humanos por via oral (de la Torre *et al.* 2000a; Fallon *et al.* 1999; Helmlin *et al.* 1996; Mas *et al.* 1999; Navarro *et al.* 2001; Pizarro *et al.* 2004; Samyn *et al.* 2002; Verebey *et al.* 1988). A concentração plasmática máxima e a área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo após administração (obtida durante 24 h; AUC_{24}) aumentam de forma dependente da dose para as doses de 50, 75, 100 e 125 mg (de la Torre *et al.* 2000a; Mas *et al.* 1999). No entanto, para a dose de 150 mg, o aumento nos parâmetros farmacocinéticos da MDMA não foi proporcional à dose, o que sugere uma farmacocinética não linear para doses mais elevadas (de la Torre *et al.* 2000a). Esta observação pode ser explicada pela possível saturação das vias metabólicas e locais de ligação e pela interacção dos metabolitos com algumas das enzimas envolvidas nas vias metabólicas da MDMA (de la Torre *et al.* 2004a). Também a recuperação urinária de MDMA parece ser mais elevada para doses mais baixas, o que se enquadra numa farmacocinética não linear (de la Torre *et al.* 2004b).

Apesar de ser notória a grande variabilidade interindividual observada nos parâmetros farmacocinéticos descritos para a MDMA nos vários estudos efectuados, de um modo geral, após ingestão oral da MDMA, a concentração plasmática máxima atinge-se entre 1,5 e 3 h, tal como acontece para a maior parte dos derivados anfetamínicos (de la Torre *et al.* 2004a). O volume de distribuição aparente foi calculado em 452±137 L (após administração de uma dose de 125 mg) (de la Torre *et al.* 2004a), e os valores descritos para o tempo de semi-vida de eliminação, embora variando substancialmente entre os vários estudos efectuados, é de aproximadamente 8 a 9 h (de la Torre *et al.* 2004b).

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos da MDMA em humanos após administração de dose única

Dose (mg)	n	isómero	C_{max} (µg/L)	t_{max} (h)	AUC_{24} (µg*h/L)	Vd (L)	$T_{1/2\beta}$ (h)	CL_R (L/h)	Ae (%)	% dose excretada	Referência
50	1		105,6	2					65	72	(Verebey *et al.* 1988)
50	2		†(19,8-82,8)	(2-3)	(100,1-813,9)		(2,7-5,1)	(73,3-4,9)	(8,0-15,8)	(69,1-52,2)	(de la Torre *et al.* 2000a)
75	8		‡130,9±38,6	1,8±0,4	1331,5±646,0		7,7±3,2	12,8±5,6*	18,3±3,5	53,7±11,4	(de la Torre *et al.* 2000a; Mas *et al.* 1999)
75	12		‡178±52	2,0-4,0							(Samyn *et al.* 2002)
100	2		†(189,9-209,7)	(2-3)	(1447,8-2256,6)		(5,8-8,5)	(12,3-20,4)	(14,4-45,0)	(57,3-40,7)	(de la Torre *et al.* 2000a)
100	8		‡181,4±31,3	1,5	1598,6±733,3		7,2±1,4				(Navarro *et al.* 2001)
100	8		‡222,5±26,1	2,3±1,1			9,0±2,3				(de la Torre *et al.* 2004b)
100	4		‡181,6±24,5	1,9±0,2	1465,9±705,1		7,1±1,3		15,0		(Segura *et al.* 2001)
125	8		‡236,4±58,0	2,4±1,0	2623,7±572,9	452±137	8,6±3,2	13,0±5,4**	26,2±10,7	51,0±16,2	(de la Torre *et al.* 2000a; Mas *et al.* 1999)
150	2		†(441,9-486,9)	(1,5-2)	(5132,8-5232,0)		(6,9-7,2)	(5,2-11,3)	(20,6-43,0)	(37,3-54,7)	(de la Torre *et al.* 2000a)
1,5 (mg/kg)	2		331	2							(Helmlin *et al.* 1996)
40	8	(R)	‡33,7±14,9	4		383±97	5,8±2,2	10,5±2,9	21,4±11,6		(Fallon *et al.* 1999)
		(S)	‡21,2±10,8	2		595±204	3,6±0,9	10,2±3,4	9,3±4,9		
100	7	racemato	‡208,7±17,1	1,6±0,4	§3108,5±329,8		11,8±4,4		22		(Pizarro *et al.* 2004)
		(R)	‡116,7±14,3	3,5±2,2	§2158,8±297,5		14,8±9,2		16		
		(S)	‡88,8±17,0	1,9±0,5	§773,0±83,3		4,8±1,7		7		

C_{max}: concentração plasmática máxima; **t_{max}**: tempo ao fim do qual se atingiu a concentração plasmática máxima; **AUC_{24}**: área sob a curva da concentração plasmática de MDMA em função do tempo obtida nas primeiras 24h após administração da MDMA; **Vd**: volume de distribuição; **$T_{1/2\beta}$**: tempo de semi-vida de eliminação [na fase terminal da eliminação (fase β)]; **CL_R**: clearance renal; **Ae (%)**: quantidade de MDMA excretada na urina durante 24h expressa em % da dose ingerida.

† estudo efectuado com dois indivíduos (valores individuais);

‡ estudo efectuado com mais de dois indivíduos (média ± desvio padrão)

* valor para clearance total: 86,9±74,4 L/h e clearance não-renal: 74,0±71,1

** valor para clearance total: 51,1±14,1 L/h e clearance não-renal: 38,1±13,3

§ valor de AUC determinado nas primeiras 48h após administração da MDMA

A disposição da MDMA parece ser também estereoselectiva, uma vez que após administração oral de uma dose de MDMA na forma de racemato se observou que a concentração máxima plasmática do enantiómero R-(-)-MDMA era significativamente maior do que a do enantiómero S-(+) e que o enantiómero farmacologicamente mais activo S-(+)-MDMA era mais rapidamente eliminado (Fallon *et al.* 1999; Pizarro *et al.* 2004). Estas diferenças observadas para os enantiómeros da MDMA em humanos tinham sido já previamente descritas após administração de MDMA a ratos (Fitzgerald *et al.* 1990).

A aparente falta de proporcionalidade nas concentrações plasmáticas observadas relativamente às esperadas após a administração de doses elevadas de MDMA, aliada ao conhecimento geral de que uma grande parte dos indivíduos que consomem esta droga a ingerem em doses repetidas, faz antever uma potenciação séria dos riscos de toxicidade por ocorrência de concentrações plasmáticas anormalmente elevadas (de la Torre *et al.* 2004b). Os resultados obtidos num estudo clínico controlado em que foi administrada MDMA na dose de 100 mg em duas administrações separadas por um intervalo de 24 h a nove indivíduos, revelaram que, após a ingestão da segunda dose de MDMA, as concentrações plasmáticas atingidas não podiam ser explicadas pela simples acumulação da droga, indiciando fortemente um fenómeno de inibição metabólica com duração superior a 24 h (Farré *et al.* 2004). Estes mesmos autores estudaram posteriormente a influência do polimorfismo da enzima CYP2D6 nos parâmetros farmacocinéticos obtidos, genotipando os indivíduos que participaram no ensaio clínico e calculando os respectivos parâmetros farmacocinéticos de acordo com cada um dos genótipos para a enzima CYP2D6. Este estudo será por isso oportunamente discutido de forma mais detalhada. Os resultados obtidos em ambos os estudos estão representados na Tabela 3 (de la Torre *et al.* 2005).

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos da MDMA e metabolitos em voluntários humanos após administração de doses repetidas

	Dose (mg)	CYP2D6 genotype	n	AUC_{0-24} (μg*h/L)[a]	$C_{max-0-24}$ (μg/L)	$t_{max0-24}$ (h)	$t_{1/2-0-24}$ (h)	AUC_{24-48} (μg*h/L)	$C_{max-24-48}$ (μg/L)	$t_{max-24-48}$ (h)	$t_{1/2-24-48}$ (h)	AUC_{24-48}/ AUC_{0-24}	$C_{max-24-48}$/ $C_{max-0-24}$	Ref
MDMA	2*100		9	1452±771	180±33	2±0,26	7,0±2,2	2564±762	232±39	25,5±0,33	8,8±1,5	1,77	1,29	(Farré *et al.* 2004)
MDA				157±55	11±3	4±6,88	12,8±2,9	259±81	15±4	28±2,71	14,1±3,4	1,64	1,4	
MDMA	2*100	*1/*1	6	955,6±243,8	163,3±26,3	1,75±0,27	6,0±1,98	2215,7±650,3	214,2±29,9	25,5±0,32	8,1±1,5	2,3	1,3	(de la Torre *et al.* 2005)
MDMA		*1/*4	3	2446,0±94,8	214,3±9,3	2,0±0,29	9,1	3261,3±414,2	269,1±30,8	25,5±0,29	10,1±0,52	1,3	1,3	
MDMA		*4/*4	1	3113,9	256,8	2,0	8,7	4256,4	327,2	25,75	14,2	1,4	1,3	
HHMA		*1/*1	3	2065,9±752,3	200,4±95,7	1,0±0,29	9,4±1,56	1580,9±829,6	170,3±85,1	25,5±1,61	10,4±2,70	0,8	0,85	
HHMA		*1/*4	1	1664,3	104,1	1,0	25,5	1696,6	95,0	24,66	35,1	1,02	0,9	
HHMA		*4/*4	1	1063,4	79,8	3,0	15,1	924,4	65,2	26,0	19,5	0,9	0,8	
HMMA		*1/*1	6	3230,1±428,3	362,1±122,7	1,75±0,68	8,3±1,96	2304,0±382,2	158,6±38,4	26,5±0,92	20,7±13,06	0,7	0,4	
HMMA		*1/*4	3	2033,8±268,7	182,6±18,4	1,88	12,7±1,81	1545,6±153,2	106,0±12,9	26,75±0,58	14,9±2,85	0,76	0,6	
HMMA		*4/*4	1	393,2	57,6	2,0	14,8	345,9	44,5	26,88	15,0	0,88	0,8	

AUC_{0-24}: área sob a curva da concentração plasmática de MDMA em função do tempo obtida nas primeiras 24h após a primeira administração da MDMA; **AUC_{24-48}**: área sob a curva da concentração plasmática de MDMA em função do tempo nas primeiras 24h após a segunda administração da MDMA; **$t_{max0-24}$**: tempo ao fim do qual se atingiu a concentração plasmática máxima após a primeira administração da MDMA; **$C_{max-0-24}$**: concentração plasmática máxima após a primeira administração da MDMA; **$C_{max-24-48}$**: concentração plasmática máxima após a segunda administração da MDMA; **$t_{max24-48}$**: tempo ao fim do qual se atingiu a concentração plasmática máxima após a segunda administração da MDMA; **$t_{1/2-0-24}$**: tempo de semi-vida de eliminação determinado após a primeira administração da MDMA; **$t_{1/2-24-48}$**: tempo de semi-vida de eliminação determinado após a segunda administração da MDMA

2.3.2.2. Distribuição

As anfetaminas têm em geral uma baixa taxa de ligação às proteínas plasmáticas, sendo este valor geralmente inferior a 20%, o que se traduz numa grande distribuição destes compostos que difundem facilmente do plasma para o compartimento extravascular (de la Torre *et al.* 2004a).

Os estudos *post-mortem* permitem avaliar a distribuição da MDMA em humanos. No entanto, as doses de MDMA ingeridas e as respectivas concentrações plasmáticas atingidas em intoxicações fatais são muito superiores às encontradas nos casos clínicos acima descritos que reproduzem as doses e concentrações esperadas no uso recreativo de MDMA. Na Tabela 4 resumem-se os resultados encontrados em vários estudos representativos. Dos dados apresentados pode ser observado que a MDMA se acumula em muitos tecidos e órgãos onde atinge concentrações muito superiores às concentrações plasmáticas, podendo ser até 18 vezes superiores no fígado (de Letter *et al.* 2004; de Letter *et al.* 2006) e 30 vezes superiores no cérebro (Garcia-Repetto *et al.* 2003).

Os valores apresentados na Tabela 4 e na Tabela 5 evidenciam a notória variabilidade interindividual nas concentrações que a MDMA atinge no sangue e nos vários tecidos.

Tabela 4. Concentrações de MDMA encontradas no sangue e em vários tecidos determinadas após autópsia em intoxicações fatais

Sangue	**Fígado**[b]		**Rim**[b]		**Cérebro**[b]		**Bile**[b]		**Pulmão**[b]		**Coração**[b]		
mg/L (μM)	μg/g	Razão vs sangue	μg/g	Razão vs sangue	μg/g	Razão vs sangue	mg/L	Razão vs sangue	μg/g	Razão vs sangue	μg/g	Razão vs sangue	Referência
2,8[a] (14,5)	20,2	**7,2**			13,7	**4,9**							(Rohrig e Prouty 1992)
0,58[a] (2,99)	1,8	**3,1**											
0,18 (0,96)	13,23	**71,5**	9,82	**53,1**	12,79	**69,2**	27,34	**147,8**	10,7	**57,9**			(Fineschi e Masti 1996)
2,9 (14,9)	6,4	**2,2**					73	**25,2**					(Moore *et al.* 1996)
3,10 (16,0)	26,20	8,5	13,0	**4,2**	15,6	**5,0**	14,2	**4,6**	13,0	**4,2**	14,0	**4,5**	(de Letter *et al.* 2002)
3,18 (16,5)	4,86	**1,5**					1,41	**0,4**					(Garcia-Repetto *et al.* 2003)
0,28 (1,45)	5,13	**18,3**			8,42	**30,1**	1,23	**4,4**	2,64	**9,4**			
0,17[§] (0,88)	0,18		0,05		0,14				1,46				
1,13 (5,8)	6,66	**5,9**	4,06	**3,6**	2,25	**2,0**	25,42	**22,5**	10,9	**2,2**	1,73	**1,5**	(Dams *et al.* 2003)
7,2* (37,3)	29,7	**4,1**			29,1	**4,0**			36,6	**5,1**			(Sticht *et al.* 2003)
0,271 (1,4)	4,87	**17,9**	1,44	**5,3**	0,69	**2,5**	22,07	**81,4**	3,62	**13,4**	0,38	**1,4**	(de Letter *et al.* 2004)
13,51 (70)	103,5	**7,7**	111,9	**8,3**			86,95	**6,4**	101,2	**7,5**	140,1	**10,4**	

* mg/kg
§ determinada antes da morte
[a] valores determinados em sangue periférico (femoral)
[b] quando determinadas as concentrações em diferentes porções do tecido foi calculado o valor médio dessas concentrações

Tabela 5. Concentrações de MDMA encontradas no sangue em estudos clínicos e intoxicações fatais e não fatais

		Concentração sanguínea MDMA (μg/L)		Estudo	Referência
Dose	Nº de comprimidos		*post-mortem*		
50*		105,6		Estudo clínico	(Verebey *et al.* 1988)
50*†		(19,8-82,8)		Estudo clínico	(de la Torre *et al.* 2000a)
75*‡		130,9±38,6		Estudo clínico	(de la Torre *et al.* 2000a; Mas *et al.* 1999)
75*‡		178±52		Estudo clínico	(Samyn *et al.* 2002)
100*†		(189,9-209,7)		Estudo clínico	(de la Torre *et al.* 2000a)
100*‡		181,4±31,3		Estudo clínico	(Navarro *et al.* 2001)
100*‡		222,5±26,1		Estudo clínico	(de la Torre *et al.* 2004b)
100*‡		208,7±17,1		Estudo clínico	(Pizarro *et al.* 2004)
125*‡		236,4±58,0		Estudo clínico	(de la Torre *et al.* 2000a; Mas *et al.* 1999)
150*†		(441,9-486,9)		Estudo clínico	(de la Torre *et al.* 2000a)
	4	230		Intoxicação não fatal	(Greene *et al.* 2003)
	5	350		Intoxicação não fatal	
	2	250		Intoxicação não fatal	
	2	130		Intoxicação não fatal	
	1	< 100		Intoxicação não fatal	
100-150		§7000		Intoxicação não fatal	(Brown e Osterloh 1987)
	50	§R (-) 44000 S-(+) 42000		Intoxicação não fatal	(Ramcharan *et al.* 1998)
	42	7720		Intoxicação não fatal	(Randall 1992)
	18	4050		Intoxicação não fatal	(Roberts e Wright 1993)
			1100	Intoxicação fatal	(Dowling *et al.* 1987)
150	1,5		1000	Intoxicação fatal	
	1		424	Intoxicação fatal	(Chadwick *et al.* 1991)
			2000	Intoxicação fatal	(Suarez e Riemersma 1988)
		2400		Intoxicação fatal	(Greene *et al.* 2003)
		930		Intoxicação fatal	
			2800[a]	Intoxicação fatal	(Rohrig e Prouty 1992)
			580[a]	Intoxicação fatal	
			180	Intoxicação fatal	(Fineschi e Masti 1996)

Tabela 5 (cont). Concentrações de MDMA encontradas no sangue em estudos clínicos e intoxicações fatais e não fatais

Dose	Nº de comprimidos	Concentração sanguínea MDMA (μg/L)	Estudo	Referência
		post-mortem		
		2900	Intoxicação fatal	(Moore *et al.* 1996)
		3100[a]	Intoxicação fatal	(de Letter *et al.* 2002)
	1090	3180	Intoxicação fatal	(Garcia-Repetto *et al.* 2003)
	40	280	Intoxicação fatal	
	170		Intoxicação fatal	
		1130[a]	Intoxicação fatal	(Dams *et al.* 2003)
		7200[a] **	Intoxicação fatal	(Sticht *et al.* 2003)
		271[b]	Intoxicação fatal	(de Letter *et al.* 2004)
		13510[a]	Intoxicação fatal	

Cmax
§ aproximadamente 4 h após ingestão
† estudo efectuado com dois indivíduos (valores individuais)
‡ estudo efectuado com mais de dois indivíduos (média ± desvio padrão)
** mg/kg
[a] valores determinados em sangue periférico (femoral)
[b] valores determinados em sangue subclaviano

2.3.2.3. Metabolismo

O metabolismo da MDMA no Homem encontra-se bem documentado e tem sido alvo de revisões recentes (de la Torre *et al.* 2004a; de la Torre *et al.* 2004b; Kraemer e Maurer 2002). Os primeiros estudos de metabolismo da MDMA foram realizados por Lim e Foltz em 1988. Estes autores caracterizaram o metabolismo da MDMA *in vivo* e *in vitro* no rato, tendo identificado as quatro principais vias metabólicas para a MDMA nesta espécie, nomeadamente, (i) N-desmetilação, (ii) O-desalquilação (desmetilenação), (iii) desaminação e (iv) conjugação por metilação, glucuronidação ou sulfonação (Lim e Foltz 1988). Estes mesmos autores, em 1989, viriam a identificar as mesmas vias metabólicas em humanos (Lim e Foltz 1989). Na Figura 6 estão esquematizadas as vias metabólicas da MDMA. O metabolismo da MDMA apresenta duas vias principais: (i) a abertura do anel metilenodioxol, seguindo-se a metilação de

um dos grupos hidroxilo resultantes e/ou a conjugação com o ácido glucurónico ou com o anião sulfonato (de la Torre *et al.* 2004a; de la Torre *et al.* 2000a; Lim e Foltz 1989; Maurer *et al.* 2000) e (ii) a desalquilação do grupo amina com formação da 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) que retém acção biológica (Johnson *et al.* 1988). A subsequente desaminação e oxidação da cadeia lateral leva à formação de fenilcetonas posteriormente oxidadas a derivados do ácido benzóico (Maurer 1996) que são posteriormente conjugados com a glicina e excretados na forma de derivados do ácido hipúrico (hipuratos) (de la Torre *et al.* 2004b). A abertura do anel metilenodioxol da MDMA e da MDA dá origem a dois metabolitos de estrutura catecólica, a N-metil-α-metildopamina (N-Me-α-MeDA) e a α-metildopamina (α-MeDA), respectivamente, sendo esta a principal via metabólica no rato e no Homem (Maurer *et al.* 2000). Ambos são subsequentemente metilados pela enzima catecol-*O*-metiltransferase (COMT), preferencialmente no grupo hidroxilo da posição 4 do anel aromático. Estes metabolitos monometilados estão maioritariamente presentes no plasma e urina na forma de conjugados com o ácido glucurónico ou com o anião sulfonato (de la Torre *et al.* 2000a; de la Torre *et al.* 2000b; Kraemer e Maurer 2002; Maurer 1996). A presença do grupo catecol confere elevada reactividade a estes metabolitos que facilmente se oxidam, originando as respectivas *o*-quinonas (Cho *et al.* 1999). A oxidação das quinonas pode também originar a formação de aminocromos (Bindoli *et al.* 1992) cuja subsequente oxidação leva à produção de polímeros do tipo da melanina (Zhang e Dryhurst 1994).

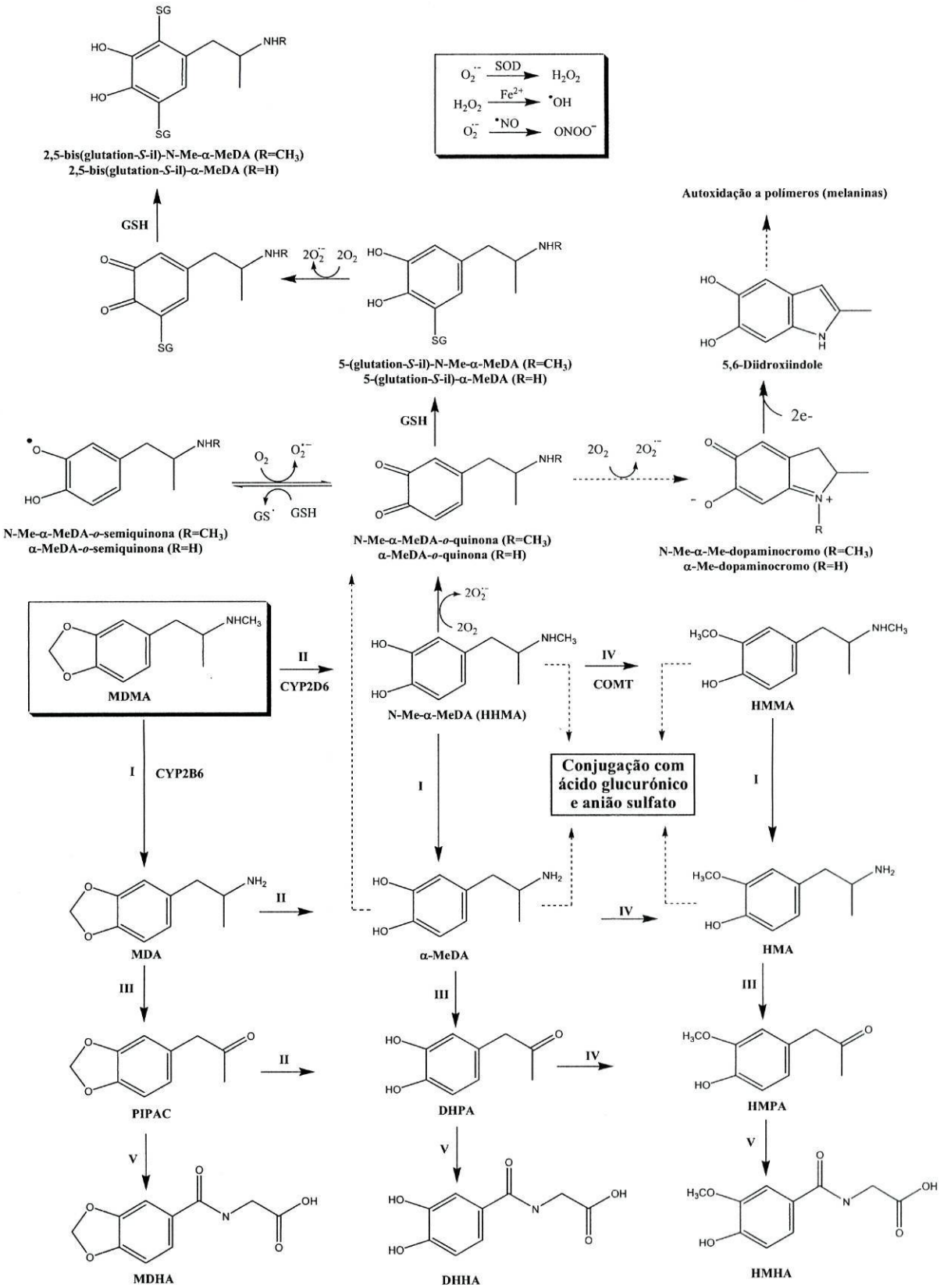


Figura 6. Esquema das vias metabólicas da MDMA. I, N-desmetilação; II, desmetilenação; III, desaminação oxidativa; IV, O-metilação; V, conjugação com a glicina; MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDA, 3,4-metilenodioxianfetamina; N-Me-α-MeDA ou HHMA, N-metil-α-metildopamina ou dihidroximetanfetamina; α-MeDA, α-metildopamina; HMMA, hidroximetoximetanfetamina; HMA, hidroximetoxianfetamina; PIPAC, piperonilacetona; MDHA, ácido 3,4-metilenodioxihipúrico; DHPA, 3,4-diidroxifenilacetona; DHHA, ácido 3,4-diidroxihipúrico; HMPA, 4-hidroxi-3-metoxifenilacetona; HMHA, ácido 4-hidroxi-3-metoxihipúrico.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

Os ciclos de oxidação-redução (REDOX) associados a esta conversão metabólica (Colado *et al.* 1997) resultam na formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) que, tal como as quinonas, podem atacar grupos nucleófilos intracelulares importantes como, por exemplo, a cisteína, a glutationa (GSH) e grupos sulfidrilo proteicos, resultando na alteração de macromoléculas importantes, incluindo proteínas, lípidos e DNA (Bindoli *et al.* 1992; Bolton *et al.* 2000). Estes metabolitos de estrutura quinónica podem conjugar-se com uma molécula de GSH formando um aducto que pode ainda conjugar-se com uma nova molécula de GSH num processo que é também acompanhado da formação de ROS e RNS (Hiramatsu *et al.* 1990; Monks *et al.* 2004). A formação dos conjugados catecólicos com a glutationa foi demonstrada *in vitro* em microssomas de fígado humano, tendo sido igualmente demonstrado neste estudo que um dos aductos resultantes desta biotransformação, o aducto 5-(glutation-S-il)-α-MeDA, tem actividade no SNC do rato após administração intracerebral (Easton *et al.* 2003). Por outro lado, a administração intracerebral destes aductos demonstrou produzir uma depleção significativa dos níveis de serotonina em diferentes regiões cerebrais no rato, podendo por isso estar envolvidos na neurotoxicidade da MDMA (Bai *et al.* 1999; Miller *et al.* 1997). Mais recentemente foi demonstrada a produção *in vivo* dos conjugados dos metabolitos catecólicos da MDMA com a GSH no cérebro de ratos aos quais foi administrada MDMA por injecção subcutânea (Jones *et al.* 2005). Neste mesmo estudo foi também demonstrada a neurotoxicidade serotonérgica mediada por estes metabolitos (Jones *et al.* 2005).

Vários estudos *in vitro* têm contribuído para a caracterização da toxicidade dos metabolitos da MDMA, demonstrando que a bioactivação metabólica da MDMA tem um papel importante na expressão da sua toxicidade ao nível neuronal (Capela *et al.* 2006a; Gollamudi *et al.* 1989; Patel *et al.* 1991), hepático (Carvalho *et al.* 2004a; Carvalho *et al.* 2004b), renal (Carvalho *et al.* 2002b) e cardíaco (Carvalho *et al.* 2004c).

Estudos *in vivo* no rato revelaram uma terceira via metabólica que consiste numa hidroxilação aromática com formação de triidroxianfetaminas (triidroxianfetamina e triidroximetanfetamina) que são compostos dotados de elevada neurotoxicidade (Lim e Foltz 1991; Zhao *et al.* 1992).

As isoenzimas do sistema enzimático citocromo P450 têm um papel preponderante na metabolização da MDMA ao catalizar quer a abertura do anel metilenodioxol (desmetilenação) com formação da N-Me-α-MeDA e α-MeDA, quer a N-desmetilação da MDMA a MDA. A desmetilenação da MDMA *in vitro* apresenta

uma cinética de Michaelis-Menten bifásica composta por uma componente de elevada afinidade e outra de baixa afinidade (Kreth *et al.* 2000). A componente de baixa afinidade é catalizada pela enzima CYP2D6, enquanto que a componente de elevada afinidade é maioritariamente catalizada pela isoenzima CYP1A2 e em menor grau pelas isoenzimas CYP2B6 e CYP3A4 (Kreth *et al.* 2000; Maurer *et al.* 2000; Tucker *et al.* 1994). A contribuição da CYP2D6 para a desmetilenação da MDMA *in vitro* foi avaliada em cerca de 50% em fígado humano e microssomas que expressam a CYP2D6 (Ramamoorthy *et al.* 2002; Tucker *et al.* 1994) e em cerca de 30% quando avaliada *in vivo* em humanos (Segura *et al.* 2005). A velocidade de desmetilenação catalizada pela CYP2D6 é superior para o isómero S-(+)-MDMA relativamente ao isómero R-(-)-MDMA (Lin *et al.* 1997). A reacção de desmetilenação pode também ocorrer sem catálise enzimática por um processo de oxidação espontânea que envolve o radical hidroxilo (Kumagai *et al.* 1991; Lin *et al.* 1992; Maurer *et al.* 2000). No rato esta reacção é catalizada pelas isoenzimas CYP2D1 e CYP3A2 (Maurer *et al.* 2000). A velocidade da N-desmetilação é cerca de uma ordem de magnitude inferior à da desmetilenação e caracteriza-se por uma cinética monofásica catalizada no Homem pela enzima CYP2B6 com contribuição das isoenzimas CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4 e no rato pelas isoenzimas CYP1A2 e CYP2D1 (Kreth *et al.* 2000; Maurer *et al.* 2000).

Na Tabela 6 resumem-se os parâmetros farmacocinéticos dos metabolitos da MDMA determinados após a administração de MDMA em humanos.

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos dos metabolitos da MDMA após administração em humanos

Metabolito	Dose MDMA (mg)	n	isómero	C_{max} (µg/L)	t_{max} (h)	AUC_{24} (µg*h/L)	$T_{1/2}$ (h)	Ae (%)	Referência
MDA	50	1		28,4	4			7	(Verebey *et al.* 1988)
MDA	50	1		5,1	6	51,1	5,6	0,54	(de la Torre *et al.* 2000a)
HMMA		2						34,4-58,7	
HMA		2						1,6-1,8	
MDA	75	8		7,8±2,5	5,1±2,6	122,3±66,7	16,1±18,3	0,9±0,2	(de la Torre *et al.* 2000a)
HMMA		8						33,1±5,6	
HMA		8						1,4±0,1	
MDA	100	2		22,4-14,2	6-4	345,4-61,5	6,3-6,4	0,27-1,1	(de la Torre *et al.* 2000a)
HMMA								11,5-23,9	
HMA								0,6-1,3	
MDA	100	8		13,1±4,5	6,7±2,6		24,9±14,5	1,5±0,6	(de la Torre *et al.* 2004b)
HHMA		8		154,5±76,6	1,2±0,3		13,4±8,1	17,7±4,6	
HMMA		8		236,7±87,1	2,3±0,9		11,2±2,9	22,7±7,7	
HMA		8		7,5±4,0	8,2±1,7		37,4±17,9	1,35±0,3	
MDA	125	8		13,7±1,6	7,1±2,8	215,2±68,5	27,7±26,0	0,99±0,4	(de la Torre *et al.* 2000a)
HMMA								22,9±15,9	
HMA								0,96±0,6	
MDA	150	2		34,2-31,4	4-10	590,0-373,9	37,3-23,2	0,3-0,6	(de la Torre *et al.* 2000a)
HMMA								15,7-10,6	
HMA								0,53-0,48	
MDA	1,5 (mg/kg)	2		15	6,3				(Helmlin *et al.* 1996)

Tabela 6 (cont). Parâmetros farmacocinéticos dos metabolitos da MDMA após administração em humanos

Metabolito	Dose MDMA (mg)	n	isómero	C_{max} (µg/L)	t_{max} (h)	AUC_{24} (µg*h/L)	$T_{1/2}$ (h)	Ae (%)	Referência
HMMA	100	4		307,1±85,5	2,0±0,0	3190,9±714,5	8,3±1,3	22,7	(Segura *et al.* 2001)
HHMA	100	4		154,5±76,6	1,2±0,3	1990,94±647,1	13,4±8,1	17,7	
MDA	40	8	(R)	1,0±0,3				1,0±0,3	(Fallon *et al.* 1999)
			(S)	3,0±1,1				1,4±0,5	
MDA	100	7	racemato	13,0±2,3	6,6±1,9	§308,4±73,1	17,7±6,2		(Pizarro *et al.* 2004)
HMMA	100	7	racemato	163,8±71,4	2,8±0,8	§2293,2±881,5	10,4±2,4		
			(R)	65,5±26,1	2,9±0,7	§868,9±453,3	13,5±4,1		
			(S)	62,1±21,6	2,6±0,6	§585,3±216,6	5,9±1,0		
HHMA	100	7	(R)	38,9±12,4	2,4±1,9	§653,5±22,2	42,6±56,3		
			(S)	90,9±38,8	2,3±1,8	§999,2±459,0	7,9±2,7		

§ valor de AUC determinado nas primeiras 48h após administração da MDMA

C_{max}: concentração plasmática máxima; **t_{max}**: tempo ao fim do qual se atingiu a concentração plasmática máxima; **AUC_{24}**: área sob a curva da concentração plasmática de MDMA em função do tempo obtida nas primeiras 24h após administração da MDMA; **$T_{1/2}$**: tempo de semi-vida de eliminação; **Ae (%)**: quantidade excretada na urina durante 24h expressa em % da dose ingerida.

2.3.2.4. Excreção

O tempo de semi-vida plasmática das anfetaminas depende, em grande parte, da acidez da urina dado que a excreção renal é a principal via de eliminação. Uma vez que estes compostos são quimicamente bases fracas, a excreção renal aumenta com a acidificação e diminui com a alcalinização da urina. Por este motivo existe uma grande variabilidade na semi-vida de eliminação e muitas vezes os consumidores de anfetaminas ingerem bicarbonato para prolongar o efeito destas drogas. Os derivados anfetamínicos do tipo da MDMA (com o substituinte metilenodioxol no anel aromático) sofrem uma metabolização mais extensa do que as anfetaminas protótipo e a quantidade excretada na urina sem biotransformação é por isso menor (de la Torre *et al.* 2004a). O tempo de semi-vida da eliminação da MDMA varia entre 6 e 9 h (de la Torre *et al.* 2004a; Mas *et al.* 1999; Ramcharan *et al.* 1998), sendo a maior parte da dose excretada nas primeiras 24 h após ingestão (Fallon *et al.* 1999).

Cerca de 80% da MDMA é eliminada após metabolização hepática e cerca de 20% da dose é excretada sem biotransformação na urina (de la Torre *et al.* 2004a). A eliminação urinária da MDMA para diferentes doses parece ser constante (recuperação urinária de cerca de 60% independentemente da dose administrada) (de la Torre *et al.* 2004a) enquanto que a eliminação não-renal é dependente da dose (de la Torre *et al.* 2000a). Após administração de uma dose de 75 mg de MDMA, por via oral, observou-se uma taxa de eliminação não renal de 74,0±71,1 L/h enquanto que a mesma taxa para a administração de uma dose de 125 mg foi de 38,1±13,3 L/h (de la Torre *et al.* 2000a) (ver Tabela 2). Tal como foi já referido, isto sugere uma inibição do metabolismo hepático para doses elevadas de MDMA. Para concentrações elevadas a MDMA actua como inibidor competitivo da CYP2D6 em microssomas de fígado humano (Wu *et al.* 1997). Esta inibição ocorre por formação de um complexo com a enzima (Heydari *et al.* 2004). A formação destes complexos envolve a formação de um carbeno por oxidação de substratos contendo um grupo amina terciário ou um substituinte metilenodioxol (Delaforge *et al.* 1999). A MDMA tem a particularidade de possuir ambos os grupos na sua molécula (Delaforge *et al.* 1999). Esta inibição pode ocorrer dentro do período de uma hora após a ingestão de MDMA (doses vulgarmente utilizadas para fins recreativos) e os valores basais de actividade enzimática podem apenas ser repostos após um período de pelo menos 10 dias (Yang *et al.* 2006).

O principal metabolito excretado na urina é o derivado mono metilado da N-Me-α-MeDA, a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (>20% da dose), seguido do metabolito catecólico N-Me-α-MeDA (Segura *et al.* 2001). Estes metabolitos são excretados maioritariamente na forma de conjugados glucuronatos ou sulfatos (Helmlin *et al.* 1996). A excreção urinária de MDA representa menos de 10% da dose de MDMA ingerida (Mas *et al.* 1999).

Para além da excreção urinária a MDMA pode também ser excretada por via biliar, sendo igualmente detectada no suor, saliva, humor vítreo, cabelo e unhas, que por isso constituem matrizes alternativas ao sangue e urina para detecção da exposição à MDMA para concentrações relativamente elevadas (de la Torre *et al.* 2004a; Samyn *et al.* 2002).

A eliminação da MDMA é também estereoselectiva, sendo o isómero farmacologicamente mais activo, S-(+)-MDMA, mais rapidamente metabolizado e excretado do que o isómero R-(-)-MDMA (Fallon *et al.* 1999; Meyer *et al.* 2002; Moore *et al.* 1996; Ramcharan *et al.* 1998).

2.3.3. Mecanismos de acção e efeitos biológicos

2.3.3.1. Efeitos na libertação, transporte e receptores das monoaminas neurotransmissoras

A MDMA é um composto simpaticomimético de acção indirecta com mecanismo de acção farmacológica semelhante ao das restantes anfetaminas. Esta acção resulta da indução da libertação dos neurotransmissores simpáticos a partir das vesículas dos terminais nervosos e da medula suprarenal, nomeadamente da serotonina e das catecolaminas noradrenalina, adrenalina e dopamina. Estes neurotransmissores activam os respectivos receptores, resultando numa exacerbação da estimulação simpática que é dependente da dose administrada e da via de administração (Figura 7).

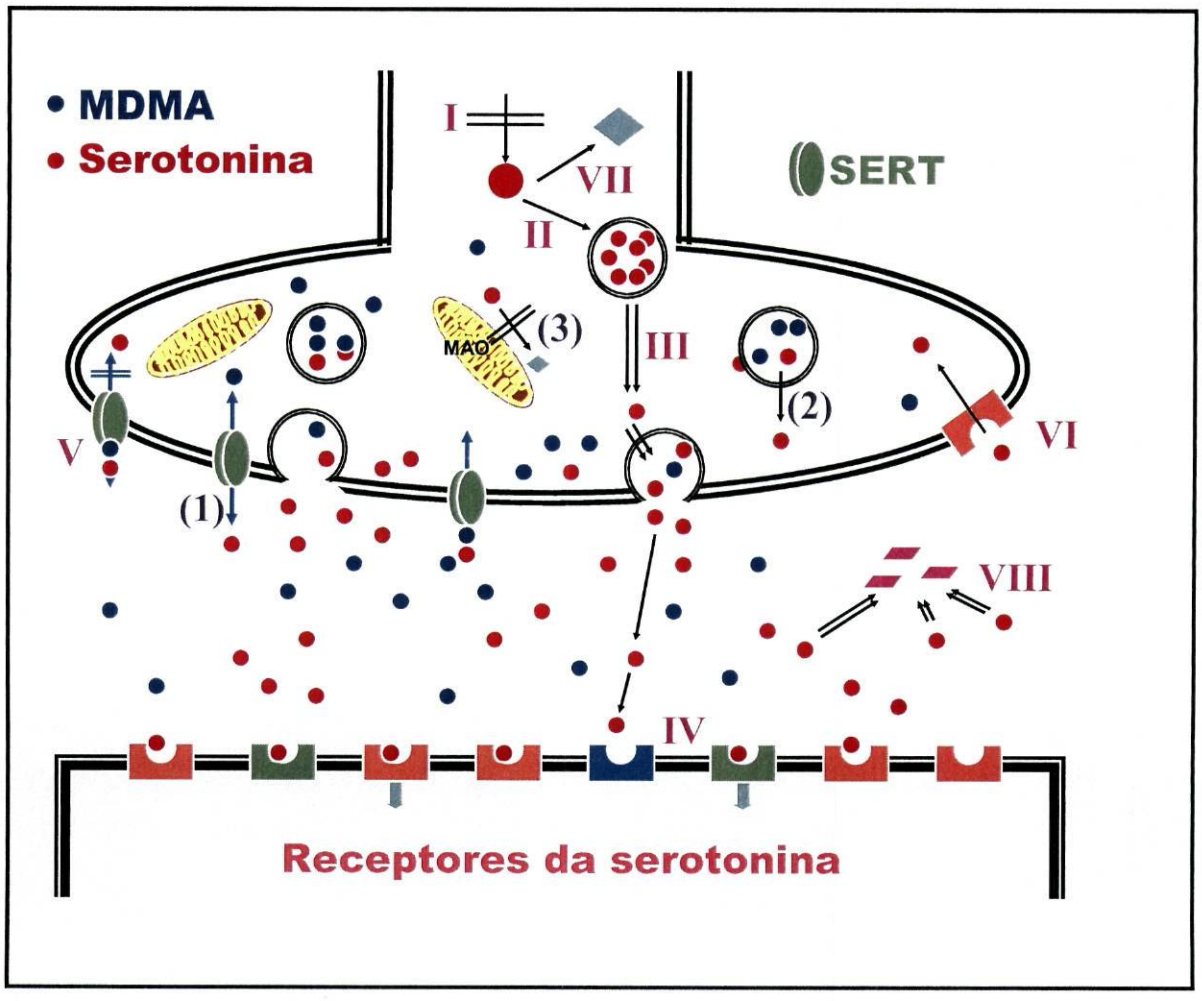


Figura 7. Mecanismo da acção biológica da MDMA ao nível dos neurónios serotonérgicos. A MDMA promove a libertação da serotonina por permuta ao nível do transportador (SERT) **(1)**. Para concentrações mais elevadas a MDMA penetra nas vesículas sinápticas e promove o efluxo de serotonina **(2)**. O aumento da serotonina deve-se também à inibição da degradação metabólica do neurotransmissor pela MAO ao nível da mitocôndria **(3)**. **I**, inibição da biossíntese da serotonina; **II**, armazenamento da serotonina nas vesículas; **III**, estimulação da libertação da serotonina na fenda sináptica; **IV**, estimulação dos receptores pós-sinápticos; **V**, inibição do sistema de captação neuronal da serotonina; **VI**, auto-regulação da libertação da serotonina pelos receptores pré-sinápticos; **VII**, metabolismo da serotonina; **VIII**, aumento da formação de metabolitos e produtos de auto-oxidação da serotonina. As setas duplas indicam um efeito de estimulação enquanto as setas cortadas indicam um efeito de inibição.

A MDMA induz preferencialmente a libertação de serotonina tanto *in vivo* (Mechan *et al.* 2002; Sabol e Seiden 1998; Yamamoto *et al.* 1995) como *in vitro* (Berger *et al.* 1992; Crespi *et al.* 1997; Nichols *et al.* 1982). A ligação da MDMA ao transportador pré-sináptico da serotonina (SERT) inibe a recaptação neuronal da serotonina e aumenta a libertação de serotonina por permuta com a MDMA, por um processo designado por difusão por permuta (Rudnick e Wall 1992; Simantov 2004). Como consequência do transporte da MDMA para o interior do neurónio, o transportador fica disponível na superfície interna da membrana para se ligar à serotonina e transportá-la para o espaço sináptico (Rudnick e Wall 1992). Ao contrário

do que acontece com a libertação exocítica das catecolaminas induzida por impulsos nervosos, este processo é independente do Ca^{2+} e é bloqueado pelos inibidores do sistema de captação neuronal da serotonia (como por exemplo a fluoxetina e a imipramina) (Rudnick e Wall 1992). A serotonina libertada deve ser rapidamente removida da sinapse para manter o controlo da neurotransmissão. Uma vez que o SERT está bloqueado pela MDMA a serotonina acumula-se na fenda sináptica onde será degradado ou captado por outros transportadores, como por exemplo os transportadores da dopamina (Simantov 2004).

Em concentrações baixas a MDMA inibe a captação vesicular da serotonina, sendo estes efeitos estereoselectivos, com maior potência do enantiómero S-(+)-MDMA (Gudelsky e Nash 1996; Nichols *et al.* 1982). Em concentrações elevadas a MDMA pode penetrar nas vesículas sinápticas por um processo de difusão passiva (Green *et al.* 2003). Uma vez no interior destas vesículas, e dado que quimicamente a MDMA se comporta como uma base fraca, o consequente aumento do pH dentro das vesículas sinápticas promove o efluxo da serotonina, dado que esta é mantida no interior das vesículas através de um gradiente de protões que é regulado por uma bomba de protões dependente do ATP (Rudnick e Wall 1992).

O aumento da libertação de serotonina activa os receptores pré- e pós-sinápticos e induz uma série de vias intracelulares (por exemplo, a via da adenilato ciclase) resultando na activação de múltiplos sistemas intracelulares e nos subsequentes efeitos neuroquímicos e moleculares (Simantov 2004).

Os estudos realizados para a avaliação da afinidade da MDMA para os transportadores das monoaminas neurotransmissoras apresentam resultados muito discrepantes. No rato, foi descrita uma afinidade da MDMA para o local de captação serotonérgico cerca de 40 vezes superior à sua afinidade para o local de captação dopaminérgico e 26 vezes superior à sua afinidade para o local de captação noradrenérgico (Battaglia *et al.* 1988a). Estudos mais recentes nesta mesma espécie indicam uma mesma ordem de afinidades, mas a afinidade da MDMA para o transportador da serotonina era apenas sete vezes superior à registada para o transportador da dopamina (Rothman e Baumann 2003). Estudos *in vitro* recentes para a avaliação da afinidade da MDMA para os transportadores da serotonina, dopamina e noradrenalina humanos indicam que, ao contrário do que acontece no rato, a MDMA apresenta uma maior afinidade para o transportador da noradrenalina e menor afinidade para o transportador da serotonina e da dopamina (Han e Gu 2006). A afinidade para os

transportadores da serotonina e da dopamina humanos parecem ser muito semelhantes (Verrico *et al.* 2005). No entanto, a capacidade da MDMA em induzir a libertação de serotonina em células que expressam o seu transportador é maior do que a registada para a libertação de dopamina e noradrenalina em células que expressam os respectivos transportadores (Verrico *et al.* 2005).

Ao nível cerebral a interacção entre as vias serotonérgicas e dopaminérgicas tem consequências no mecanismo de acção da MDMA. O efeito da MDMA nas vias serotonérgicas está estreitamente relacionado com a activação das vias dopaminérgicas e com a libertação de dopamina (Gudelsky e Nash 1996). O aumento da libertação da dopamina pela MDMA pode resultar, pelo menos em parte, da reversão do transporte da dopamina para além do processo mais comum de libertação dependente do Ca^{2+} (Crespi *et al.* 1997). A MDMA estimula a síntese da dopamina por um processo mediado pelos receptores da serotonina do subtipo 2A e 2C localizados nos neurónios GABAérgicos (Nash *et al.* 1990; Sprague *et al.* 1998). A MDMA é um agonista destes receptores pós-sinápticos de cuja activação resulta uma diminuição dos níveis de ácido γ-aminobutírico (GABA) e a consequente estimulação da síntese e libertação de dopamina (Nash *et al.* 1990; Yamamoto *et al.* 1995).

No ratinho, os efeitos de libertação de serotonina são menos marcados do que no rato e nesta espécie animal a administração de MDMA resulta num aumento pronunciado da libertação de dopamina. Esta discrepância ao nível das monoaminas cerebrais pode explicar o motivo pelo qual o perfil de neurotoxicidade observado para estas duas espécies de roedores é também diferente (Green *et al.* 2003).

A MDMA tem uma acção agonista ao nível dos receptores serotonérgicos dos subtipos 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, sendo estes efeitos dotados de estereoespecificidade com maior potência e eficácia do estereoisómero R-(-)-MDMA para o receptor 5-HT_{2A} e do estereoisómero S-(+)-MDMA para o receptor 5-HT_{2c}. O agonismo para os receptores 5-HT_{2A} está associado aos efeitos alucinogénios das anfetaminas. Contudo, a MDMA não tem grande eficácia ao nível deste receptor o que pode explicar o seu fraco carácter alucinogénio (Green *et al.* 2003).

A nível central a MDMA bloqueia os receptores adrenérgicos pré-sinápticos do tipo α_2 o que pode explicar o aumento da pressão sanguínea sistólica e diastólica causada pela MDMA em humanos (Green *et al.* 2003). No entanto, a nível periférico a MDMA exibe um comportamento agonista para estes receptores.

2.3.3.2. Efeito inibidor da enzima monoamina oxidase (MAO)

Para além de promover a libertação das catecolaminas e de inibir a sua recaptação neuronal, a MDMA impede ainda a sua inactivação metabólica ao inibir de forma competitiva a MAO. A MDMA inibe preferencialmente a MAO do tipo A (com maior afinidade para a serotonina) mas inibe também a MAO B, diminuindo desta forma a degradação enzimática da serotonina e das catecolaminas e contribuindo para o prolongamento da estimulação simpática (Leonardi e Azmitia 1994).

2.3.3.3. Efeito inibidor da enzima triptofano hidroxilase

A MDMA inibe a enzima triptofano hidroxilase, que é a enzima limitante na síntese da serotonina. Foi demonstrado que esta inibição pode durar semanas após a administração a ratos de uma única dose de MDMA (Green *et al.* 2003). Os estudos efectuados em ratos têm indicado que esta inibição enzimática é muito provavelmente resultado da inactivação dos grupos sulfidrilo da enzima pelos metabolitos de estrutura quinónica resultantes do metabolismo oxidativo da MDMA (Green *et al.* 2003). O aumento da temperatura corporal induzido pela MDMA parece também potenciar a inibição da triptofano hidroxilase, muito provavelmente como resultado da produção de espécies radicalares cuja formação aumenta com a hipertermia (Green *et al.* 2003).

2.3.3.4. Efeito na expressão genética

Ao nível da expressão genética a MDMA é responsável pela indução da proteína c-fos, uma proteína reguladora da expressão de genes que codificam neuropéptidos e proteínas essenciais a nível neuronal e que parece estar também envolvida na resposta celular ao stress e na morte celular pela via apoptótica (Simantov 2004). Em ratinhos foi observada uma alteração do perfil de expressão genética como resultado do tratamento com MDMA, incluindo a indução do mRNA dos transportadores do GABA (GAT1 e GAT4) o que pode estar também envolvido na expressão da toxicidade da MDMA uma

vez que o uso de inibidores destes transportadores resultou na diminuição da toxicidade da MDMA (Simantov 2004).

A MDMA parece também diminuir a expressão de alguns genes, tal como foi demonstrado para o gene que expressa a proteína sinaptotagmina IV (Simantov 2004). Esta proteína pertence a uma família de proteínas reguladoras da secreção de neurotransmissores, do transporte vesicular (*vesicle trafficking*), e da adesão das vesículas à membrana plasmática (*vesicle docking*). A expressão de outros genes envolvidos na neurotransmissão mediada pelo GABA, incluindo as proteínas do citoesqueleto da família das septinas e distorfinas, é também alterada pela MDMA (Simantov 2004). Esta alteração da expressão genética ao nível dos genes envolvidos na neurotransmissão GABAérgica ilustra o papel essencial deste neurotransmissor na actividade da MDMA a nível neuronal.

Sprague e colaboradores verificaram que a MDMA regula os níveis de mRNA da proteína dissociadora mitocondrial UCP-3 no músculo esquelético do rato (Sprague *et al.* 2003). A intervenção desta proteína na termogénese, actuando ao nível da dissipação do gradiente electroquímico de protões na mitocôndria, favorece a libertação da energia sob a forma de calor. A interacção entre a MDMA e esta proteína pode estar na origem do efeito hipertérmico da MDMA (Mills *et al.* 2003).

2.3.3.5. Efeito neuroendócrino

A nível neuroendócrino a administração de MDMA produz um aumento dos níveis séricos de corticosterona e de prolactina em ratos (Green *et al.* 2003). O aumento da secreção da corticosterona parece estar dependente da estimulação das vias serotonérgicas (Green *et al.* 2003). A libertação de aldosterona e renina por estimulação serotonérgica também aumenta após a administração da MDMA a ratos (Green *et al.* 2003). Estudos *in vitro* indicaram igualmente que a MDMA e alguns dos seus metabolitos promovem um aumento da libertação de ocitocina e vasopressina (ou ADH) de modo dependente da dose (Forsling *et al.* 2002). A MDMA estimula ainda a libertação de hormona tiroideia T4 (tiroxina) no rato (Sprague *et al.* 2003).

2.3.3.6. Efeito no sistema termorregulador

A MDMA interfere na regulação da temperatura corporal. No rato a administração de MDMA altera profundamente o sistema de termorregulação. A MDMA pode causar uma elevação marcada da temperatura corporal com um aumento da temperatura basal até 2 ºC cujo pico ocorre entre 40 a 60 minutos após a administração (Broening *et al.* 1995; Malberg e Seiden 1998; Mechan *et al.* 2002; Nash *et al.* 1988; Schmidt *et al.* 1990b). No entanto, este efeito é altamente dependente da temperatura ambiente. Muitos dos estudos que avaliaram o efeito da MDMA na termorregulação demonstraram a indução de um efeito hipotérmico a baixa temperatura ambiente nas mesmas doses que provocaram hipertermia à temperatura ambiente normal (20-22 ºC) ou a temperatura ambiente elevada (30-33 ºC) (Broening *et al.* 1995; Malberg e Seiden 1998). Embora esteja amplamente estabelecido que a activação das vias serotonérgicas resulta num aumento da temperatura corporal, o efeito hipertérmico da MDMA parece estar relacionado com o aumento da libertação de dopamina, uma vez que a administração de compostos antagonistas dos receptores serotonérgicos (por exemplo, a ritanserina e metisergide) ou inibidores do sistema de captação neuronal da serotonina (por exemplo a fluoxetina) não reverteram o aumento da temperatura corporal, ao contrário do que aconteceu com o antagonista dos receptores da dopamina do tipo D_1 (SCH 23390 ou 8-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-3-metil-5-fenil-1H-3-benzazepina-7-ol) (Mechan *et al.* 2002).

As alterações ao nível da regulação da temperatura corporal observadas no ratinho dependem muito da dose e da estirpe utilizada. De uma forma geral pode ser considerado que a MDMA induz hipertermia no ratinho, mas os resultados dos vários estudos efectuados são muito variáveis (Carvalho *et al.* 2002a; Green *et al.* 2003).

Em humanos o efeito hipertérmico da MDMA está também documentado e o aumento da temperatura corporal é considerado uma das consequências potencialmente letais das intoxicações com MDMA (Henry *et al.* 1992).

2.3.3.7. Efeito no fluxo sanguíneo e actividade cerebral

A administração de MDMA em humanos modifica também o fluxo sanguíneo e a actividade cerebral em determinadas regiões do cérebro, tal como foi demonstrado por técnicas de electroencefalografia e de tomografia de emissão de positrões e tomografia electromagnética de baixa resolução (Green *et al.* 2003). A serotonina está envolvida na regulação do fluxo sanguíneo cerebral o que pode explicar estas alterações. No entanto, os estudos efectuados mostraram que estes efeitos são pouco pronunciados e fazem prever que o uso prolongado de MDMA não afecta significativamente a regulação do fluxo sanguíneo cerebral mediada pela serotonina (Green *et al.* 2003).

2.3.4. Efeitos tóxicos

Em 2003 estimava-se que, no Reino Unido, o número de fatalidades relacionadas com a MDMA era de 12 pessoas por ano (Green *et al.* 2003).

Os efeitos tóxicos induzidos pela MDMA nem sempre estão estreitamente relacionados com a sua acção biológica. Em muitos casos o mecanismo pelo qual a intoxicação ocorre não está ainda esclarecido, tendo provavelmente uma origem multifactorial. O contexto do uso da MDMA, em ambientes fechados, sobrelotados, de elevada temperatura e ao som de música electrónica que é tocada de forma alta e repetitiva, parece exacerbar a toxicidade desta droga de abuso. No entanto, apesar da importância das variáveis ambientais na indução da toxicidade da MDMA, alguns episódios esporádicos, como por exemplo, a intoxicação acidental de uma criança de 13 meses (Bedford-Russell *et al.* 1992) ou a intoxicação de um indivíduo paraplégico (Hall *et al.* 1996), constituem provas irrefutáveis de uma acção tóxica directa da MDMA, independentemente das circunstâncias em que é usada. Abaixo descrevem-se os principais efeitos tóxicos induzidos por esta droga de abuso em humanos, a curto e longo prazo. Seguidamente apresentam-se os mecanismos de toxicidade que têm sido propostos para explicar a ocorrência destes efeitos, cujo conhecimento provém maioritariamente dos resultados obtidos da experimentação animal *in vivo* e *in vitro*.

A dose letal 50 (DL_{50}) da MDMA foi avaliada em animais de diferentes espécies. No ratinho, a DL_{50} foi estimada entre 80 e 115 mg/kg (Schifano 2004). No

rato o seu valor é de 49 mg/kg após administração intraperitoneal e de 325 mg/kg após administração por via oral (Carvalho 2004). Em primatas não-humanos e após administração por via endovenosa o valor de DL_{50} foi de 22 mg/kg (Carvalho 2004). De acordo com os princípios que regem a extrapolação de doses utilizadas nos modelos animais para as doses equivalentes em humanos, é de esperar que nas espécies de menor porte, como por exemplo os roedores, as doses que produzem um determinado efeito tóxico tenham que ser superiores (Schifano 2004). Com base neste princípio Ricaurte e colaboradores sugeriram que uma dose de 20 mg/kg administrada a roedores é equivalente à administração de uma dose de 5 mg/kg em primatas não-humanos e provavelmente a doses ainda inferiores em humanos (Ricaurte *et al.* 2000b). Em função do conteúdo médio dos comprimidos de *ecstasy* em MDMA foi estimado que com a ingestão de 20-30 comprimidos poderia ser atingida a dose DL_{50} (Schifano 2004).

É, no entanto, difícil prever qual a dose mínima de MDMA capaz de produzir toxicidade em humanos. A variabilidade nas concentrações plasmáticas encontradas em intoxicações fatais e não fatais é bem patente (ver Tabela 4 e Tabela 5). Por exemplo, existem relatos de uma intoxicação fatal que ocorreu com a ingestão de um único comprimido (concentração plasmática de MDMA de 0,424 mg/L) (Chadwick *et al.* 1991), intoxicações graves mas em que o indivíduo sobreviveu após a ingestão de 30 comprimidos (Shannon 2000), ou de 18 comprimidos (com uma concentração plasmática de 4,05 mg/L) (Roberts e Wright 1993), e de um caso praticamente assintomático após a ingestão de 42 comprimidos (resultando numa concentração plasmática de 7,72 mg/L) (Henry *et al.* 1992). As doses de MDMA usualmente ingeridas produzem níveis plasmáticos entre 0,1 e 0,5 mg/L. A maior parte dos casos de intoxicação descritos na literatura referem valores bastante mais elevados (na ordem dos 0,5-10 mg/L) que chegam a ser 70 vezes superiores aos níveis plasmáticos mais usualmente encontrados (Randall 1992). Numa revisão recente dos estudos efectuados para a avaliação dos efeitos agudos da administração de MDMA a voluntários humanos, foi concluído que a dose mínima a partir da qual são observáveis os efeitos adversos da MDMA é de 1,0 mg/kg (Dumont e Verkes 2006).

2.3.4.1. Efeitos tóxicos agudos

Os efeitos adversos agudos que ocorrem após a ingestão de MDMA em humanos incluem aumento da pressão sanguínea, aumento da frequência cardíaca, palpitações, náuseas, vómitos, midríase, arrepios, sudação, tremores, trismo (cerrar dos maxilares), bruxismo (ranger dos dentes), dor ou tensão muscular, sensação súbita de frio ou calor, nistagmo, inquietação, irritabilidade e insónia (Cole e Sumnall 2003; Green *et al.* 2003; Peroutka *et al.* 1988). Podem também ocorrer ataques de pânico, delírio e episódios psicóticos breves que desaparecem rapidamente quando termina a acção da MDMA (de la Torre *et al.* 2004b). Os efeitos adversos tardios que podem persistir até sete dias após a ingestão da MDMA incluem fadiga, irritabilidade, ansiedade, temperamento depressivo, insónia, tonturas e tensão muscular (Cole e Sumnall 2003; de la Torre *et al.* 2004b).

Cerca de uma a duas horas após administração aguda, a MDMA aumenta significativamente a actividade cardiovascular com um aumento da pressão sanguínea, frequência cardíaca e ocorrência frequente de palpitações (de la Torre *et al.* 2000b; Downing 1986; Grob *et al.* 1996; Lester *et al.* 2000; Liechti *et al.* 2001; Liechti e Vollenweider 2000a, 2000b; Mas *et al.* 1999; Vollenweider *et al.* 1998). A administração de 125 mg de MDMA por via oral a 8 voluntários resultou num aumento agudo e significativo da pressão sanguínea, frequência cardíaca e das concentrações plasmáticas de prolactina e de cortisol, não tendo sido detectado um aumento significativo da temperatura corporal (Mas *et al.* 1999). Num estudo semelhante realizado por Harris e colaboradores, no qual foi administrada MDMA numa dose de 1,5 mg/kg a 8 indivíduos, ocorreu um aumento significativo das concentrações plasmáticas de cortisol, prolactina e desidroepiandrosterona (prasterona) juntamente com um aumento da frequência cardíaca (Harris *et al.* 2002). Para além destas hormonas, a MDMA promove ainda a secreção da ACTH e da hormona antidiurética (vasopressina ou ADH) (de la Torre *et al.* 2004b). Liechti e Vollenweider examinaram o efeito do inibidor da captação da serotonina, citalopram (Liechti e Vollenweider 2000b) e do antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D_2, haloperidol (Liechti e Vollenweider 2000a), na indução destes efeitos adversos da MDMA e verificaram que enquanto o citalopram administrado previamente à MDMA (na dose de 1,5 mg/kg por via oral) atenuava o aumento da pressão sanguínea e da frequência cardíaca, o mesmo não se verificava com o pré-tratamento com haloperidol (Liechti e Vollenweider 2000a,

2000b). Ambos os estudos têm como limitação o facto de não ter sido realizado um estudo do tipo dose-resposta para os respectivos antagonistas que foram administrados numa única dose, mas parecem indicar um envolvimento da neurotransmissão serotonérgica na ocorrência destes efeitos adversos agudos induzidos pela MDMA.

Foi já referida a acção da MDMA no sistema termorregulador. Da exacerbação desses efeitos resulta a hipertermia, que constitui um dos principais sintomas de intoxicação aguda pela MDMA, tendo sido relatados aumentos da temperatura corporal até 43 ºC (Green *et al.* 2003). O aumento da temperatura corporal acima de 42 ºC é considerado fatal embora existam casos registados de sobrevivência a esta temperatura (Logan *et al.* 1993). A hipertermia pode por sua vez conduzir a complicações graves e frequentemente fatais que incluem, a rabdomiólise, coagulação intravascular disseminada (com consequente hemorragia generalizada e necrose dos tecidos) e falha renal aguda (Green *et al.* 2003). A hipertermia pode resultar da acção directa da MDMA ao nível do centro de regulação da temperatura corporal do SNC e da vasoconstrição periférica dos vasos sanguíneos cutâneos. Também parece estar relacionada com o aumento da actividade muscular associada à dança intensa, à desidratação, e à elevada temperatura ambiente em locais frequentemente sobrelotados (de la Torre *et al.* 2004b). De facto, quando a MDMA foi administrada em ensaios clínicos controlados não foi observado um aumento pronunciado da temperatura corporal que, quando foi registado, não ultrapassou os 0,5 ºC (de la Torre *et al.* 2000b; Grob *et al.* 1996; Liechti *et al.* 2001; Mas *et al.* 1999; Vollenweider *et al.* 1998).

Para além da hipertermia, outros sintomas graves da intoxicação com a MDMA compreendem a taquicardia, coagulopatia, trombocitopenia, leucocitose tardia, acidose, hipoglicemia, congestão pulmonar, edema e toxicidade hepática (tendo sido descritos casos de hepatite fulminante e necrose hepática) (Brown e Osterloh 1987; Chadwick *et al.* 1991; Dowling *et al.* 1987; Henry *et al.* 1992; McCann *et al.* 1996; Screaton *et al.* 1992; Suarez e Riemersma 1988). Outros sintomas potencialmente fatais ao nível neurológico incluem, hemorragia subaracnóide, hemorragia intracraniana, enfarte cerebral e trombose cerebral. Estas complicações podem resultar da hipertensão, angite cerebral, ou desidratação associadas à ingestão da MDMA (McCann *et al.* 1996; Milroy *et al.* 1996; Rutty e Milroy 1997). A necrose do fígado e do tecido cardíaco foi também observada em estudos *post-mortem* (Milroy *et al.* 1996; Rutty e Milroy 1997).

A hepatotoxicidade causada pela MDMA apresenta diferentes padrões o que sugere diferentes mecanismos de patogénese (Andreu *et al.* 1998; Brauer *et al.* 1997;

Henry *et al.* 1992; Jones e Simpson 1999; Milroy *et al.* 1996; Schwab *et al.* 1999). A lesão hepática induzida pela MDMA abrange desde formas benignas análogas a hepatites virais (Dykhuizen *et al.* 1995; Ellis *et al.* 1996) a formas graves como a falência hepática aguda resultante de necrose hepática extensa (Brauer *et al.* 1997; Henry *et al.* 1992; Milroy *et al.* 1996), existindo vários casos documentados de falência hepática fulminante fatal ou que necessitaram do recurso a transplante hepático (Brauer *et al.* 1997; Caballero *et al.* 2002; Ellis *et al.* 1996). Numa unidade de cuidados intensivos em Espanha, a MDMA foi a segunda principal causa do desenvolvimento de falência hepática aguda entre 1994 e 1996 para a faixa etária abaixo dos 25 anos (Andreu *et al.* 1998). Os danos hepáticos podem surgir como consequência da hipertermia através da indução de fenómenos de stress oxidativo com consequente peroxidação lipídica (Jones e Simpson 1999). Contudo, alguns casos de toxicidade hepática ocorrem sem aumento da temperatura corporal e a exposição repetida parece aumentar a extensão do dano hepático, o que sugere a possível intervenção de mecanismos imunológicos (Jones e Simpson 1999).

Ao nível imunológico a MDMA demonstrou induzir uma disfunção transitória de forma dependente da concentração plasmática, com um decréscimo no número de linfócitos T *helper* (CD4+) e um aumento do número de células *natural killer* (NK) (Pacifici *et al.* 2000; Pacifici *et al.* 1999). A administração repetida de MDMA potencia e prolonga esta disfunção do sistema imunológico (Pacifici *et al.* 2001a). Um estudo realizado por Pacifici e colaboradores numa população de consumidores crónicos de MDMA revelou alterações em vários parâmetros imunológicos, nomeadamente uma redução drástica do número de células NK e uma tendência para uma diminuição do número de linfócitos T *helper* (CD4+) (Pacifici *et al.* 2002). Neste estudo verificou-se uma redução significativa destes parâmetros imunológicos defensivos durante um período de observação de dois anos, o que permite antever um aumento da susceptibilidade dos indivíduos que consomem regularmente MDMA a infecções e doenças do foro imunológico (Pacifici *et al.* 2002).

A hiponatrémia é uma complicação rara associada à ingestão excessiva de água e à síndrome da secreção inapropriada de hormona antidiurética (de la Torre *et al.* 2004b; Henry *et al.* 1998; Holden e Jackson 1996; Holmes *et al.* 1999; Kessel 1994; Lehmann *et al.* 1995; Matthai *et al.* 1996; Maxwell *et al.* 1993; Milroy *et al.* 1996; Satchell e Connaughton 1994). O aumento da secreção de vasopressina induzida pela MDMA é acompanhada por uma diminuição na concentração plasmática de sódio, o

que com a ingestão de grandes quantidades de água pode resultar em hiponatrémia e edema cerebral (Cole e Sumnall 2003). A MDMA em doses elevadas pode também causar retenção urinária (Bryden *et al.* 1995) o que poderá exacerbar esta reacção adversa.

2.3.4.2. Efeitos tóxicos a longo prazo

Os efeitos tóxicos a longo prazo que podem resultar do uso crónico da MDMA incluem o desenvolvimento de uma síndrome que afecta o maxilar inferior, erosão dentária e dor miofacial que são resultado do bruxismo e do trismo (McCann *et al.* 1996). Uma complicação grave, mas aparentemente reversível, do uso crónico da MDMA é o possível desenvolvimento de anemia aplástica, já descrita em pelo menos dois casos (McCann *et al.* 1996). A hepatotoxicidade pode também surgir como consequência do uso prolongado da MDMA. O consumo crónico de MDMA pode levar ao desenvolvimento de fibrose hepática progressiva (Khakoo *et al.* 1995). Estudos *in vitro* demonstraram que a MDMA possui uma actividade profibrinogénica ao aumentar a produção de colagénio do tipo I em culturas de células hepáticas responsáveis pela síntese de colagénio no fígado (células Ito). Este efeito estava associado à diminuição dos níveis de GSH intracelulares e também a um aumento transitório nos níveis de peróxido de hidrogénio, sendo por isso provável o envolvimento de fenómenos de stress oxidativo nesta acção profibrinogénica da MDMA (Varela-Rey *et al.* 1999).

O mais preocupante efeito tóxico da MDMA a longo prazo é indiscutivelmente a sua neurotoxicidade. Esta tem sido profundamente estudada em animais e em humanos quer *in vivo* quer *in vitro*. Por este motivo a neurotoxicidade da MDMA em humanos encontra-se já bem documentada na literatura científica.

A toxicidade da MDMA ao nível do SNC parece afectar selectivamente o sistema serotonérgico (McCann *et al.* 2000). Vários estudos indicam que a concentração do principal metabolito da serotonina, o ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA), no líquido cefalorraquidiano está significativamente diminuída em indivíduos que consomem a MDMA (McCann *et al.* 2000; McCann *et al.* 1999b; McCann *et al.* 1994; Ricaurte *et al.* 1990).

Quando submetidos a uma estimulação do sistema serotonérgico através da administração de diferentes agonistas dos receptores serotonérgicos como, por exemplo, a *m*-clorofenilpiperazina, a d-fenfluramina e o L-triptofano, os indivíduos que consomem MDMA apresentam uma resposta diminuída a esta estimulação serotonérgica (Gerra *et al.* 2000; Gerra *et al.* 1998; McCann *et al.* 1999a; Price *et al.* 1989). Nestes estudos foi comparada a secreção de cortisol e prolactina entre indivíduos controlo e indivíduos utilizadores de MDMA. Enquanto nos controlos havia um aumento da secreção de cortisol e prolactina como resultado do aumento da síntese e/ou libertação de serotonina induzida pelos referidos agonistas serotonérgicos, essa resposta estava significativamente diminuída nos indivíduos que consumiam MDMA (Gerra *et al.* 2000; Gerra *et al.* 1998; McCann *et al.* 1999a; Price *et al.* 1989). Uma observação importante de um destes estudos foi a persistência deste efeito relativamente à secreção de prolactina, ao contrário do que foi observado para o cortisol, após um ano de abstinência do uso de MDMA (Gerra *et al.* 2000). Esta observação sugere por um lado que os efeitos neurotóxicos da MDMA ao nível da neurotransmissão serotonérgica são prolongados e, por outro lado, que a MDMA parece afectar de forma distinta diferentes receptores serotonérgicos uma vez que os receptores preferencialmente envolvidos na libertação de prolactina pertencem ao subtipo 5-HT_{1A} (Gerra *et al.* 2000). Deste modo, as funções serotonérgicas mediadas por este receptor podem estar mais comprometidas e por períodos de tempo superiores pela acção da MDMA (Green *et al.* 2003).

Até à data, as provas mais convincentes da neurotoxicidade da MDMA foram obtidas por estudos de imagiologia cerebral que demonstraram uma redução significativa na densidade dos locais de captação da serotonina, indicando uma neurodegeneração do sistema serotonérgico que se correlacionava com a duração do consumo da MDMA (McCann *et al.* 1998; McCann *et al.* 2005; Reneman *et al.* 2001; Reneman *et al.* 2002; Ricaurte *et al.* 2000a; Semple *et al.* 1999). Tais alterações não foram observadas ao nível dos neurónios dopaminérgicos (Reneman *et al.* 2002; Semple *et al.* 1999). Estes resultados têm sido alvo de críticas dadas as limitações experimentais inerentes a este tipo de estudos e também porque, segundo alguns autores, o decréscimo da função serotonérgica pode ser uma causa e não uma consequência do consumo da MDMA (Kish 2002; Reed *et al.* 1999). De facto, o comportamento impulsivo e a procura de drogas de abuso parecem estar associados a alterações da função serotonérgica (Reed *et al.* 1999). No entanto, os resultados destes estudos que recorrem à tomografia de emissão de positrões (PET) e à tomografia de emissão de fotão único

(SPECT) foram reproduzidos e validados em estudos realizados em primatas não humanos (Ricaurte *et al.* 2000a; Szabo *et al.* 1995) e, nos estudos em humanos, foram incluídos controlos adequados à população de utilizadores de MDMA em estudo (Semple *et al.* 1999), o que permitiu concluir que de facto estes estudos comprovam a neurotoxicidade desta droga de abuso.

Reneman e colaboradores realizaram um estudo em que foram investigados e comparados os efeitos do consumo moderado e elevado de MDMA, e também as possíveis diferenças entre sexos, na toxicidade para os neurónios serotonérgicos em diferentes regiões cerebrais, recorrendo à metodologia de SPECT (Reneman *et al.* 2001). Os resultados deste estudo demonstraram as alterações nos neurónios serotonérgicos anteriormente observadas em estudos semelhantes, mas apenas no grupo feminino de consumidores de elevadas quantidades de MDMA, o que levou à conclusão de que o consumo elevado de MDMA está associado aos efeitos neurotóxicos da MDMA e que as mulheres podem ser mais susceptíveis a estes efeitos do que os homens (Reneman *et al.* 2001).

Outras alterações neurológicas observadas em utilizadores de MDMA incluem a redução do metabolismo da glucose no hipocampo esquerdo (apenas observada nesta região cerebral) e alterações no electroencefalograma para padrões semelhantes aos observados em casos de envelhecimento e demência em indivíduos consumidores de grandes quantidades de MDMA (Boot *et al.* 2000; Dafters *et al.* 1999).

Os estudos relatados na literatura científica respeitantes à avaliação da neurotoxicidade da MDMA em humanos foram recentemente revistos por Gouzoulis-Mayfrank e Daumann (Gouzoulis-Mayfrank e Daumann 2006). Estes autores concluem que apesar da falta de estudos que abordem concretamente os efeitos do uso simultâneo de várias drogas ou a pré-existência de disfunções neurológicas nas populações alvo destes estudos, os resultados obtidos até à data permitem confirmar que a MDMA é neurotóxica ao nível da neurotransmissão serotonérgica (Gouzoulis-Mayfrank e Daumann 2006). Esta neurotoxicidade parece ser reversível após um longo período de abstinência ainda que algumas sequelas pareçam persistir (Gouzoulis-Mayfrank e Daumann 2006).

O uso crónico da MDMA tem sido também associado a problemas persistentes do sono (Allen *et al.* 1993), vários problemas psicopatológicos, incluindo disfunções alimentares (Schifano *et al.* 1998) e cardíacas (Brody *et al.* 1998). No entanto, tal como acontece com vários estudos de neurotoxicidade, os indivíduos que participaram nestes

estudos são, na sua maioria, consumidores de várias outras drogas de abuso o que torna difícil concluir definitivamente acerca da toxicidade da MDMA a longo prazo.

A exposição à MDMA de mulheres jovens, e consequentemente em idade fértil, tem também suscitado preocupações relativamente às possíveis consequências para o desenvolvimento de toxicidade a nível embrionário. Um estudo prospectivo realizado no reino Unido em 1998 e que envolveu 136 gestações de mães consumidoras de MDMA (entre as quais 74 declararam consumir apenas *ecstasy*) revelou a ocorrência de várias malformações nos recém-nascidos incluindo, clinodactilia, plagiocefalia, hipoplasia do 1º arco costal, pé boto uni ou bilateral, estenose pilórica, agenesia completa dos membros superiores, clavícula e omoplata (McElhatton *et al.* 1999). Foi também registado um número de casos de prematuridade e aborto espontâneo acima da média esperada para a população em geral (McElhatton *et al.* 1999). O carácter teratogénico das anfetaminas é já bem conhecido e documentado. Numa revisão de 1998, Plessinger aborda detalhadamente a teratogénese das anfetaminas, considerando muitos factores cruciais na expressão deste tipo de toxicidade tais como, altura da exposição e tempo de gestação, abuso concomitante de diferentes tipos de drogas, determinantes genéticas da mãe e do feto que podem alterar a farmacocinética e consequentemente a toxicidade destes compostos, características sociais e factores ambientais e nutricionais (Plessinger 1998). De uma forma geral, o abuso destes compostos durante a gravidez pode aumentar os riscos de ocorrência de parto prematuro, nado-mortos, atraso de crescimento intra-uterino e problemas cardiovasculares, sendo que o próprio estilo de vida das mães que consomem MDMA pode ser potencialmente prejudicial durante a gestação e após o nascimento (Ho *et al.* 2001; Plessinger 1998; van Tonningen *et al.* 1998).

2.3.4.3. Interacções medicamentosas

Smilkstein e colaboradores relataram uma interacção medicamentosa entre a MDMA e um inibidor da MAO, a fenelzina (Smilkstein *et al.* 1987). As intoxicações mais graves com sintomatologia da síndrome da serotonina ocorrem após a administração concomitante de inibidores da recaptação da serotonina (como por exemplo a MDMA) e inibidores da MAO (Scorza *et al.* 1999). Deste modo, os

indivíduos que ingerem simultaneamente várias drogas, algumas delas com o intuito de exacerbar e prolongar o efeito estimulante ou para combater os efeitos indesejáveis, podem apresentar um risco acrescido para o desenvolvimento de toxicidade (Cole e Sumnall 2003). Vuori e colaboradores relataram quatro intoxicações fatais com ingestão simultânea de MDMA e moclobemida (um fármaco inibidor da MAO utilizado com o intuito de potenciar os efeitos da MDMA) em que a causa provável de morte foi atribuída ao desenvolvimento da síndrome da serotonina (Vuori *et al.* 2003).

A interacção entre o etanol e a MDMA conduz a alterações comportamentais. Os indivíduos sentem-se eufóricos e com capacidade superior de desempenho de tarefas, mas na realidade esta capacidade encontra-se diminuída pelo efeito do etanol (Hernandez-Lopez *et al.* 2002). As concentrações plasmáticas de MDMA parecem também aumentar com o uso concomitante de etanol, enquanto as concentrações plasmáticas de etanol parecem baixar, indicando desta forma alguma interacção ao nível farmacocinético (Hernandez-Lopez *et al.* 2002).

Com o objectivo de exacerbar os efeitos da MDMA têm sido descritos casos em que a MDMA foi ingerida conjuntamente com o dextrometorfano (Baggott *et al.* 2000). Dado que este composto é, tal como a MDMA, um substrato da enzima CYP2D6, e uma vez que esta enzima é crucial para a farmacocinética da MDMA foram antecipadas interacções potencialmente graves entre os dois compostos. No entanto, até à data não houve qualquer registo de uma intoxicação desta natureza (de la Torre *et al.* 2004a).

O uso de fármacos antiretrovirais, como por exemplo o ritonavir, foi associado a interacções fatais com a MDMA (Henry e Hill 1998). Uma vez que o ritonavir é também um inibidor da CYP2D6, os autores propuseram como explicação para esta interacção o aumento desproporcional da concentração plasmática da MDMA (num destes casos a concentração plasmática medida era cerca de dez vezes superior à esperada para a quantidade de MDMA ingerida) (Henry e Hill 1998). No entanto, a farmacocinética não linear da MDMA, resultante da inibição da CYP2D6 para concentrações elevadas, e a disfunção hepática pré existente neste indivíduo podem ter contribuído fortemente para o desenvolvimento da intoxicação (Henry e Hill 1998).

2.3.4.4. Mecanismos de toxicidade

Foram já referidos os mecanismos de acção biológica da MDMA. Da exacerbação desses efeitos pode resultar a ocorrência de toxicidade. No entanto, alguns efeitos tóxicos observados com a MDMA são independentes da quantidade ingerida e das concentrações plasmáticas antingidas. Isto é indiciador de mecanismos alternativos para a ocorrência dos efeitos tóxicos que podem, por exemplo, resultar da bioactivação metabólica da MDMA. Seguidamente descrevem-se os mecanismos que têm sido propostos para a ocorrência de toxicidade. Na sua maior parte, estes efeitos foram já referidos. Pretende-se aqui abordar a importância de cada um destes mecanismos de acordo com a especificidade dos diferentes órgãos-alvo.

2.3.4.4.1. Toxicidade hepática

Os mecanismos associados ao desenvolvimento de hepatotoxicidade como reacção adversa à MDMA não estão ainda completamente esclarecidos.

A hepatotoxicidade da MDMA tem sido considerada como uma reacção idiossincrática uma vez que a lesão hepática não ocorre em muitos casos de intoxicação (Henry *et al.* 1992). Foi também proposto um mecanismo de hipersensibilidade dada a presença de um elevado número de eosinófilos no tracto portal em casos de intoxicações com falência hepática aguda (Andreu *et al.* 1998). Uma vez que a lesão hepática é muitas vezes acompanhada de um estado hipertérmico, foi igualmente sugerido que a isquemia daí resultante poderia explicar o desenvolvimento de hepatotoxicidade (Andreu *et al.* 1998). Tendo em consideração a natureza do consumo de MDMA (presença de outras drogas de abuso e possível presença de impurezas de síntese em elevadas quantidades) não pode ser excluída a hipótese da intervenção de outros compostos que não a MDMA na expressão dos efeitos hepatotóxicos associados ao seu consumo (Milroy *et al.* 1996; Parrott 2004). No entanto, existem muitos indícios que apontam para uma acção da MDMA e/ou dos seus metabolitos, quer por uma acção tóxica directa, quer indirectamente através da libertação de catecolaminas endógenas, indução de stress oxidativo e de hipertermia, e das alterações do fluxo sanguíneo hepático.

A duração de exposição à MDMA e a quantidade ingerida não parecem ser determinantes para o desenvolvimento de hepatotoxicidade uma vez que esta pode ocorrer após a ingestão de um único comprimido ou somente após o uso regular prolongado (Coore 1996; Dykhuizen *et al.* 1995; Henry *et al.* 1992).

2.3.4.4.1.1. Acção das catecolaminas endógenas

A lesão hepática induzida pela MDMA pode surgir como resultado da activação dos receptores adrenérgicos localizados na artéria hepática, com consequente vasoconstrição e hipóxia hepática (Losser e Payen 1996). A activação dos receptores α-adrenérgicos localizados nos hepatócitos pode também resultar na diminuição dos níveis de GSH (James *et al.* 1983; Sies e Graf 1985), aumento da respiração mitocondrial e da concentração do cálcio livre intracelular (Taylor *et al.* 1983), que constituem, no seu conjunto, prováveis mecanismos de toxicidade celular.

A lesão hepática pode também resultar do metabolismo oxidativo das catecolaminas endógenas. As catecolaminas são essencialmente metabolizadas pela MAO e pela COMT (Hoffman e Lefkowitz 1996; Lefkowitz *et al.* 1996). Estas duas enzimas têm diferente localização intracelular, sendo a COMT uma enzima com localização citosólica e ligada à membrana, enquanto a MAO se encontra agregada à superfície externa da membrana mitocondrial. A MAO existe na forma de duas isoenzimas, MAO-A (com preferência pela serotonina) e MAO-B (com preferência pela feniletilamina). Por acção da MAO as catecolaminas são desaminadas aos correspondentes aldeídos que, por acção de redutases ou oxidases, são metabolizados respectivamente em álcoois ou ácidos carboxílicos que são posteriormente metilados pela COMT. A COMT promove também a metilação directa de um dos grupos hidroxilo do grupo catecólico, sendo os metabolitos metilados posteriormente metabolizados pela MAO. Os metabolitos resultantes destas reacções metabólicas podem ser posteriormente conjugados, sendo eliminados na forma de sulfatos e de glucuronídeos (Hoffman e Lefkowitz 1996; Lefkowitz *et al.* 1996).

O aumento do metabolismo das catecolaminas pela MAO, pode conduzir ao aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) intracelular, uma vez que este é um subproduto da desaminação oxidativa catalizada por esta enzima (Hoffman e

Lefkowitz 1996). A libertação exacerbada de catecolaminas induzida pela MDMA pode, no entanto, levar a uma saturação da capacidade metabólica destas enzimas. Por outro lado, a MDMA é um inibidor competitivo da MAO, exibindo maior selectividade e potência na inibição da isoenzima MAO-A (Leonardi e Azmitia 1994). Nestas circunstâncias as catecolaminas podem sofrer fenómenos de auto-oxidação com formação de espécies altamente reactivas, incluindo metabolitos reactivos, ROS e RNS, com a capacidade de desencadear fenómenos de stress oxidativo a nível intracelular (Bindoli *et al.* 1992; Bindoli *et al.* 1989). Uma vez esgotadas as defesas antioxidantes intracelulares, a célula pode entrar em processo de morte quer por via necrótica, quer por via apoptótica.

O processo de oxidação das catecolaminas (Bindoli *et al.* 1992; Bindoli *et al.* 1989; Carvalho 2004; Remião 2002), que se encontra esquematicamente representado na Figura 8, inicia-se com a oxidação do grupo catecólico à forma de semi-quinona que rapidamente se oxida a quinona (Bindoli *et al.* 1989). As catecolaminas-*o*-quinonas são instáveis e por desprotonação do grupo amina pode ocorrer um ataque nucleófilo do átomo de azoto à posição 6 do anel quinónico, resultando na formação do leucoaminocromo após ciclização 1,4-intramolecular irreversível. O leucoaminocromo é subsequentemente oxidado à forma de semiquinona e quinona, formando o respectivo aminocromo. A velocidade deste processo metabólico depende dos grupos substituintes das catecolaminas e é por isso variável para as diferentes catecolaminas, sendo que a adrenalina apresenta maior velocidade de ciclização e consequente oxidação ao respectivo aminocromo. Já para a noradrenalina este processo é mais lento, o que faz com que o aumento do tempo de vida das catecolaminas-*o*-quinonas aumente também a probabilidade destas exercerem danos a nível intracelular. Esta velocidade de ciclização é ainda menor no caso da dopamina, o que faz aumentar grandemente a probabilidade de ligações covalentes aos locais intracelulares nucleófilos, nomeadamente os grupos tiólicos (SH), hidroxilo (OH) e amina (NH_2). Considerando as características dos substituintes das diferentes catecolaminas, incluindo a α-metildopamina e N-metil-α-metildopamina, que são metabolitos oxidativos da MDMA, pode estabelecer-se a seguinte ordem crecente de velocidade de ciclização (e inversamente de menor reactividade dos compostos quinónicos intermediários): dopamina< α-metildopamina< noradrenalina< N-metil-α-metildopamina< adrenalina (Carvalho 2004; Chavdarian *et al.* 1978; Remião 2002).

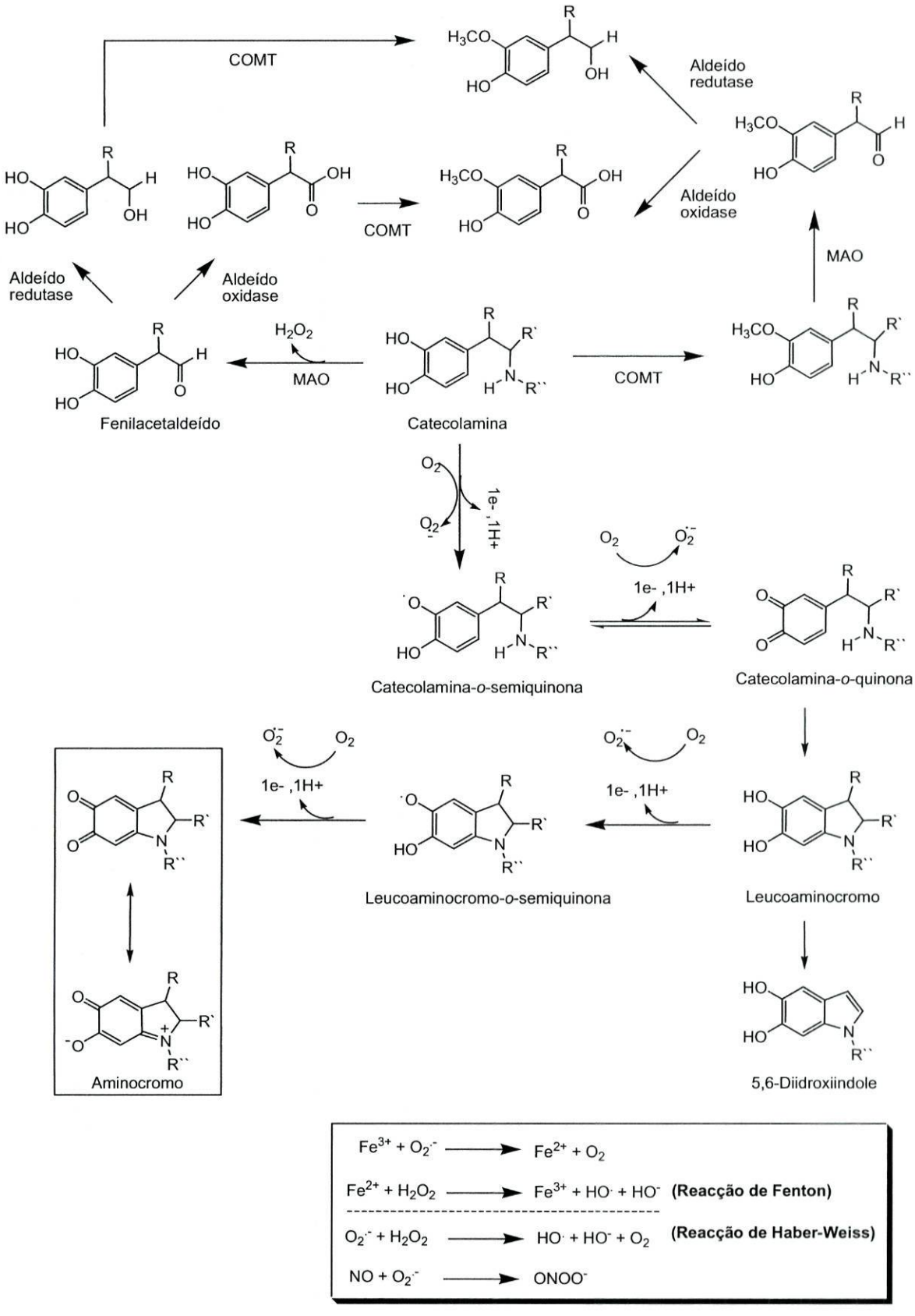


Figura 8. Esquema do metabolismo das catecolaminas e do seu processo de auto-oxidação.

Este processo de auto-oxidação das catecolaminas é extremamente lento a pH fisiológico. No entanto, existem vários catalizadores enzimáticos (por exemplo, xantina oxidase, lipoxigenase, mieloperoxidases leucocitárias e citocromo-c-oxidase) e não enzimáticos (cobre, ferro, manganês, cobalto, níquel e quelatos de cobre e de ferro) que podem facilitar a oxidação das catecolaminas (Bindoli *et al.* 1992; Carvalho 2004; Remião 2002).

A reactividade das quinonas e dos aminocromos formados durante estes processos oxidativos está directamente relacionada com a sua capacidade de entrar em ciclos REDOX com consequente formação de ROS e RNS. O radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), que resulta da redução do oxigénio molecular, origina H_2O_2 por acção da enzima superóxido dismutase (SOD) que, por sua vez, na presença de metais de transição (por exemplo, o ferro ou o cobre) sofre redução (via reacção de Fenton) originando o radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) altamente reactivo. Este radical $HO^{\cdot}$ é considerado o mais lesivo para as células, dada a sua capacidade de oxidar componentes celulares essenciais para a sobrevivência celular incluindo, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. No entanto, apesar de menos reactivo, o H_2O_2 pode atravessar as membranas biológicas, podendo causar danos em locais distintos dos da sua formação (Halliwell 1990). O $O_2^{\cdot -}$ pode ainda reagir com o monóxido de azoto (NO) levando à formação de RNS, nomeadamente do anião peroxinitrito ($ONOO^-$) que apresenta elevado potencial tóxico. Para além de desencadear por si só fenómenos de stress oxidativo (quando se esgotam os mecanismos de defesa endógenos, nomeadamente antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos) estas ROS e RNS podem também catalisar a oxidação das catecolaminas (Bindoli *et al.* 1992; Carvalho 2004; Remião 2002).

Os aminocromos são quimicamente instáveis, podendo sofrer rearranjos intramoleculares (com formação de diidroxiindoles que polimerizam originando pigmentos escuros e insolúveis denominados de melaninas), oxidações e reduções, regenerando os leucoaminocromos. A redução dos aminocromos pode ocorrer na presença de antioxidantes como por exemplo o ácido ascórbico, glutationa e cisteína, originando o intermediário semi-quinónico altamente reactivo. Esta redução pode também ocorrer por via enzimática, estando envolvidas as enzimas NADPH-citocromo-b_5-redutase, NADPH-citocromo-P450-redutase, ou ainda enzimas da cadeia respiratória na presença de NADH. A redução das quinonas e dos aminocromos pode também ser catalizada por enzimas membranares como, por exemplo, algumas flavoenzimas e a

ferrocianeto-redutase. Por acção da enzima flavoproteína DT-diaforase a redução dos aminocromos a leucoaminocromos ocorre por transferência simultânea de dois electrões do NADPH, evitando deste modo a formação dos intermediários semiquinónicos (Bindoli *et al.* 1992; Carvalho 2004; Remião 2002).

Para além da formação de ROS e RNS associadas aos respectivos ciclos REDOX, as *o*-quinonas e os aminocromos podem reagir directamente com constituintes celulares nucleófilos, formando ligações covalentes com grupos NH_2 e SH (Figura 9). Os produtos de oxidação das catecolaminas podem também, desta forma, inibir enzimas cruciais para a defesa anti-oxidante das células nomeadamente, as enzimas envolvidas no controlo homeostático da glutationa incluindo a glutationa peroxidase (GPX), glutationa redutase (GR) e a glutationa-S-transferase (GST) (Remiao *et al.* 1999; Remiao *et al.* 2002). Da reacção destes compostos com a cisteína e com a glutationa resulta também a formação de aductos (tioéteres) com elevada reactividade e potencialmente citotóxicos. Estas reacções podem ocorrer por substituição ou por adição. Para além dos grupos tiólicos, as quinonas podem reagir com grupos NH_2 formando bases de Shiff. Apesar dos grupos amina serem nucleófilos mais fracos do que os grupos tiólicos a sua abundância ao nível endógeno pode tornar este processo significativo. A possibilidade de formação de aductos entre as quinonas e as proteínas por este mecanismo não impede a continuação do processo oxidativo, nomeadamente da ciclização da *o*-quinona a aminocromo (Bindoli *et al.* 1992; Carvalho 2004; Remião 2002).

A consubstanciar este mecanismo de toxicidade, num estudo *in vitro* realizado em hepatócitos isolados de rato, foi verificada a indução de morte celular por vários compostos de natureza quinónica, sendo a morte celular precedida da diminuição dos níveis intracelulares de GSH, grupos SH proteicos e de ATP. Neste estudo a incubação com GSH e cisteína preveniu a ocorrência de morte celular (Nakagawa e Moldeus 1992).

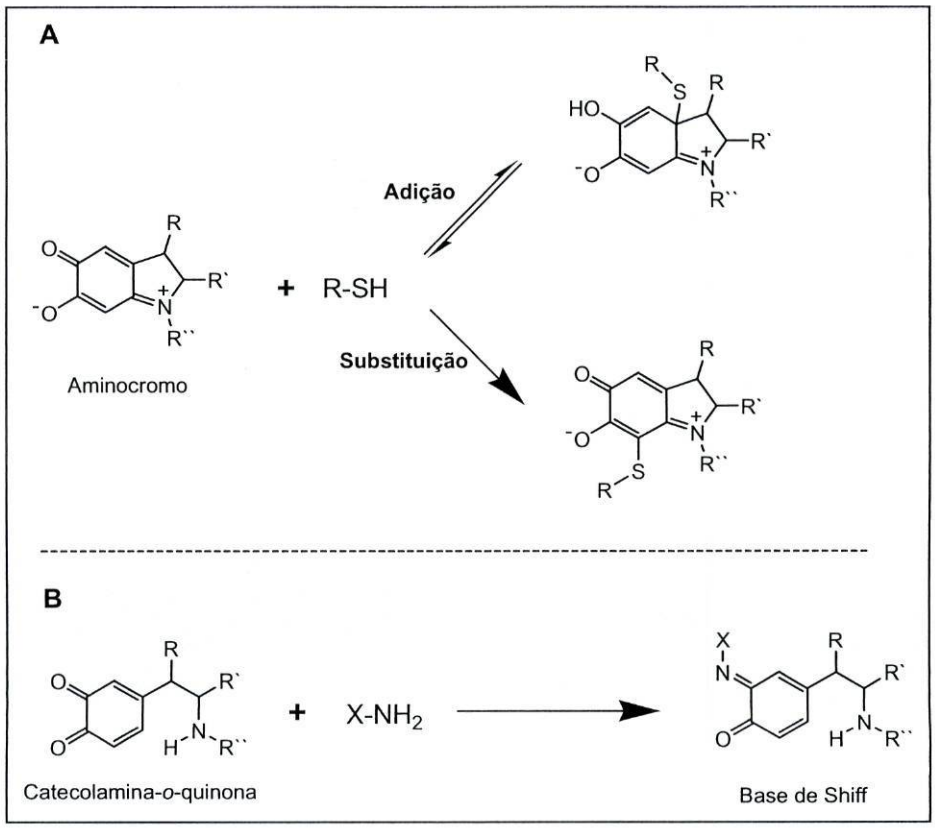


Figura 9. Reactividade dos produtos de oxidação das catecolaminas com grupos nucleófilos endógenos.

2.3.4.4.1.2. Bioactivação metabólica da MDMA

Tendo em conta o que acima foi descrito acerca da citotoxicidade associada ao processo de oxidação das catecolaminas endógenas, e dado que a principal via de metabolização *in vivo* da MDMA corresponde à desmetilenação com formação de dois metabolitos catecólicos (N-metil-α-metildopamina e α-metildopamina após N-desmetilação) é legítimo supor um papel preponderante destes metabolitos e dos produtos da sua subsequente oxidação na toxicidade da MDMA. As vias de formação destes metabolitos encontram-se esquematizadas na Figura 6. Tal como acontece com as *o*-quinonas resultantes da oxidação das catecolaminas endógenas, também a oxidação dos metabolitos catecólicos da MDMA resulta na formação de aminocromos e de aductos com a glutationa e com a cisteína (Figura 6). A reactividade dos compostos formados (quinonas, semiquinonas, aminocromos e tioéteres), o seu envolvimento em ciclos REDOX acompanhados da formação de ROS e RNS, e a capacidade de indução

de fenómenos de stress oxidativo quando se esgotam as defesas antioxidantes intracelulares, são assim mecanismos prováveis para a ocorrência de lesão celular.

Vários são já os estudos que demonstram a citotoxicidade destes compostos. O envolvimento de fenómenos de stress oxidativo na toxicidade hepatocelular induzida pela MDMA foi comprovado num estudo realizado por Beitia e colaboradores no qual se observou uma diminuição acentuada dos níveis intracelulares de GSH e de ATP em hepatócitos isolados de rato (Beitia *et al.* 1999). Esta diminuição dos níveis de glutationa hepáticos foi também observada *in vivo* em ratos (Beitia *et al.* 2000) e em ratinhos aos quais foi administrada MDMA (Carvalho *et al.* 2002a; Johnson *et al.* 2002). Uma vez que a GSH constitui uma defesa intracelular crucial para a inactivação de compostos tóxicos electrófilos, incluindo ROS e RNS (Wu *et al.* 2004), a diminuição dos níveis hepáticos de GSH pode constituir um passo inicial na acção hepatotóxica da MDMA. No entanto, permanece ainda por demonstrar se esta diminuição de GSH é por si só suficiente para originar morte celular ou se predispõe as células aos efeitos tóxicos decorrentes, por exemplo, da acção hipertérmica da MDMA. Estudos *in vitro* realizados por Carvalho e colaboradores vieram comprovar a importância do metabolismo da MDMA na expressão de hepatotoxicidade ao demonstrar que a citotoxicidade do metabolito N-metil-α-metildopamina em hepatócitos isolados de rato era superior à da MDMA nas mesmas condições experimentais (Carvalho *et al.* 2004b). A influência dos fenómenos de stress oxidativo foi também avaliada neste estudo que demonstrou a ocorrência da diminuição dos níveis intracelulares de GSH, ATP e consequente morte celular nos hepatócitos expostos à N-metil-α-metildopamina. Estes efeitos foram prevenidos pela pré-incubação dos hepatócitos com os antioxidantes ácido ascórbico e N-acetilcisteína (Carvalho *et al.* 2004b). Num outro estudo, realizado pelos mesmos autores, foi igualmente demonstrada a ocorrência de diminuição dos níveis intracelulares de GSH e ATP, a inibição de enzimas antioxidantes (nomeadamente, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa-S-transferase) e a morte celular por exposição de hepatócitos isolados de rato ao metabolito catecólico α-metildopamina (Carvalho *et al.* 2004a). Também neste estudo foi demonstrada a produção dos aductos da α-metildopamina com a glutationa. No seu conjunto, os resultados obtidos nestes estudos permitiram concluir que uma das consequências iniciais do metabolismo da MDMA na expressão da citotoxicidade hepática parece ser a interacção com a homeostasia da GSH que pode resultar em perda de funções intracelulares importantes e

desencadear a cascata de eventos que leva ao dano celular irreversível (Carvalho *et al.* 2004a).

2.3.4.4.1.3. Hipertermia

A hipertermia induzida pela MDMA pode ser, pelo menos parcialmente, responsável pela hepatotoxicidade desta droga de abuso *in vivo*. Os danos hepatocelulares observados em casos de intoxicações com MDMA são, sob vários aspectos, semelhantes aos produzidos pela hipertermia em hepatócitos isolados (Santos-Marques *et al.* 2006). Adicionalmente, a perfusão de fígado isolado com soluções hipertérmicas pode induzir stress oxidativo (Skibba *et al.* 1991). Estudos *in vitro* demonstraram também que a elevação da temperatura de incubação dos hepatócitos isolados de rato para 41 °C leva a uma diminuição significativa dos níveis de GSH intracelulares, aumento de GSSG, peroxidação lipídica e consequente morte celular (Carvalho *et al.* 1997). Carvalho e colaboradores demonstraram que a incubação de hepatócitos isolados de ratinho com MDMA em condições de hipertermia potencia os efeitos hepatotóxicos da MDMA nomeadamente, os efeitos estreitamente relacionados com os fenómenos de stress oxidativo (diminuição dos níveis de GSH, peroxidação lipídica e morte celular) (Carvalho *et al.* 2001).

2.3.4.4.1.4. Indução da apoptose

A acção pró-apoptótica da MDMA foi demonstrada em hepatócitos isolados de rato e em células hepáticas mantidas em cultura celular (linha CFSC-2G) (Montiel-Duarte *et al.* 2004; Montiel-Duarte *et al.* 2002). A apoptose induzida pela MDMA foi acompanhada por uma diminuição dos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L, libertação de citocromo c da mitocôndria e activação da caspase 3. Nas células em cultura a MDMA induziu ainda a proteólise da poli(ADP-ribose)-polimerase (PARP) (Montiel-Duarte *et al.* 2002). Estes mesmos autores estudaram também a possível influência do stress oxidativo nesta acção pró-apoptótica na linha celular CFSC-2G e

verificaram que a exposição à MDMA resultava na acumulação de ROS e na diminuição dos níveis intracelulares de GSH (Montiel-Duarte *et al.* 2004). Estes efeitos foram revertidos por acção de antioxidantes, mas a apoptose induzida pela MDMA manteve-se, o que indica que a apoptose não é causada pela ocorrência de stress oxidativo (Montiel-Duarte *et al.* 2004). A adição de GSH e do seu precursor N-acetilcisteína potenciou a acção apoptótica da MDMA (Montiel-Duarte *et al.* 2004). Pelo contrário, a inibição do citocromo P450, particularmente da isoenzima CYP2D6, com a pré-incubação das células com quinina diminuiu significativamente o efeito apoptótico da MDMA, levando os autores a concluir que a activação metabólica da MDMA pode ser determinante para a sua acção apoptótica, através de uma possível intervenção dos metabolitos conjugados com a glutationa e cisteína nestes efeitos (Montiel-Duarte *et al.* 2004). Estes autores verificaram ainda que activação do factor de transcrição NF-KB que ocorre em resposta à indução de stress oxidativo bloqueia parcialmente a acção apoptótica da MDMA (Montiel-Duarte *et al.* 2004).

2.3.4.4.2. Neurotoxicidade

O potencial neurotóxico das anfetaminas em geral e particularmente da MDMA tem sido alvo de estudo intenso. O perfil neurotóxico varia dentro desta classe de compostos, sendo que a MDMA apresenta selectividade para os neurónios serotonérgicos enquanto por exemplo, a metanfetamina é neurotóxica para os neurónios serotonérgicos e dopaminérgicos e a *d*-anfetamina moderadamente selectiva para os neurónios dopaminérgicos (Battaglia *et al.* 1988a; Battaglia *et al.* 1987; Carvalho 2004). A neurotoxicidade da MDMA parece ser condicionada pela dose, via de administração, tipo de administração (única *versus* repetida), idade, sexo e espécie (Battaglia *et al.* 1988a; Broening *et al.* 1995; Broening *et al.* 2001; Liechti *et al.* 2001; McKenna e Peroutka 1990; O'Shea *et al.* 1998; Reneman *et al.* 2001; Ricaurte *et al.* 1988; Stone *et al.* 1987).

A administração aguda de MDMA a animais de experiência em dose elevada ou em múltiplas doses moderadas induz a alteração, a longo prazo, de marcadores neuronais serotonérgicos, nomeadamente a diminuição dos níveis de serotonina, a diminuição da actividade da enzima limitante da síntese deste neurotransmissor, a

triptofano hidroxilase, e a perda dos locais de captação da serotonina (Battaglia *et al.* 1988b; Commins *et al.* 1987b; Hewitt e Green 1994; McKenna e Peroutka 1990; Ricaurte *et al.* 2000b). A estas evidências neuroquímicas de toxicidade para o sistema serotonérgico juntam-se dados obtidos da avaliação histopatológica que demonstraram neurodegeneração dos terminais nervosos serotonérgicos em resultado da exposição à MDMA, comprovando deste modo a sua acção neurotóxica a este nível (Commins *et al.* 1987b; Molliver *et al.* 1990; O'Hearn *et al.* 1988). Curiosamente, o ratinho constitui uma excepção à selectividade neurotóxica para o sistema serotonégico observada nas várias espécies animais estudadas (rato, cão, e primatas não humanos) (Commins *et al.* 1987b; Frith *et al.* 1987; Malpass *et al.* 1999; Ricaurte e McCann 1992). No ratinho, a MDMA parece afectar essencialmente o sistema nigroestriado dopaminérgico (Cadet *et al.* 1995; Stone *et al.* 1987).

Os primatas parecem ser mais susceptíveis aos efeitos neurotóxicos da MDMA do que os roedores. No macaco, a diminuição dos níveis de serotonina e a perda de locais de captação da serotonina ao nível do córtex cerebral ocorre para doses dez vezes inferiores às necessárias para produzir neurotoxicidade em ratos (Ricaurte e McCann 1992). A recuperação dos danos neuronais induzidos pela MDMA parece ser também mais demorada para os primatas. Num estudo em que foi administrada uma dose de 5 mg/kg de MDMA a macacos, duas vezes por dia e durante quatro dias consecutivos, a degeneração dos neurónios serotonérgicos foi ainda observada sete anos após a referida administração (Hatzidimitriou *et al.* 1999). Pelo contrário, nos estudos realizados no rato, a recuperação dos níveis de serotonina e dos locais de captação da serotonina ocorreu num período de quatro a doze meses após a administração (Battaglia *et al.* 1988b; Sabol *et al.* 1996). Dada a proximidade das espécies primatas ao Homem em termos de modelo de experimentação animal e particularmente de semelhança ao nível do perfil metabólico, e a proximidade das doses testadas nos referidos estudos às doses utilizadas pelos consumidores de MDMA, estes estudos são particularmente relevantes no que respeita à extrapolação para os humanos da neurotoxicidade encontrada nos primatas (Green *et al.* 2003; Ricaurte *et al.* 2000b).

A neurofarmacologia e neurotoxicidade da MDMA foram alvo de revisão detalhada por Seiden e Sabol (Seiden e Sabol 1996) e por Gudelsky e Yamamoto (Gudelsky e Yamamoto 2003). Os efeitos neurotóxicos da MDMA podem ser explicados por diversos mecanismos, que se apresentam de seguida, sem que exista até

à data um consenso acerca do exacto mecanismo pelo qual surge esta reacção tóxica à MDMA.

2.3.4.4.2.1. Formação de um metabolito tóxico da dopamina

A extensão da diminuição dos marcadores neuronais serotonérgicos parece depender da libertação de dopamina induzida pela MDMA (Nash e Brodkin 1991). Vários estudos demonstraram que a depleção da dopamina por acção do inibidor da tirosina hidroxilase, α-metil-*p*-tirosina, ou a destruição dos terminais dopaminérgicos por acção da 6-hidroxidopamina, atenuavam a depleção de serotonina cerebral e a subsequente degeneração serotonérgica resultante da administração de MDMA (Brodkin *et al.* 1993; Schmidt *et al.* 1990c; Stone *et al.* 1988). A administração de antagonistas dos receptores serotonérgicos do subtipo 5-HT_{2A} exerce os mesmos efeitos ao prevenir a estimulação da síntese da dopamina (Nash *et al.* 1990; Schmidt *et al.* 1991) (Schmidt *et al.* 1990a). Pelo contrário, a administração de agonistas destes receptores potenciou o efluxo de dopamina induzido pela MDMA e o efeito tóxico nos neurónios serotonérgicos (Gudelsky *et al.* 1994; White *et al.* 1996). Com efeito, os níveis de dopamina podem aumentar como resultado da estimulação dos receptores pós-sinápticos serotonérgicos do subtipo 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} localizados nos neurónios GABAérgicos. Da activação destes receptores resulta a diminuição dos níveis de GABA e estimulação da síntese e libertação de dopamina (Yamamoto *et al.* 1995).

O mecanismo pelo qual a dopamina pode contribuir para a degeneração dos neurónios serotonérgicos envolve a sua captação em excesso do espaço sináptico para o interior dos neurónios com níveis diminuídos de serotonina. No interior dos terminais nervosos, a dopamina pode então entrar em processos oxidativos, conduzindo à formação de espécies reactivas e potencialmente citotóxicas (Sprague *et al.* 1998).

A influência da oxidação das catecolaminas na citotoxicidade da MDMA foi já abordada aquando da descrição dos mecanismos de hepatotoxicidade. No caso concreto da dopamina, a sua metabolização pela MAO-B nos terminais nervosos serotonérgicos resulta na produção de H_2O_2 que, por sua vez, origina $HO^{\cdot}$ por via da reacção de Fenton (Wink *et al.* 1994). Quando, ao nível intracelular, se esgotam as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, a dopamina pode entrar num processo de oxidação com

a formação de espécies altamente reactivas (quinonas, semi-quinonas, aminocromos, tioéteres, ROS e RNS) que podem danificar macromoléculas essenciais à sobrevivência da célula como, por exemplo, lípidos, proteínas e DNA, dada a sua capacidade de reacção com os locais nucleófilos intracelulares (Cadet e Brannock 1998; Hastings *et al.* 1996).

A toxicidade dos aminocromos da dopamina para neurónios de ratinho em cultura foi demonstrada por Arriagada e colaboradores (Arriagada *et al.* 2000). Vários estudos têm vindo a consubstanciar este mecanismo de toxicidade ao demonstrar a ocorrência de fenómenos de stress oxidativo e o efeito protector exercido por agentes antioxidantes (ácido ascórbico e cisteína) e sequestradores de espécies radicalares (α-fenil-N-*terc*-butilnitrona) (Colado e Green 1995; Colado *et al.* 1999c; Colado *et al.* 1997; Gudelsky 1996; Shankaran *et al.* 1999b; Stone *et al.* 1988). A formação de $HO^{\cdot}$ após a administração intracerebroventricular de MDMA foi também demonstrada *in vivo*, bem como a redução dos níveis de ácido ascórbico e vitamina E a nível cerebral em ratos aos quais foi administrada MDMA (Colado *et al.* 1999b; Colado *et al.* 1997; Shankaran *et al.* 1999a, 1999b, 2001). Estudos realizados com ratinhos transgénicos que expressam a enzima humana SOD dependente do cobre e do zinco (CuZnSOD) e que é crucial na inactivação do $O_2^{\cdot -}$, demonstraram que estes animais são mais resistentes aos efeitos neurotóxicos da MDMA (Cadet *et al.* 1994; Jayanthi *et al.* 1999). A administração *in vivo* de um inibidor da MAO-B, *l*-deprenil, preveniu a peroxidação lipídica e a depleção de serotonina induzidas pela MDMA em ratos, o que confirma o envolvimento da dopamina e do seu metabolismo oxidativo nos efeitos neurotóxicos da MDMA (Sprague e Nichols 1995).

2.3.4.4.2.2. Formação de metabolitos tóxicos da MDMA

Foi já descrito o modo como a activação metabólica da MDMA pode resultar na formação de espécies altamente reactivas e dotadas de elevado potencial citotóxico. Vários autores têm proposto que os catecóis e quinonas resultantes do metabolismo oxidativo da MDMA podem ter um papel crucial no desenvolvimento de neurotoxicidade (Chu *et al.* 1996; Colado *et al.* 1995; Johnson *et al.* 1991; Monks e Lau 1998; Tucker *et al.* 1994). A comprovar esta teoria está o facto da MDMA e o seu

metabolito N-desmetilado, MDA, quando injectadas directamente no cérebro de animais de experiência não desenvolverem sinais de neurotoxicidade, o que sugere a intervenção da activação metabólica nestes efeitos (de la Torre *et al.* 2004b; Esteban *et al.* 2001; Monks *et al.* 2004). Foi então estudada a possível acção neurotóxica dos metabolitos catecólicos da MDMA e MDA, a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA, respectivamente, bem como dos seus derivados monometilados resultantes do metabolismo pela COMT. Após administração periférica de N-Me-α-MeDA a ratinhos foi possível detectar a sua presença a nível cerebral, o que indica que este metabolito tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (Escobedo *et al.* 2005). Estes estudos revelaram que a administração destes compostos directamente a nível cerebral também não produzia sinais de neurotoxicidade semelhantes aos observados com a administração sistémica da MDMA, e como tal, indicando que estas espécies não estavam directamente envolvidas na ocorrência de lesão neuronal (de la Torre *et al.* 2004b; Johnson *et al.* 1992; McCann e Ricaurte 1991; Monks *et al.* 2004). Outros dois metabolitos da MDMA que também foram testados, os derivados triidroxilados (triidroxianfetamina e triidroximetanfetamina), demonstraram exercer toxicidade quer para os neurónios serotonérgicos quer para os neurónios dopaminérgicos, não exibindo a neuroselectividade característica da MDMA (Johnson *et al.* 1992; Zhao *et al.* 1992).

Pelo contrário, a injecção directa no cérebro de rato dos conjugados da α-MeDA com a GSH [5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA] e com a N-acetilcisteína [5-(N-acetilcistein-S-il)-α-MeDA] produziu uma diminuição acentuada dos níveis de serotonina sem alterações dos níveis de dopamina ou de noradrenalina (Bai *et al.* 1999; Miller *et al.* 1997). Sendo estes tioéteres compostos hidrófilos com pequena capacidade para atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), seria pouco provável que a sua formação sistémica pudesse induzir neurotoxicidade. No entanto, Monks e Lau, propuseram um mecanismo de transporte para estes conjugados que permite a sua passagem através da BHE por intermédio de transportadores da GSH localizados na membrana endotelial (Monks e Lau 1997). Uma vez no cérebro o conjugado pode sofrer a acção da enzima γ-glutamiltranspeptidase (γ-GT) e de dipeptidases, originando o conjugado cisteína-polifenol que é convertido no conjugado N-acetilcisteína-polifenol (Miller *et al.* 1995; Monks e Lau 1997). O conjugado 5-(N-acetilcisteín-S-il)-α-MeDA parece ser mais reactivo do que os seus precursores 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 5-(cisteín-S-il)-α-MeDA por ser eliminado mais lentamente

e estar impossibilitado de ciclizar internamente mantendo assim a sua actividade REDOX (Bai *et al.* 1999; Monks e Lau 1997).

Alternativamente, e embora com menor expressão do ponto de vista quantitativo, o conjugado com a cisteína, resultante da acção da γ-GT e das dipeptidases presentes em grande quantidade na membrana endotelial da BHE, pode também ser transportado através das células endoteliais por transportadores específicos para aminoácidos (Monks e Lau 1997).

A corroborar estes estudos verificou-se que a inibição da γ-GT potencia a depleção de serotonina e do seu metabolito 5-HIAA induzida pela administração de MDA ou de MDMA (Bai *et al.* 2001). A inibição da γ-GT pode diminuir o metabolismo dos conjugados ao nível do lúmen dos capilares cerebrais e aumentar desta forma o transporte dos conjugados através dos transportadores endoteliais de GSH (Bai *et al.* 2001). Os próprios conjugados podem inibir a actividade da γ-GT, o que provavelmente contribui para o aumento do seu transporte ao nível cerebral (Monks e Lau 1998).

Capela e colaboradores avaliaram recentemente a neurotoxicidade destes conjugados *in vitro*, em culturas de neurónios de ratos, e demonstraram que os metabolitos catecólicos α-MeDA e N-Me-α-MeDA e o conjugado 5-(glutation-S-il)-α-MeDA são mais neurotóxicos do que a MDMA nas mesmas condições experimentais, sendo o conjugado com a GSH a espécie mais neurotóxica (Capela *et al.* 2006a). A morte celular observada neste estudo ocorreu por processos apoptóticos e foi grandemente potenciada quando as culturas celulares foram submetidas a condições de hipertermia (Capela *et al.* 2006a).

2.3.4.4.2.3. Influência da serotonina e dos seus metabolitos

A neurotoxicidade da MDMA pode também envolver a libertação da serotonina ou de um metabolito tóxico capaz de ser transportado pelos transportadores serotonérgicos, como por exemplo, a neurotoxina 5,6-diidroxitriptamina ou a triptamina-4,5-diona (Commins *et al.* 1987a; Crino *et al.* 1989).

A atenuação dos efeitos neurotóxicos da MDMA por antagonistas dos receptores serotonérgicos do subtipo 5-HT_{2A} sugere o envolvimento destes receptores nestes efeitos de neurotoxicidade (Schmidt *et al.* 1990a; Schmidt *et al.* 1991). A influência da

estimulação dos receptores do subtipo 5-HT_{2A} e dos fenómenos de stress oxidativo foram recentemente estudados *in vitro* em culturas de neurónios de rato (Capela *et al.* 2006b). Recorrendo a agonistas e antagonistas destes receptores, foi demonstrado neste estudo que da sua estimulação resultava morte neuronal por via apoptótica (Capela *et al.* 2006b). O uso de agentes sequestradores de espécies radicalares, de um inibidor da enzima sintetase do NO, e de um inibidor dos receptores NMDA protegeu os neurónios, em todos estes casos, do efeito de morte celular induzido pela MDMA, ficando assim demonstrada a participação de fenómenos de stress oxidativo na neurodegeneração associada à exposição à MDMA (Capela *et al.* 2006b). O envolvimento das vias apoptóticas na neurotoxicidade da MDMA e de outras anfetaminas, incluindo a *d*-anfetamina, foi já demonstrada *in vitro* num estudo em neurónios corticais de rato conduzido por Stumm e cloboradores, onde foi observado que a morte neuronal após exposição à *d*-anfetamina foi acompanhada por quebras de DNA, expressão diferencial das variantes anti- e pró-apoptóticas bcl-$x_{L/S}$ e indução de factores de transcrição associados ao stress celular (c-jun e p97) (Stumm *et al.* 1999).

Kramer e colaboradores propuseram um mecanismo que envolvia a translocação e activação da proteína cínase C (PKC) associado ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Kramer *et al.* 1998). Foi também demonstrado que a utilização de um bloqueador de canais de cálcio do tipo L protegia da toxicidade induzida pela MDMA, o que indica que o cálcio intracelular pode ser de facto determinante nos processos de citotoxicidade induzidos pela MDMA ao nível neuronal (Farfel *et al.* 1992).

Para além do envolvimento directo dos receptores 5-HT_{2A} na expressão de toxicidade, estes são, como foi já referido, responsáveis pelo aumento da libertação de dopamina com todas as consequências que daí podem advir em termos de desencadeamento de toxicidade. Outro mecanismo proposto que envolve estes receptores consiste no aumento da actividade da enzima fosforílase do glicogénio que resulta da activação dos receptores serotonégicos do subtipo 5-HT_{2A} (Poblete e Azmitia 1995). O glicogénio é a principal fonte de energia no cérebro pelo que a diminuição das reservas energéticas sinápticas resultantes da glicogenólise induzida por esta via pode também contribuir para a degeneração neuronal (Darvesh *et al.* 2002; Poblete e Azmitia 1995).

2.3.4.4.2.4. Influência da temperatura

A temperatura corporal parece também ter um importante papel na neurotoxicidade da MDMA. Vários são os estudos que demonstram que a supressão do efeito hipertérmico da MDMA, quer pelo uso de compostos que induzem hipotermia, quer pelo abaixamento da temperatura ambiente, previne o seu efeito neurotóxico (Broening *et al.* 1995; Colado *et al.* 1999a; Farfel e Seiden 1995; Malberg *et al.* 1996).

Nos estudos *in vitro* realizados por Capela e colaboradores para a avaliação da neurotoxicidade da MDMA e dos seus metabolitos catecólicos e conjugados com a GSH, os efeitos neurotóxicos observados foram significativamente potenciados pela incubação das células neuronais em condições hipertérmicas (Capela *et al.* 2006a; Capela *et al.* 2006b).

Os estudos realizados por Yuan e colaboradores demonstraram que a administração a ratos de reserpina e α-metil-*p*-tirosina, que diminuem drasticamente as reservas vesiculares e citoplasmáticas de dopamina, não protegia os neurónios serotonérgicos da acção da MDMA se a temperatura corporal fosse mantida elevada, o que indica uma menor importância dos efeitos da libertação de dopamina e uma maior influência da hipertermia na indução de neurotoxicidade (Yuan *et al.* 2002).

No entanto, a contribuição da hipertermia para o desenvolvimento de neurotoxicidade parece ser apenas parcial uma vez que a neurotoxicidade pode ocorrer mesmo na ausência de hipertermia (Farfel e Seiden 1995; O'Shea *et al.* 1998). Por outro lado, alguns compostos como por exemplo a fluoxetina, protegem dos efeitos neurotóxicos da MDMA sem que haja supressão do efeito hipertérmico (Malberg *et al.* 1996).

2.3.4.4.2.5. Influência do glutamato e do monóxido de azoto

Ao contrário do que acontece com outras anfetaminas como, por exemplo, a *d*-anfetamina e a metanfetamina, a MDMA não induz o aumento dos níveis de glutamato, cuja presença em elevadas quantidades na fenda sináptica leva à morte neuronal (Johnson *et al.* 1989; Nash e Yamamoto 1992; White *et al.* 1994; White *et al.* 1996). Deste modo, a protecção conferida por alguns antagonistas dos receptores NMDA

parece dever-se ao efeito hipotérmico induzido por esses antagonistas (Colado *et al.* 1998; Farfel e Seiden 1995).

A formação de NO parece ser importante na mediação dos efeitos neurotóxicos do glutamato uma vez que o inibidor da sintetase do NO (NOS), o éster metílico N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) é capaz de atenuar os efeitos citotóxicos do glutamato *in vitro* (Gunasekar *et al.* 1995). Da mesma forma, a toxicidade exercida por agonistas dos receptores NMDA parece ser atenuada em neurónios obtidos de ratinhos com deficiência neuronal de NOS (Dawson *et al.* 1996). A formação intracelular de NO como consequência da sobrestimulação dos receptores NMDA parece resultar do aumento do influxo de cálcio originado por essa estimulação e consequente estimulação da NOS dependente da calmodulina (Dawson *et al.* 1993; Luo e Vincent 1994). O NO assim formado reage com o $O_2^{\cdot-}$ levando à formação do anião $ONOO^-$ e de vários outros compostos com elevado potencial neurotóxico (Moncada *et al.* 1991).

Estudos que suportam este mecanismo envolvendo o NO foram realizados em rato, tendo sido demonstrado que a inibição da NOS protegia dos efeitos neurotóxicos da MDMA (Taraska e Finnegan 1997; Zheng e Laverty 1998). No entanto, o inibidor utilizado induziu hipotermia não sendo por isso possível dissociar os dois efeitos (Taraska e Finnegan 1997). Por outro lado, a presença de L-NAME em células serotonérgicas humanas mantidas em cultura atenuou a citotoxicidade induzida pela MDMA (Simantov e Tauber 1997). Também nos estudos realizados por Capela e colaboradores a incubação de células neuronais de rato em cultura, com um inibidor da NOS e com um inibidor dos receptores NMDA protegeu do efeito de morte celular induzido pela MDMA (Capela *et al.* 2006b).

Estudos *in vivo* mais recentes demonstraram um efeito protector do inibidor da NOS, S-metil-L-tiocitrulina (S-MTC), na depleção de serotonina induzida pela administração sistémica de MDMA, sem que este tenha atenuado o efeito hipertérmico da MDMA (Darvesh *et al.* 2005). Neste estudo foi também demonstrado que a administração sistémica de MDMA aumentou significativamente as concentrações cerebrais de NO e de nitrotirosina, levando os autores a concluir que a produção de RNS induzida pela MDMA contribui para a sua neurotoxicidade (Darvesh *et al.* 2005).

2.3.4.4.3. Toxicidade para o sistema cardiovascular

O aumento da libertação de catecolaminas e de serotonina na fenda sináptica e na corrente sanguínea induzido pela MDMA parece estar envolvido nos respectivos efeitos ao nível do sistema cardiovascular. O padrão histológico da cardiotoxicidade observada em estudos patológicos *post-mortem* em casos de intoxicações fatais com a MDMA é indiferenciável do padrão observado com as catecolaminas (Milroy *et al.* 1996).

O aumento das concentrações plasmáticas das catecolaminas pode exercer vários efeitos cardiotóxicos, incluindo alterações dos electrólitos, alterações estruturais e bioquímicas das membranas celulares, resultando em espasmos coronários, arritmias, disfunções contrácteis, danos celulares e necrose do miocárdio [(Carvalho 2004; Remião 2002) e suas referências].

A serotonina é a amina com acção vasoconstritora mais potente ao nível da circulação cerebral, especialmente nas artérias de grande e médio calibre, pelo que o aumento da libertação de serotonina induzido pela MDMA pode estar na origem da ocorrência de acidente vascular cerebral isquémico [(Carvalho 2004) e suas referências].

A activação dos receptores α-adrenérgicos e serotonérgicos do tipo 5-HT_2 parecem estar envolvidos no aumento da pressão arterial que a MDMA induz em animais de experiência (McDaid e Docherty 2001). Os efeitos arritmogénicos da MDMA parecem ser também inibidos pela administração de β-bloqueadores (propranolol) e de inibidores da captação neuronal de serotonina (desipramina) (Fitzgerald e Reid 1994).

Os mecanismos associados às acções tóxicas das catecolaminas incluem a hipóxia, insuficiência coronária, alterações hemodinâmicas e metabólicas. Também o processo de oxidação das catecolaminas, pelos mecanismos atrás referidos, pode ser crucial para o desenvolvimento da toxicidade das catecolaminas e, consequentemente da MDMA, ao nível cardiovascular (Carvalho 2004; Remião 2002).

2.3.4.4.3.1. Hipóxia e alterações hemodinâmicas

O aumento do ritmo cardíaco por activação dos receptores β-adrenérgicos causa um aumento drástico da necessidade de oxigénio ao nível do miocárdio, o que pode conduzir a uma situação de hipoxia que, por sua vez, pode ser agravada pela redução do fornecimento de oxigénio como resultado da vasoconstrição coronária induzida pelas catecolaminas (Carvalho 2004; Remião 2002).

2.3.4.4.3.2. Efeitos metabólicos

A cardiotoxicidade resultante do aumento da libertação de catecolaminas pode também ter origem nas alterações ao nível do consumo de oxigénio, produção energética e metabolismo lipídico induzidas por estes neurotransmissores.

O fenómeno de oxidação das catecolaminas (associado ao fenómeno de "desperdício de oxigénio" ou *oxygen wasting*), e as alterações hemodinâmicas e da função cardíaca contribuem, no seu conjunto, para o aumento do consumo de oxigénio (Carvalho 2004; Remião 2002).

Um outro mecanismo associado à cardiotoxicidade das catecolaminas é o fenómeno de desacoplamento mitocondrial. O aumento do conteúdo de catecolaminas no miocárdio está associado à diminuição da razão entre o ADP adicionado à mitocôndria e o oxigénio consumido (razão P/O). A alteração desta razão P/O foi atribuída ao processo de oxidação das catecolaminas, nomeadamente à formação de aminocromos e outros metabolitos oxidativos (Carvalho 2004; Remião 2002). Desta forma, o desacoplamento mitocondrial pode estar envolvido no fenómeno de "desperdício de oxigénio" e na depleção das reservas energéticas do miocárdio que resultam da acção das catecolaminas (Behonick *et al.* 2001).

O fenómeno de lipólise induzido pelas catecolaminas resulta da activação dos receptores β-adrenégicos dos tipos β_1 e β_2 no tecido adiposo branco e do tipo β_3 no tecido adiposo castanho (Carvalho 2004; Webber e Macdonald 2000). As alterações lipídicas assim originadas podem estar associadas ao desacoplamento mitocondrial, embora o aumento de ácidos gordos livres não pareça ser a primeira causa deste efeito (Carvalho 2004; Remião 2002). As alterações no metabolismo lipídico podem, por

outro lado, influenciar a composição das membranas celulares através do aumento do conteúdo membranar em ácido araquidónico, afectando deste modo a actividade de proteínas membranares (Grynberg *et al.* 1996). Também a peroxidação dos lípidos libertados pode contribuir para a necrose associada às catecolaminas (Mohan e Bloom 1999; Remião 2002).

2.3.4.4.3.3. Alterações electrolíticas e sobrecarga do cálcio intracelular

Os danos celulares no miocárdio parecem ser influenciados pela alteração no seu conteúdo em catiões potássio (K^+) e magnésio (Mg^{2+}). A perda destes dois catiões no miocárdio parece ocorrer em situações de deficiência de oxigénio ou de energia. A diminuição dos níveis de Mg^{2+} resulta na inibição da actividade de enzimas importantes nas reacções de transferência de grupos fosfato e na utilização de ATP, e no aumento da captação de cálcio (Ca^{2+}) pela mitocôndria que pode por sua vez levar ao desacoplamento mitocondrial (Carvalho 2004; Remião 2002).

O Ca^{2+} parece ser crucial para a cardiotoxicidade das catecolaminas libertadas por acção da MDMA. Por activação dos receptores β-adrenérgicos ocorre a formação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) que subsequentemente activa os canais de cálcio do tipo L no sarcolema, conduzindo a um aumento drástico da concentração intracelular de Ca^{2+} livre (Carvalho 2004; Remião 2002; Tappia *et al.* 2001). Esta sobrecarga de Ca^{2+} intracelular pode ser extremamente lesiva para a célula ao induzir a diminuição dos níveis energéticos, alterações do citoesqueleto, aumentar a produção de ROS, e activar enzimas que incluem fosfatases, fosfolipases, proteases e endonucleases (Carvalho 2004; Orrenius *et al.* 1989; Remião 2002).

2.3.4.4.3.4. Fenómenos de stress oxidativo

Tal como foi já descrito, o processo de oxidação das catecolaminas pode conduzir a fenómenos de stress oxidativo através da formação de espécies dotadas de

alta reactividade e que incluem catecóis, quinonas, semi-quinonas, aminocromos e tioéteres, que são por sua vez acompanhadas da formação de ROS e RNS cuja citotoxicidade é bem conhecida (Carvalho 2004; Remião 2002). Este mecanismo é também importante nas células cardíacas.

Os aminocromos, para além da sua capacidade de oxidar grupos sulfidrilo proteicos, induzir desacoplamento mitocondrial, inibir enzimas (entre as quais a MAO e a COMT), podem também alterar o fluxo de Ca^{2+} como resultado da inibição da bomba sarcoplasmática de Ca^{2+}, da inibição do sistema antiporte Na_{+}/Ca^{2+}, da acumulação de Ca^{2+} ao nível mitocondrial, e da actividade da bomba sarcoplasmática Na^{+}/K^{+} (Carvalho 2004; Remião 2002). A posterior oxidação e polimerização dos aminocromos resulta na formação de compostos insolúveis denominados de melaninas que são também indutores de cardiotoxicidade e têm sido associados a determinadas patologias como, por exemplo, alcaptonúria, artrite, feocromocitoma, hipertensão primária, carcinogenicidade, doença renal crónica, diabetes mellitus, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e fenómenos de envelhecimento (Carvalho 2004; Hegedus 2000; Remião 2002). Os metabolitos oxidativos das catecolaminas e as espécies radicalares formadas durante o respectivo processo de oxidação podem estar, deste modo, envolvidos na cardiotoxicidade induzida pelas catecolaminas.

2.3.4.4.3.5. Efeito directo da MDMA e dos seus metabolitos

Estudos *in vitro* efectuados com a metanfetamina em culturas de cardiomiócitos demonstraram a indução de cardiotoxicidade também nestas células isentas de catecolaminas (He 1995; Welder 1992). Do mesmo modo, pode ser antecipada a intervenção directa da MDMA e/ou dos seus metabolitos no mecanismo de cardiotoxicidade induzida por esta droga de abuso. Dada a estrutura catecólica dos metabolitos resultantes da desmetilenação da MDMA e as vias do seu metabolismo oxidativo com formação de intermediários altamente reactivos, de ROS e RNS, é legítimo concluir que este mecanismo de toxicidade possa ser também importante ao nível cardíaco. Estudos *in vitro* realizados em cardiomiócitos isolados de rato por Carvalho e colaboradores confirmam esta hipótese (Carvalho *et al.* 2004c). Neste estudo foi verificado que os metabolitos catecólicos, α-MeDA, e principalmente a N-Me-α-

MeDA, induzem toxicidade nestas células que se caracteriza por uma diminuição da viabilidade celular, acompanhada pela diminuição dos níveis intracelulares de GSH, aumento do Ca^{2+} intracelular, diminuição dos níveis de ATP, inibição de importantes enzimas antioxidantes (GPX, GR e GST) e formação dos respectivos aminocromos (Carvalho *et al.* 2004c). Estes efeitos não foram observados com a exposição das células à MDMA e à MDA nas mesmas condições experimentais, o que levou à conclusão de que a activação metabólica da MDMA é importante para a expressão dos seus efeitos cardiotóxicos (Carvalho *et al.* 2004c).

2.3.4.4.3.6. Outros efeitos

Os factores comportamentais e ambientais associados ao consumo de MDMA podem aumentar o risco de complicações cardiovasculares, por exemplo, quando a ingestão da MDMA ocorre em ambientes com elevadas temperaturas, com níveis de ruído elevado e quando é acompanhado de exercício muscular vigoroso. A exposição a níveis elevados de ruído potencia por si só a ocorrência de modificações ultraestruturais, particularmente mitocondriais, em corações de ratinhos aos quais foi administrada MDMA de forma repetida por via intraperitoneal (Gesi *et al.* 2002a; Gesi *et al.* 2002b).

Quando a intoxicação com MDMA está associada à ocorrência de rabdomiólise, a hipercalémia resultante da libertação de K^+ que lhe está associada pode também contribuir para o desenvolvimento de arritmias (Greene *et al.* 2003; Paterson 1996).

Por outro lado, a existência prévia de patologia ao nível cardiovascular como, por exemplo, cardiomiopatias, doença coronária e arritmias funcionais, constituem um factor de risco adicional para a ocorrência de efeitos cardiotóxicos causados pela ingestão de MDMA (Dowling *et al.* 1987).

2.3.4.4.4. Rabdomiólise

A ocorrência de rabdomiólise está particularmente associada ao consumo de MDMA por jovens, após exercício muscular vigoroso e exaustivo em ambientes

quentes e sobrelotados, característicos das festas *rave* (Greene *et al.* 2003; Henry *et al.* 1992; Screaton *et al.* 1992). A rabdomiólise resulta na libertação de mioglobina, potássio, fósforo, creatinina, ADP, e enzimas musculares como por exemplo, a creatina fosfocinase (CK) e a transaminase glutâmica-oxaloacética (GOT) (Cunningham 1997; Kendrick *et al.* 1977). A sintomatologia característica da rabdomiólise inclui dores musculares violentas, fraqueza muscular e coloração acastanhada da urina. A rabdomiólise caracteriza-se por uma lesão do músculo esquelético com libertação do conteúdo dos miócitos para o plasma. Os factores associados ao consumo de MDMA que podem conduzir à ocorrência de rabdomiólise incluem o exercício muscular intenso, hipertermia, hipermetabolismo celular, diminuição da perfusão muscular, coagulopatia e hipotensão sistémica (Kendrick *et al.* 1977; Terada *et al.* 1988). A análise histopatológica do músculo esquelético em casos de intoxicação com MDMA revelou a presença de edema com infiltrados inflamatórios, hipercontracção das fibras musculares e desarranjo da arquitectura celular (Fineschi *et al.* 1999). A análise histológica do músculo *soleus* de ratinhos submetidos a exercício durante um período de 24 h após administração de MDMA mostrou a presença de infiltrados leucocitários e o alargamento do espaço intersticial (Duarte *et al.* 2005).

A rabdomiólise envolve frequentemente o miocárdio e a libertação de K^+ ao nível do músculo cardíaco pode conduzir a arritmias (Screaton *et al.* 1992). A libertação de CK, creatinina e ADP pode induzir agregação plaquetária que pode também ter origem na acção da MDMA no aumento da libertação da hormona ADH e das catecolaminas (Filep e Rosenkranz 1987; Kendrick *et al.* 1977). Para além da agregação plaquetária, a libertação de um activador do plasminogénio muscular e a hipertermia podem, no seu conjunto, provocar um aumento da fibrinólise que conduz a um estado de coagulação intravascular disseminada (CID), que contribui para o desenvolvimento de toxicidade renal (Chadwick *et al.* 1991; Terada *et al.* 1988). A libertação de mioglobina ou dos produtos da sua degradação causam também obstrução e degeneração tubular. Por outro lado, a mioglobina parece igualmente causar lesão renal através de mecanismos de stress oxidativo (Holt e Moore 2001; Ishigami *et al.* 2003).

Do que acima se descreve pode ser concluído que a indução de rabdomiólise está associada aos efeitos de cardiotoxicidade e nefrotoxicidade da MDMA.

2.3.4.4.5. Toxicidade renal

Os danos renais associados ao consumo de MDMA incluem a falência renal aguda e crónica, a vasculite renal necrosante e a lesão aguda dos túbulos proximais. Os factores que podem contribuir para o dano renal induzido pela MDMA incluem, CID, vasoconstrição renal, hipotensão, hipertermia e a rabdomiólise (Kendrick *et al.* 1977; Terada *et al.* 1988) (Figura 10).

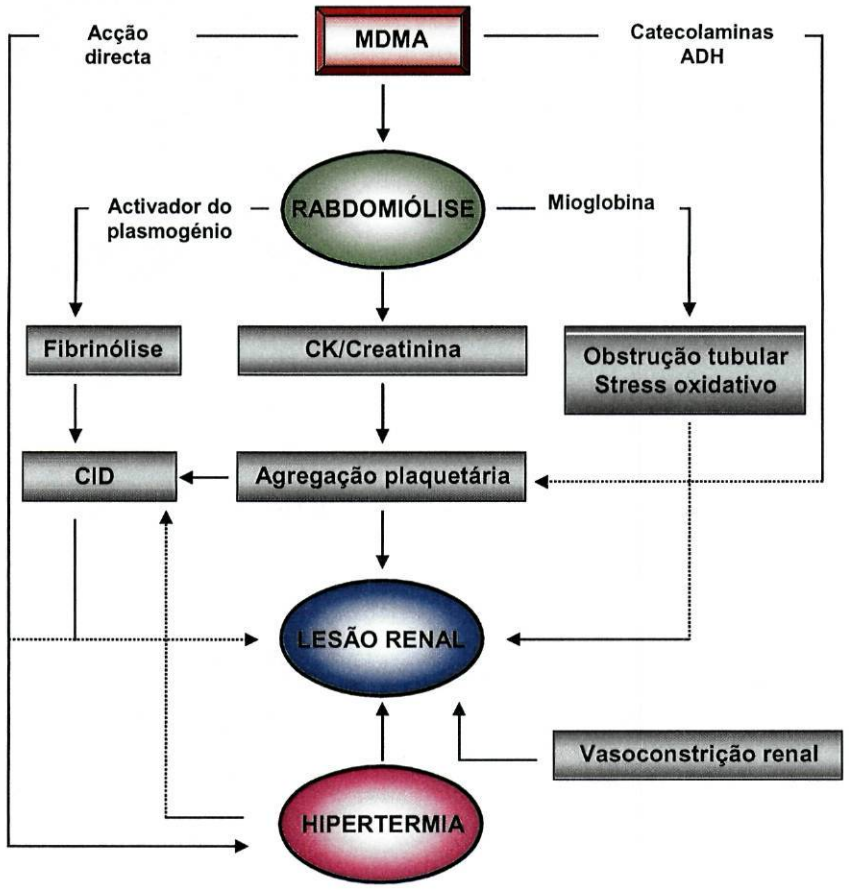


Figura 10. Representação esquemática dos mecanismos propostos para a rabdomiólise e lesão renal induzidas pela MDMA. Adaptado de (Carvalho 2004).

O envolvimento da CID e rabdomiólise no desenvolvimento de toxicidade renal, nomeadamente na isquemia renal súbita e na necrose tubular aguda, pode ser devido à obstrução da microvasculatura e degeneração tubular resultantes da deposição de agregados plaquetários, mioglobina ou dos seus produtos de degradação (Cunningham 1997; Fineschi e Masti 1996). Assim parece indicar a presença de mioglobina nos túbulos proximais, de agregados de fibrina nos glomérulos renais e de necrose tubular aguda observada em casos de intoxicações fatais com MDMA.

Um outro mecanismo importante para o desenvolvimento da acção nefrotóxica da MDMA pode resultar da acção tóxica directa desta droga de abuso e/ou dos seus metabolitos, o que é consubstanciado pela ocorrência de nefrotoxicidade na ausência de hipertermia e de lesão muscular (Foley *et al.* 1984).

A acção nefrotóxica da MDMA pode então passar pela sua activação metabólica ao nível hepático com formação dos metabolitos catecólicos e a sua posterior conjugação com a GSH. Estes conjugados podem sofrer reacções de metabolismo de fase III por acção da enzima γ-GT, que existe em elevada quantidade no rim, da enzima dipeptidase e da enzima N-acetiltransferase, resultando na formação de conjugados com a cisteína e com a N-acetilcisteína (Carvalho 2004). Estes conjugados podem, tal como foi já anteriormente referido, originar ciclos REDOX ou, alternativamente, atacar locais nucleófilos intracelulares e causar deste modo necrose celular também ao nível renal.

A nefrotoxicidade destes conjugados polifenólicos com a GSH foi já demonstrada em animais de experiência, sendo consequência da actividade particularmente elevada da γ-GT na membrana apical das células tubulares proximais renais (PTC) (Monks e Lau 1997, 1998). As reacções de hidrólise ou transpeptidação catalisadas por esta enzima ocorrem a nível extracelular sendo o produto desta reacção, o dipéptido cisteinilglicina, substrato para as dipeptidases que apresentam a mesma localização celular. Os conjugados com a cisteína são transportados através da membrana das células epiteliais do túbulo proximal pelo sistema de transporte de aminoácidos, exercendo assim toxicidade no interior da célula pelo mecanismo já referido de stress oxidativo e pela sua capacidade de interacção directa por ataque electrófilo a macromoléculas essenciais à sobrevivência celular (Monks e Lau 1997). Ao nível intracelular o conjugado com a cisteína pode sofrer acetilação por acção da enzima N-acetiltransferase e ser posteriormente convertido no seu derivado mercaptúrico ou sofrer a acção da enzima β-liase com formação de um tiol reactivo (Monks e Lau 1997). Este tiol, que tem sido implicado na nefrotoxicidade de vários conjugados com a GSH e com a cisteína, pode ser inactivado pela enzima S-metiltransferase (van Bladeren 2000) (Figura 11).

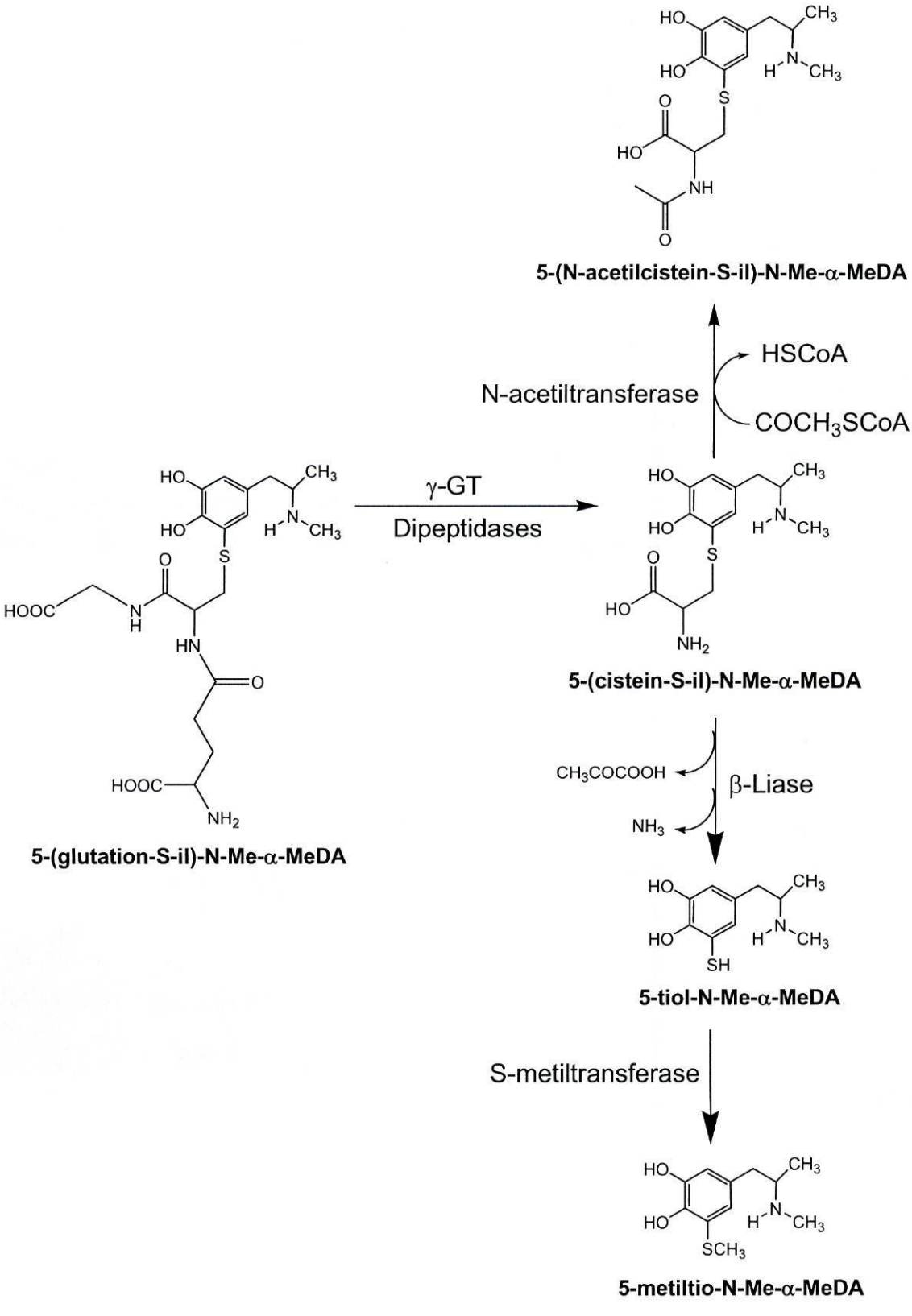


Figura 11. Metabolismo do conjugado da N-metil-α-metildopamina com a GSH.

Um estudo *in vitro* realizado por Carvalho e colaboradores destinado a avaliar a nefrotoxicidade da MDMA e dos seus metabolitos catecólicos e conjugados com a GSH, em culturas de PTC de rato e humanas, demonstrou que a activação metabólica da MDMA causava perda de viabilidade celular (Carvalho *et al.* 2002b). Nas mesmas condições experimentais, a MDMA e a MDA não apresentavam um efeito citotóxico significativo. Pelo contrário, a α-MeDA, o respectivo monoconjugado com a GSH [5-(glutation-S-il)-α-MeDA] e o biconjugado com a GSH [2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA], induziam uma drástica diminuição da viabilidade celular (Carvalho *et al.* 2002b). No entanto, a pré-incubação destas células com um inibidor da γ-GT (acivicina) e um inibidor da aminopeptidase M (bestatina) resultou no agravamento da nefrotoxicidade do conjugado 5-(glutation-S-il)-α-MeDA, pelo que foi concluído que a simplificação metabólica deste conjugado em conjugados cisteín-S-il- ou cisteín-S-il-glicina contribuiu para a destoxificação destes compostos (Carvalho *et al.* 2002b).

2.3.4.4.6. Hipertermia

A mortalidade associada ao consumo de MDMA está em muitos casos directamente relacionado com a elevação da temperatura corporal para valores letais que podem atingir os 43 ºC. Muitas outras complicações associadas às intoxicações com MDMA podem ser agravadas pela sua acção hipertérmica nomeadamente, a CID, rabdomiólise e a falência renal aguda (Chadwick *et al.* 1991; Dar e McBrien 1996; Green *et al.* 2003).

O efeito hipertérmico nem sempre depende da dose ingerida uma vez que a ingestão de um único comprimido pode resultar em hipertermia severa e fatal (Dar e McBrien 1996) enquanto a ingestão de 42 comprimidos, com a qual foi atingida uma concentração plasmática de 7,72 mg/L, foi já descrita como assintomática (Henry *et al.* 1992).

A desregulação do sistema termorregulador induzida pela administração de MDMA em animais de experiência é fortemente condicionada pela temperatura ambiente. A manutenção dos animais em ambientes de temperatura baixa (entre 4-15 ºC) após a administração de MDMA resulta na indução de hipotermia. Se os animais forem mantidos em ambientes de temperaturas moderadas observa-se uma resposta

bifásica da temperatura corporal com uma primeira fase de hipotermia que é posteriormente revertida com aparecimento de hipertermia. Por outro lado, a manutenção dos animais em ambientes de temperatura elevada resultou na indução de uma resposta hipertérmica (Dafters 1995; Dafters e Lynch 1998; Gordon *et al.* 1991; Green 2004; Malberg e Seiden 1998). Estes resultados podem assumir especial importância dadas as condições ambientais características das festas *rave* e dos locais de diversão nocturnos (ambientes quentes e sobrelotados de bares e discotecas) onde ocorre com maior frequência o consumo de MDMA e que podem potenciar os efeitos no sistema termorregulador e conduzir a hipertermia fulminante (Henry *et al.* 1992; Huether *et al.* 1997).

A variabilidade interindividual na capacidade metabolizadora da enzima CYP2D6 (que é alvo de um polimorfismo genético que pode determinar a ausência, diminuição, ou aumento da sua actividade enzimática) tem sido também proposta como explicação para a maior susceptibilidade à ocorrência da reacção hipertérmica observada em determinados indivíduos e a relativa resistência de outros aos referidos efeitos hipertérmicos da MDMA (Malpass *et al.* 1999). Colado e colaboradores conduziram um estudo em que foram utilizados ratos fêmea da estirpe Dark Agouti, que por serem deficientes na enzima CYP2D1 constituem um modelo animal para a deficiência em CYP2D6 em humanos, e verificaram que a resposta hipertérmica estava aumentada nestes animais (Colado *et al.* 1995). Estes autores propuseram que o aumento da concentração plasmática resultante da diminuição do metabolismo da MDMA nestes animais poderia explicar a sua maior susceptibilidade aos efeitos hipertérmicos da MDMA (Colado *et al.* 1995).

Os mecanismos envolvidos na hipertermia induzida pela MDMA parecem estar associados à estimulação serotonérgica do centro de regulação da temperatura corporal ao nível do hipotálamo (Gordon *et al.* 1991; Green *et al.* 1995; Walubo e Seger 1999). O efeito hipertérmico da MDMA pode ser prevenido por tratamento prévio com inibidores do sistema de captação da serotonina ou pela administração de antagonistas dos receptores do tipo 5-HT_2 em animais de experiência e no Homem (Liechti *et al.* 2000; Schmidt *et al.* 1990b). Os antagonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo D_1 têm também a capacidade de reverter os efeitos hipertérmicos da MDMA de forma dependente da dose, o que faz supor um papel da neurotransmissão dopaminérgica na indução de hipertermia (Mechan *et al.* 2002). A interacção entre o eixo hipotálamo-pituitária-tiróide e o sistema nervoso simpático foi também implicada na termogénese

induzida pela MDMA por um mecanismo regulado pelos receptores adrenérgicos do tipo α_1 e β_3 (Sprague *et al.* 2003).

Para além do efeito da MDMA nas funções termorreguladoras do SNC, vários outros factores podem contribuir para o desenvolvimento de hipertermia nomeadamente, o aumento da actividade motora acompanhado por um estado hipermetabólico do músculo esquelético, a estimulação da lipólise, a estimulação da glicogenólise, e a diminuição da perda de calor através da pele devida à vasoconstrição periférica induzida pela libertação de catecolaminas (Blessing *et al.* 2003; Darvesh *et al.* 2002; Gordon *et al.* 1991; Nonogaki 2000; Pedersen e Blessing 2001). A contracção muscular sustentada resultante do aumento da libertação do Ca^{2+} intracelular induzido pela MDMA também contribui para o seu efeito hipertérmico, à semelhança do que acontece na patologia hipertermia maligna (Denborough e Hopkinson 1997).

Estudos recentes conduzidos por Mills e colaboradores avaliaram a influência da proteína dissociadora mitocondrial UCP-3 na resposta termogénica à MDMA (Mills *et al.* 2003). Esta proteína, que é expressa predominantemente no músculo esquelético, parece estar associada à dissipação do gradiente electroquímico de protões, gerado na mitocôndria, sob a forma de calor (Lowell e Spiegelman 2000).

Num estudo realizado por Mills e colaboradores em que foi administrada MDMA a ratinhos transgénicos deficientes nesta proteína verificou-se que estes eram mais resistentes aos efeitos termogénicos da MDMA comparativamente aos ratinhos da mesma estirpe não geneticamente modificados (*wild type*) (Mills *et al.* 2003). Os autores concluíram que a UCP-3 interfere na resposta termogénica à MDMA, o que pode ser explicado por uma possível estimulação directa da actividade da proteína (a MDMA e os seus metabolitos têm algumas semelhanças estruturais com aldeídos reactivos endógenos que estimulam a UCP-3) ou indirectamente através da activação dos receptores adrenérgicos β_3 (com aumento celular de AMPc) (Gong *et al.* 1997) e do aumento da libertação de hormona tiroideia (Mills *et al.* 2003). A MDMA demonstrou ainda regular os níveis de mRNA da UCP-3 no músculo esquelético de rato (Sprague *et al.* 2003). Os mecanismos envolvidos na resposta hipertérmica aguda induzida pela MDMA em animais de experiência e em humanos foram alvo de uma revisão por parte de Green e colaboradores (Green *et al.* 2004). A influência do sistema nervoso simpático e das proteínas desacopladoras na termogénese induzida pela MDMA foi igualmente abordada numa revisão de Mills e colaboradores que descrevem

detalhadamente os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos (Mills *et al.* 2004).

A maior ou menor tolerância aos efeitos termogénicos da MDMA pode também estar relacionada com a expressão de proteínas de choque térmico (Hsp). A expressão destas proteínas (que conferem às células resistência às agressões térmicas e de stress) pode ser induzida pela anfetamina, que aumenta os níveis de mRNA que codifica para a forma mais comum destas proteínas, a Hsp70 (Miller *et al.* 1991). No entanto, o efeito da MDMA na expressão destas proteínas não se encontra ainda estudado.

2.3.4.4.7. Hiponatrémia

A manifestação mais grave da hiponatrémia é a ocorrência de edema cerebral que pode ser fatal (Cole e Sumnall 2003).

A hiponatrémia pode dever-se à associação de dois mecanismos distintos, a secreção inapropriada de hormona antidiurética (SIADH), e a ingestão excessiva de água e perda de sódio no suor (Cole e Sumnall 2003; Hartung *et al.* 2002). A elevação da ADH como resultado da administração da MDMA foi demonstrada quer em estudos clínicos (Henry *et al.* 1998) quer em casos de intoxicação (Holden e Jackson 1996). A libertação desta hormona é mediada pela neurotransmissão serotonérgica, sendo muito provavelmente esta a via pela qual a MDMA leva também ao aumento da sua secreção (Forsling *et al.* 2002). Os estudos conduzidos por Forsling e colaboradores indicaram que o metabolito N-Me-α-MeDA monometilado pela COMT, a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina, era mais potente do que a MDMA na libertação desta hormona (Forsling *et al.* 2002). Também a α-MeDA e a N-Me-α-MeDA demonstraram induzir um aumento na libertação de ADH, o que sugere que a activação metabólica da MDMA é importante para o desenvolvimento da hiponatrémia (Forsling *et al.* 2002).

2.3.4.4.8. Teratogenia

Um dos mecanismos propostos para a acção teratogénica das anfetaminas é a sua capacidade de interferir com o transporte da noradrenalina e da serotonina na placenta (Ganapathy *et al.* 1999). A placenta expressa estes transportadores em grande quantidade, cuja função consiste no transporte destas aminas endógenas para o interior do sinciciotrofoblasto onde existem as enzimas MAO e COMT em abundância (Ramamoorthy *et al.* 1992). As anfetaminas podem, por interacção com estes transportadores, bloquear o transporte da noradrenalina e da serotonina e promover o seu próprio transporte para o interior do sinciciotrofoblasto (Ramamoorthy *et al.* 1995). Como consequência, a concentração de noradrenalina e serotonina ao nível das vilosidades placentárias aumenta grandemente e resulta em vasoconstrição das artérias uterinas com diminuição do fluxo sanguíneo para a placenta e contracção do miométrio uterino (Ganapathy *et al.* 1999). A diminuição do fluxo sanguíneo resulta na diminuição do fornecimento de oxigénio e nutrientes ao feto e o aumento da contracção do miométrio pode aumentar o risco de ocorrência de parto prematuro (Ganapathy *et al.* 1999).

A placenta possui também receptores do tipo sigma-1 (σ_1) que por ligação à progestrona induzem uma acção imunossupressora ao inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e do factor de necrose tumoral α_1 (TNF-α_1), e aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Ganapathy *et al.* 1999; Ramamoorthy *et al.* 1995). As anfetaminas podem competir com a progestrona para a ligação a este receptor e inibir esta imunossupressão que parece ser importante para evitar a rejeição do feto e para a continuação da gravidez (Ganapathy *et al.* 1999). Deste modo, a exposição às anfetaminas pode ter sérias consequências durante a implantação e durante a gestação (Carvalho 2004; Ganapathy *et al.* 1999).

2.3.4.4.9. Imunotoxicidade

O consumo da MDMA tem também consequências ao nível da modulação do sistema imunológico que se encontra em equilíbrio dinâmico com os sistemas neuronal e endócrino (Carvalho 2004). Certos factores do sistema imune, como por exemplo as

citocinas, parecem modular a actividade do SNC e, em contrapartida, o SNC influencia a resposta imunológica através do sistema nervoso simpático e neuroendócrino (Black 1994a, 1994b).

A libertação de dopamina e serotonina induzida pela MDMA condiciona, ao nível do hipotálamo, a libertação da hormona de libertação de corticotropina (CRL) com consequente activação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (Connor 2004). Desta activação resulta por sua vez o aumento da secreção de corticotropina ou ACTH e consequentemente de corticosterona que possui actividade imunossupressora (Yau *et al.* 1997).

Paralelamente, o aumento da libertação das catecolaminas resulta na estimulação dos receptores adrenérgicos do tipo β_2 presentes nos macrófagos e linfócitos, diminuindo as respostas imunológicas celulares e a actividade *natural-killer* (NK) dos linfócitos (Irwin *et al.* 1990).

Por outro lado, a MDMA pode exercer uma acção directa na função linfocitária. Os linfócitos possuem na sua membrana transportadores com elevada afinidade para a serotonina, o que pode facilitar a captação de MDMA para o interior destas células (Faraj *et al.* 1994). Estudos *in vitro* demonstraram que a exposição de linfócitos T de ratinho à MDMA levava ao aumento da produção de IL-2 para concentrações baixas (0,1 nM) e a uma diminuição da produção desta citocina para concentrações elevadas (100 μM) de MDMA. Pararelamente, observou-se uma supressão da indução de linfócitos T e um ligeiro aumento na actividade dos linfócitos NK sem que se verificassem alterações significativas ao nível dos linfócitos B (House *et al.* 1994, 1995; Pacifici *et al.* 1999). A acção imunossupressora da MDMA foi avaliada em estudos *in vivo* no rato em que a administração da MDMA em doses iguais ou superiores a 7,5 mg/kg produziu uma diminuição significativa no número de linfócitos T circulantes e um aumento simultâneo da concentração plasmática de corticosterona (Connor *et al.* 1998). Este efeito parece estar associado ao fenómeno de marginalização linfocitária (migração dos linfócitos do sangue periférico para os gânglios linfáticos, baço, medula óssea e placas de Peyer) e à indução de apoptose linfocitária, ambos induzidos pela corticosterona. Na contagem absoluta de neutrófilos e monócitos não foi registada qualquer alteração (Connor *et al.* 1998). Foi verificado igualmente nestes estudos um decréscimo da proliferação linfocitária em resposta à estimulação por mitogénios (fitoemaglutinina) e que foi independente da dose de MDMA e da concentração

plasmática de corticosterona, e como tal, parece ser independente dos glucocorticóides (Connor *et al.* 1998).

A diminuição do número de linfócitos T *helper*, o aumento do número de células NK e a diminuição na resposta funcional dos linfócitos à estimulação mitogénica foi também observada em voluntários humanos aos quais foi administrada uma dose de 100 mg de MDMA (Pacifici *et al.* 2000; Pacifici *et al.* 2001b). A administração de MDMA produziu igualmente um marcado aumento na libertação de citocinas imunossupressoras [transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) e IL-10] e um desvio das citocinas do tipo Th-1 (IL-2 e interferão-γ) para citocinas do tipo Th-2 (IL-4 e IL-10) (Pacifici *et al.* 2000; Pacifici *et al.* 2001b).

A participação da neurotransmissão monoaminérgica no SNC na modulação da resposta imunológica induzida pela MDMA é também comprovada pela correlação observada entre os parâmetros farmacocinéticos da MDMA, a cinética de secreção do cortisol e o perfil de desregulação imunológica. No que diz respeito à serotonina, esta acção foi demonstrada através da administração de um inibidor selectivo da recaptação da serotonina, a paroxetina, que inibiu os efeitos da administração aguda de MDMA no sistema imune em humanos (Pacifici *et al.* 2004). O pré-tratamento com paroxetina previamente à administração aguda de MDMA anulou o efeito supressor da proliferação linfocitária e de IL-2, bloqueou a capacidade da MDMA de aumentar a produção de citocinas imunossupressoras do tipo TGF-β e IL-10, e inibiu parcialmente a capacidade de suprimir a proliferação dos linfócitos T *helper* CD4 e de aumentar o número de células NK (Pacifici *et al.* 2004).

2.3.5. Dependência

De uma forma geral considera-se que a MDMA não causa dependência, sendo raros os relatos de uso frequente com ingestão de quantidades elevadas por períodos muito prolongados (von Sydow *et al.* 2002). O aumento da frequência de uso da MDMA leva à diminuição dos efeitos empatogénicos procurados pelos seus consumidores, o que origina um desinteresse gradual pela droga. No entanto, em casos raros, alguns destes indivíduos podem aumentar as doses ingeridas e desenvolver dependência (Jansen 1999). A síndrome de dependência requer a ocorrência de pelo

menos três dos seguintes fenómenos, (i) um desejo forte de consumo da substância, (ii) dificuldade em controlar o comportamento, (iii) sintomas de abstinência, (iv) desenvolvimento de tolerância, (v) negligência face a fontes alternativas de satisfação e (vi) persistência do uso mesmo com malefício comprovado (WHO 1992). Apesar de raros, existem relatos na literatura de indivíduos com estas características que referem como principais sintomas de abstinência a fadiga, alterações de humor, ansiedade e perturbações do sono (Cottler *et al.* 2001; Jansen 1999).

2.3.5.1. Efeitos psicológicos

Os efeitos da MDMA ao nível cognitivo, particularmente no que respeita à memória e aprendizagem, têm merecido especial atenção. Os dados experimentais disponíveis indicam que vários factores influenciam a susceptibilidade aos efeitos desta droga ao nível cognitivo, nomeadamente, a espécie animal, a dose e a frequência de administração (Hegadoren *et al.* 1999).

Ratos tratados repetidamente com MDMA em doses elevadas não apresentaram qualquer deficiência numa série de testes de memória (Robinson *et al.* 1993). No entanto, em primatas não humanos foi notada uma maior susceptibilidade a este tipo de efeitos em testes cognitivos. A administração aguda de MDMA em doses baixas produziu alterações em testes que avaliam a estimativa de tempo, aprendizagem e motivação, mas não pareceu influenciar a atenção ou a memória a curto prazo. O tratamento crónico com doses progressivamente mais elevadas de MDMA induziu tolerância a nível comportamental para alguns dos parâmetros estudados. Este fenómeno pode ainda ser observado após a administração de uma única dose de MDMA, seis a dezoito meses após a interrupção do tratamento crónico dos animais (Frederick e Paule 1997).

Em estudos efectuados ao nível da aprendizagem e memória em humanos, foi demonstrado que os indivíduos expostos por períodos prolongados à MDMA têm piores desempenhos nestes testes (Morgan 1999; Parrott 2002).

Num teste realizado com dois grupos distintos de utilizadores de MDMA (utilizadores regulares com 10 ou mais episódios de uso e utilizadores ocasionais com nove ou menos episódios de uso) e um grupo controlo mostraram que os indivíduos que

consumiam MDMA apresentavam deficiências em testes de memorização de palavras sem que houvesse, no entanto, diferenças registadas em testes que avaliavam a velocidade de resposta e a vigilância (Parrott *et al.* 1998).

Em humanos são também frequentemente descritos sintomas de confusão mental com maior ou menor gravidade embora estes relatos sejam subjectivos (Hegadoren *et al.* 1999).

Estudos efectuados no rato e no ratinho indicam que a MDMA pode ter tanto um efeito ansiogénico como ansiolítico, afecta negativamente a resposta dos animais em testes cognitivos e aumenta a sensibilidade a estímulos acústicos e tácteis (Green *et al.* 2003).

Os efeitos da MDMA em testes psicológicos realizados em macacos demonstraram que esta droga afecta principalmente os processos associados à aprendizagem e aquisição de nova informação, afectando em menor grau a memória recente (Green *et al.* 2003).

Em humanos os efeitos psicológicos agudos após a administração de MDMA incluem a euforia e a redução dos pensamentos negativos (Cami *et al.* 2000). Após o pico do efeito da MDMA segue-se a ocorrência de efeitos adversos entre os quais se registam sintomas de depressão, irritabilidade, ataques de pânico, alucinações visuais e delírios paranóides (de la Torre *et al.* 2004b).

Os efeitos a nível psicológico causados pela MDMA tendem a persistir por períodos prolongados após a cessação do uso da droga. Estes efeitos incluem alucinações visuais, delírios paranóides, ansiedade, depressão, pânico, alterações cognitivas (ao nível da memória, aprendizagem, fluência verbal, processamento da informação e destreza manual) e alterações comportamentais (Green *et al.* 2003; Morgan 2000; Parrott 2002).

2.3.5.2. Efeitos comportamentais

Os efeitos centrais da MDMA descritos em humanos referem uma alteração do estado de consciência facilmente controlável, com um aumento da sensação de bem-estar, aumento da sensação táctil, um aumento da capacidade de introspecção e um forte desejo de conviver e conversar com outras pessoas, sem uma significativa distorção da

percepção ou alucinações (Hegadoren *et al.* 1999). Estes efeitos subjectivos explicam a popularidade da MDMA como droga de abuso e o contexto do seu uso em eventos sociais, nomeadamente em festas de dança (Hegadoren *et al.* 1999). Numa população de 500 indivíduos que responderam a um questionário sobre os efeitos subjectivos da MDMA, mais de 80% citaram como efeitos positivos desta droga a euforia, aumento da energia e da libido (Cohen 1995).

Os efeitos da MDMA ao nível periférico são de natureza simpaticomimética e resultam do estímulo da libertação de noradrenalina. Estes efeitos incluem taquicardia, aumento da pressão sanguínea, midríase, tremor, palpitações e diaforese. Outros efeitos comuns são o aumento da salivação, bruxismo e trismo (Hegadoren *et al.* 1999). Estes efeitos nos músculos faciais estão provavelmente relacionados com a libertação de serotonina (Hegadoren *et al.* 1999).

Os efeitos subsequentes à administração de MDMA em humanos mais relatados incluem sonolência, dores musculares, fadiga generalizada, depressão com duração entre um a dois dias, dificuldade de concentração, paranóia e ansiedade e irritabilidade transitórias (Hegadoren *et al.* 1999).

À medida que aumenta a frequência de administração de MDMA os efeitos posteriores indesejáveis aumentam enquanto que os efeitos desejados diminuem. Inicialmente foi sugerido que estes efeitos indesejáveis limitariam a frequência de administração e incitariam ao uso de diferentes drogas. Por outro lado, foi recentemente proposto que o aumento da sensibilidade aos efeitos indesejáveis e a tolerância desenvolvida para os efeitos desejados constituem provas da neurodegenerescência induzida pela MDMA (Hegadoren *et al.* 1999).

Os estudos de discriminação de drogas parecem indicar que a MDMA é distinta dos estimulantes psicomotores e alucinogénios (Hegadoren *et al.* 1995). No entanto, estes estudos são muito pouco conclusivos uma vez que existem muitas diferenças entre os protocolos experimentais adoptados, nomeadamente no que respeita aos compostos usados para o treino dos animais, as espécies animais utilizadas e o esquema de administração dos compostos (Hegadoren et al. 1999).

Estudos em animais indicam que a MDMA induz a síndrome comportamental da serotonina. Esta síndrome resulta de uma hiperestimulação serotonérgica e consiste numa constelação de sintomas que incluem a hiperactividade, aumento da temperatura corporal e alterações comportamentais. A administração aguda de MDMA induz uma elevada estimulação da actividade locomotora acompanhada pelo aparecimento dos

principais sintomas característicos da síndrome da serotonina de modo dependente da dose (Colado *et al.* 1993; Marston *et al.* 1999; Slikker *et al.* 1989). A hiperactividade induzida pela MDMA é muito complexa do ponto de vista neuroquímico e parece envolver tanto as vias serotonérgicas como as vias dopaminérgicas. Foram já realizados vários estudos no rato e no ratinho que implicaram a libertação de serotonina e os receptores serotonérgicos, quer na resposta locomotora, quer nas alterações comportamentais provocadas pela MDMA (Green *et al.* 2003).

Também em humanos foi registada a ocorrência de síndrome da serotonina, sendo os seus sintomas geralmente revertidos após descanso e ausência dos ambientes de elevada temperatura e com um elevado número de pessoas, uma vez que estas circunstâncias, muito frequentemente associadas ao consumo da MDMA, potenciam o desenvolvimento da referida síndrome (Parrott 2002).

A ingestão de MDMA tem sido considerada como um factor de risco para a ocorrência de acidentes de viação. Foi já documentado o comportamento bizarro e agressivo observado em indivíduos que conduziam sob o efeito da MDMA (Schifano 2004).

2.3.5.3. Disponibilidade e qualidade

No Reino Unido, as estimativas que compararam a morte em jovens na faixa etária dos 15-24 anos causadas pela ingestão de *ecstasy* e de heroína, mostraram um índice de 2-53 mortes por 10000 consumidores de *ecstasy* e 91-815 mortes por 10000 consumidores de heroína, no ano de 1996 (Gore 1999). Apesar de apresentar um índice inferior ao da heroína, as mortes associadas ao consumo da *ecstasy* são mais imprevisíveis (Greene *et al.* 2003).

A quantidade de MDMA presente num comprimido de *ecstasy* varia substancialmente, mesmo dentro de comprimidos idênticos. Uma grande percentagem dos comprimidos de *ecstasy* não contém sequer MDMA, mas sim outros análogos da anfetamina, cetamina ou efedrina (Cole e Sumnall 2003). Em 1997, apenas 34% dos comprimidos de *ecstasy* analisados na Holanda continham MDMA (Cole e Sumnall 2003). No entanto, o grau de pureza destes comprimidos tem vindo a aumentar e no

final da década de 1990 cerca de 80 a 90% dos comprimidos continham apenas MDMA (Parrott 2004). Actualmente, os níveis de pureza rondam os 90 a 100% (Parrott 2004).

2.3.5.4. Prevalência e padrão de uso

Os estudos efectuados para avaliar a prevalência do uso da *ecstasy* (inclui a MDMA e compostos aparentados) indicam que a popularidade desta droga continua a aumentar. Em 1987, entre 369 estudantes de uma universidade americana, 39% admitiram ter usado a *ecstasy* pelo menos uma vez no ano antecedente. Um estudo semelhante conduzido numa universidade britânica, em 1990, revelou que 24% dos alunos inquiridos tinham já consumido esta droga. Em 1992, uma sondagem no Reino Unido revelou que 31% dos inquiridos com idades compreendidas entre 16 e 25 anos tinham já usado *ecstasy*, maioritariamente em discotecas. Um estudo conduzido na Austrália com 100 indivíduos entre 16 e 48 anos de idade mostrou que 68% tinha já ingerido *ecstasy* mais de três vezes e o período de utilização mais prolongado entre estes indivíduos foi de cinco anos (Green *et al.* 2003). Cerca de 90% dos 135 participantes numa festa de dança em Glasgow tinham já experimentado a MDMA (Hegadoren *et al.* 1999). Outros estudos epidemiológicos similares revelaram que cerca de 5 a 9% de estudantes com idades compreendidas entre 15 e 16 anos tinham já utilizado a *ecstasy* (Hegadoren *et al.* 1999). Na Noruega, em 1998, foi estimado um consumo de *ecstasy*, a nível nacional de 2,6%, um aumento muito significativo relativamente aos 0,3 % registados no ano de 1994 (Green *et al.* 2003).

Nos EUA, um estudo epidemiológico efectuado com estudantes de diferentes idades concluiu que embora o uso de drogas ilícitas tivesse sofrido uma ligeira diminuição desde 1999, no caso da *ecstasy* tinha havido um aumento do seu consumo em todas as faixas etárias (Green *et al.* 2003).

Um estudo realizado no Reino Unido em 1151 indivíduos (recrutados através de anúncios numa revista popular de *dance music*) revelou que 96% dos indivíduos havia já consumido *ecstasy* pelos menos uma vez. A duração média do consumo estimava-se entre quatro a cinco anos e cerca de 8% dos indivíduos consumiram a droga por um período superior a dez anos (Winstock *et al.* 2001).

Além do Reino Unido e dos EUA, o consumo de MDMA tem vindo a aumentar gradualmente em muitos outros países, incluindo Portugal. Segundo o relatório publicado pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) em 2003, a MDMA e outras anfetaminas são as drogas ilícitas mais frequentemente consumidas nos países da União Europeia, depois da cannabis. Este relatório revela ainda que entre 0,5% e 5% da população adulta europeia e entre 1% e 6% da população jovem havia já consumido estas drogas (OEDT 2003).

No nosso país, o consumo de MDMA surgiu no início da década de 1990 e, à semelhança dos restantes países europeus, esta droga ganhou rapidamente popularidade, particularmente entre os jovens, o que pode ser constatado por numerosos artigos veiculados pelos órgãos de comunicação social (por exemplo, revista "Visão" de 24 de Março de 1994; jornal "Público" de 7 de Novembro e de 7 de Dezembro de 1995; jornal "Expresso" de 1 de Novembro de 1996; jornal "A capital" de 22 de Fevereiro de 2000; revista "Grande Reportagem" de Setembro de 2000; jornal "Público" de 9 de Junho de 2002 e jornal "Diário de Notícias" de 16 de Julho de 2002 e de 14 de Outubro de 2002).

Segundo o relatório anual do Instituto da Droga e da Toxicodependência de 2003, os resultados dos estudos realizados a nível nacional na população do 3º ciclo do Ensino Básico revelaram um aumento da taxa de consumo da MDMA de 2,3% em 1999 para 4% em 2003 (IDT 2004). A incidência do consumo de MDMA na população portuguesa está pouco documentada, mas o número crescente de apreensões efectuadas pelas autoridades policiais indicam um aumento potencial do consumo desta droga no nosso país (OEDT 2001).

O mais recente relatório publicado pelo OEDT, datado de 2005 (OEDT 2005) fornece os seguintes dados relativamente à prevalência e padrões de consumo dos estimulantes do tipo das anfetaminas: "Os inquéritos à população têm demonstrado, tradicionalmente, que as anfetaminas estão entre as substância ilegais mais consumidas a seguir à cannabis, embora a prevalência global do consumo de anfetaminas seja claramente inferior ao desta última. [...] De acordo com inquéritos recentes, o consumo de anfetaminas ao longo da vida entre todos os adultos (15 aos 64 anos), nos Estados-Membros da UE, varia entre 0,1% e 6%, excepto no Reino Unido, onde chega a atingir 12%. O consumo recente é claramente inferior, variando entre 0% e 1,5%, com a Dinamarca, a Estónia e o Reino Unido no topo da escala. Nos inquéritos à população emerge um quadro semelhante no grupo dos jovens adultos (15 aos 34 anos), cuja experiência do consumo de anfetaminas ao longo da vida varia entre 0,1% e 10%, com

o Reino Unido a referir uma taxa excepcionalmente elevada de 18,4%. O consumo recente varia entre 0% e 3%, ocupando a Dinamarca, a Estónia e o Reino Unido novamente o topo da escala. Nos inquéritos da European School Survey on Alcohol and Drugs (ESPAD) de 2003, são comunicados novos dados sobre o consumo de anfetaminas entre os estudantes de 15 e 16 anos. A prevalência do consumo de anfetaminas ao longo da vida oscila entre menos de 1% e 7%, sendo as estimativas nacionais mais elevadas para o consumo recente e actual (nos últimos 30 dias) desta droga de 4% e 3%, respectivamente. Cerca de 0,2 a 6,5% da população adulta já experimentou a *ecstasy*, situando-se as percentagens relativas à maioria dos países entre 1% e 4%. O consumo recente é mencionado por 0 a 2,5% dos adultos, apresentando a Espanha, a República Checa e o Reino Unido as percentagens de prevalência mais elevadas. Entre os jovens adultos (15 aos 34 anos), 0,6% a 13,6% dizem já ter experimentado *ecstasy*. O consumo recente (prevalência nos últimos 12 meses) é mencionado por 0,4% a 6% das pessoas deste grupo, apresentando a República Checa, a Estónia, a Espanha e o Reino Unido as taxas de prevalência mais elevadas. [...] No grupo etário dos 15 aos 24 anos, as taxas da experiência ao longo da vida variam entre 0,4% e 13%, ao passo que as taxas relativas ao consumo recente oscilam entre 0,3% e 11%. Além disso, como as taxas de consumo de droga neste grupo etário são mais elevadas nos indivíduos do sexo masculino do que nos indivíduos do sexo feminino, a maioria dos países refere taxas de experiência ao longo da vida de 4% a 16% e de consumo recente entre 2% e 8%, entre os indivíduos do sexo masculino dos 15 aos 24 anos. Por último, os valores relativos ao consumo actual (nos últimos 30 dias), incluindo o consumo regular, foram comunicados por sete países e variavam entre 2% e 5%, o que sugere que 1 em 20 a 50 indivíduos do sexo masculino entre os 15 e os 24 anos consome *ecstasy* regularmente. Estes valores serão provavelmente mais elevados nas zonas urbanas e, em especial, entre os frequentadores de discotecas e outros locais de diversão. [...] Estes inquéritos têm demonstrado um aumento do consumo recente de anfetaminas e de *ecstasy* entre os jovens adultos, na maioria dos países que dispõem de dados provenientes de inquéritos consecutivos. No caso da *ecstasy*, constituem excepções a Alemanha e a Grécia, países cujos níveis de consumo não aumentaram, e o Reino Unido, onde o consumo destas drogas estabilizou recentemente (2002/2003), se bem que em níveis relativamente elevados."

2.3.5.5. Características e comportamento dos consumidores

O consumo da MDMA está predominantemente associado a faixas etárias jovens, sendo que uma elevada proporção de jovens com menos de 16 anos está exposto a esta droga de abuso (Cole e Sumnall 2003). Dentro dos adultos jovens que frequentam festas *rave* e discotecas, no Reino Unido, cerca de 90% admite ingerir este tipo de drogas (Cole e Sumnall 2003).

As alterações comportamentais, nomeadamente a perda de capacidade de condução de viaturas, estão também associadas à mortalidade induzida pela MDMA (Cole e Sumnall 2003), sendo particularmente preocupante a ingestão simultânea da MDMA e etanol (Hernandez-Lopez *et al.* 2002).

2.3.5.6. Indicadores de consequências para a saúde

Sobre os indicadores de consequências para a saúde, o mais recente relatório publicado pelo OEDT em 2005 apresenta as seguintes considerações (OEDT 2005): "Quando comparadas com as mortes relacionadas com os opiáceos, as mortes relacionadas com o consumo de *ecstasy* são relativamente raras, mas em alguns países não podem ser consideradas insignificantes e a sua monitorização deveria ser melhorada. A expressão «morte relacionada com o consumo de *ecstasy*» poderá significar que a substância foi mencionada na certidão de óbito ou que foi detectada (frequentemente em conjunto com outras drogas) através de análise toxicológica. Embora os procedimentos de comunicação de dados não estejam harmonizados, os dados dos relatórios nacionais Reitox relativos a 2004 sugerem que as mortes relacionadas com o consumo de *ecstasy* são raras na maioria dos países da UE, muito em especial os casos em que a *ecstasy* é a única droga envolvida. Em 2003, vários países notificaram mortes associadas à *ecstasy*: a Áustria (uma morte unicamente relacionada com a *ecstasy*), a República Checa (uma morte provavelmente devida a uma overdose de MDMA), a França (oito casos associados à *ecstasy*), a Alemanha (dois casos associados unicamente à *ecstasy* e oito envolvendo *ecstasy* combinado com outras drogas — com os valores correspondentes de 8 e 11 em 2002), Portugal (detectado em 2% das mortes relacionadas com a droga) e o Reino Unido (a *ecstasy* é «mencionada»

em 49 certidões de óbito em 2000, 76 em 2001 e 75 em 2002). Os Países Baixos comunicaram sete mortes devidas a intoxicação aguda com psicoestimulantes, embora a substância em causa não tenha sido mencionada. Poucos países apresentam dados sobre o recurso às urgências hospitalares associado ao consumo de *ecstasy*. Em Amesterdão, o número de casos de emergências não fatais (relatório nacional dos Países Baixos) atribuíveis ao consumo de *ecstasy* manteve-se estável entre 1995 e 2003 (o mesmo acontecendo com os casos associados ao consumo de anfetaminas), ao passo que as emergências causadas pelos cogumelos alucinogénicos e o gama-hidroxibutirato (GHB) aumentaram. Na Dinamarca (relatório nacional), o número de contactos hospitalares atribuíveis a intoxicação com estimulantes aumentou de 112 casos em 1999 para 292 casos em 2003; o número destes contactos hospitalares associado ao consumo de *ecstasy* aumentou acentuadamente entre 1999 e 2000, mas sem mostrar uma tendência clara subsequente, ao passo que o número de contactos associados ao consumo de anfetaminas aumentou constantemente ao longo deste período."

2.3.5.7. Contexto do uso

Apesar do uso da MDMA ter sido proposto como adjuvante terapêutico em psiquiatria dado o aumento da capacidade de introspecção associado à ingestão da MDMA que, segundo alguns psiquiatras, permitia aos terapeutas e seus pacientes uma maior facilidade em abordar questões emocionais particularmente complexas e difíceis, a sua utilização terapêutica não foi possível dada a colocação da MDMA na tabela I da Convenção de 1971. Deste modo, a MDMA é actualmente utilizada apenas como droga de abuso, pertencendo a maioria dos seus consumidores a faixas etárias muito jovens.

Em meados da década de 1980 as festas de dança *rave* tornaram-se muito populares e foi no âmbito destes eventos sociais que o consumo da MDMA se generalizou, em especial na Europa (Cole e Sumnall 2003). Estas festas decorrem tipicamente em ambientes de elevada temperatura, sobrelotados, e ao som de música electrónica repetitiva, alta e acompanhada de espectáculos de luz. Todas estas circunstâncias podem influenciar a expressão da toxicidade da MDMA e a maior parte das intoxicações fatais relatadas na literatura está associada ao uso da MDMA neste contexto.

2.4. Polimorfismo genético no metabolismo e expressão de toxicidade das anfetaminas

2.4.1. Polimorfismo genético no genoma humano

A susceptibilidade individual, ou de um grupo de indivíduos, aos efeitos adversos resultantes da exposição a um determinado xenobiótico pode ser determinada por alterações estáveis e de carácter hereditário que ocorrem no genoma humano.

O genoma humano contém aproximadamente 32000 genes (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001). Apenas 1% do genoma corresponde a exões (regiões codificantes) e menos de 25% de DNA genómico corresponde a intrões (regiões não codificantes). Cerca de 75% do genoma é constituído por DNA intergénico, constituindo regiões não codificantes que parecem ser grandes "desertos" de milhões de nucleótidos que separam agregados de genes ("oásis") (Sweeney 2004). Estas regiões de DNA intergénicas consistem, principalmente, em vários tipos de elementos de repetição (ou blocos de repetição) aparentemente aleatórios. Um tipo particular de DNA intergénico consiste em pequenas sequências de repetição que ocorrem em série (*tandem repeats*). Existe também um grau considerável de duplicação de genes no genoma.

Cerca de 99,9% da sequência de nucleótidos do genoma humano é partilhada por todos os indivíduos. Não deixa de ser notável que a extraordinária diversidade dos seres humanos ao nível genético seja codificada por menos de 0,1% de variação no DNA do genoma. Por convenção, quando uma mutação ocorre em mais de 1% de uma população é designada de polimorfismo (Broder *et al.* 2002).

O polimorfismo genético refere-se, genericamente, à existência de variantes relativamente a um gene, um produto genético, ou a um fenótipo (Passarge 2001). O polimorfismo do DNA refere-se, mais concretamente, (i) às variações na composição da sequência nucleotídica, (ii) às variações no tamanho das sequências nucleotídicas de repetição (microssatélites e minissatélites), ou (iii) às variantes resultantes da alteração num único nucleótido (Passarge 2001). Os tipos mais importantes de polimorfismo são os polimorfismos num único nucleótido e os polimorfismos no tamanho das sequências nucleotídicas de repetição em série (Figura 12).

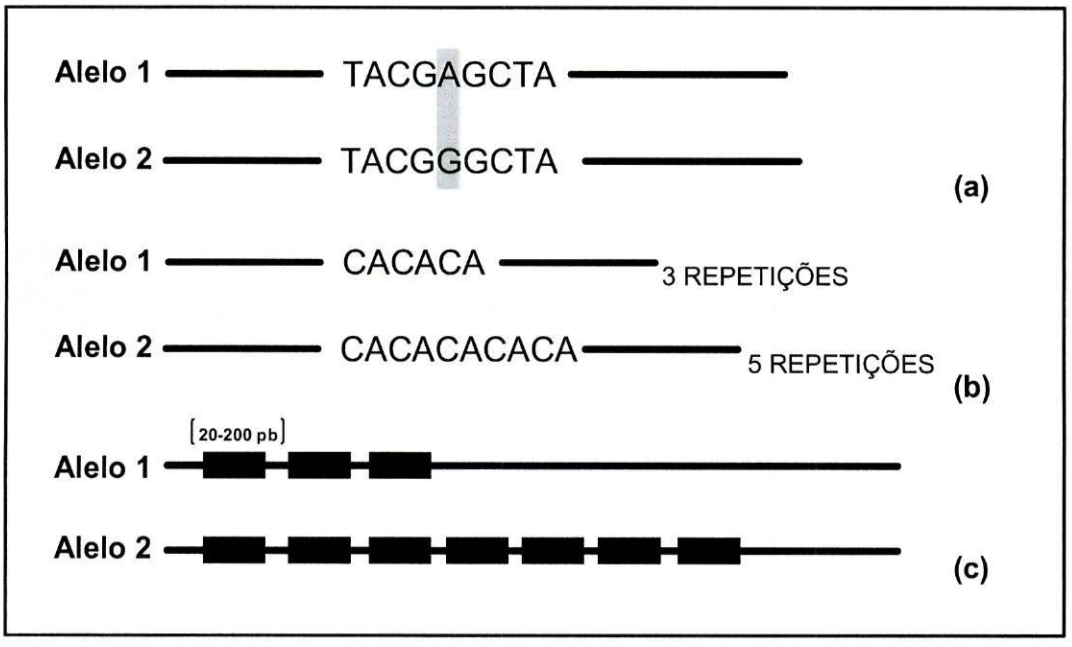


Figura 12. Principais tipos de polimorfismos no DNA humano. (a) Polimorfismos num único nucleótido, (b) pequenas sequências nucleotídicas de repetição que ocorrem em série (STR) ou microssatélites e (c) sequências nucleotídicas de número variável de repetição que ocorrem em série (VTNR) ou minissatélites. Adaptado de (Passarge 2001).

Existem essencialmente três tipos diferentes de mutação envolvendo um único nucleótido que correspondem à (i) substituição (troca de nucleótidos), (ii) deleção (perda de nucleótido), ou (iii) inserção (inclusão de nucleótido) (Passarge 2001) (Figura 13).

No que respeita à substituição de nucleótidos, esta pode resultar na presença de um aminoácido diferente no local correspondente à mutação, mas não altera o quadro de leitura aberto do gene (a sequência de DNA que pode ser traduzida), podendo o seu resultado final ser ou não crítico para a proteína expressa. Por outro lado, a deleção e a inserção resultam em sequências que não são capazes de codificar um produto genético funcional porque causam alterações (ou desvios) ao quadro de leitura aberto do gene (Passarge 2001).

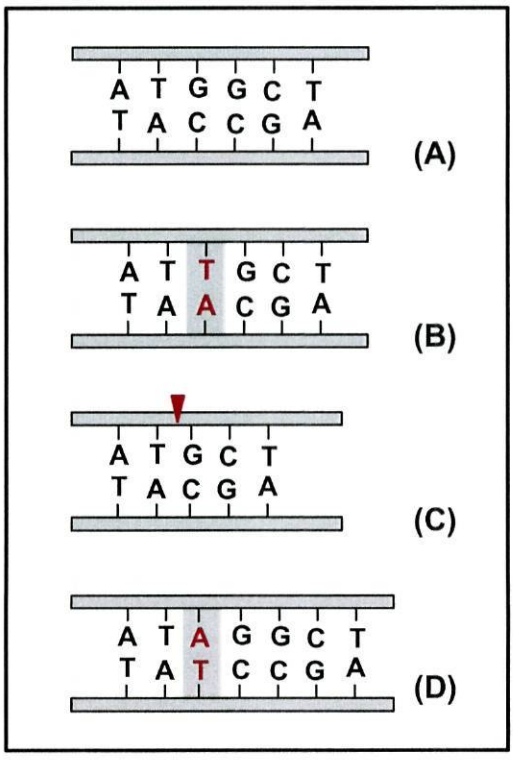


Figura 13. Tipos de mutação que envolvem um único nucleótido. (A) Sequência não mutada (wild type), (B) substituição, (C) deleção e (D) inserção de nucleótido. Adaptado de (Passarge 2001).

Os polimorfismos cujas variantes diferem num único nucleótido numa posição específica da sequência do DNA designam-se por polimorfismos num único nucleótido (SNP) e representam a classe mais abundante de polimorfismos humanos. Com a comparação entre os resultados iniciais dos dois projectos da sequênciação do genoma humano, foi possível localizar mais de 2,1 milhões de SNPs. Destes, menos de 1% resulta na alteração directa da proteína codificada pelo gene (Venter *et al.* 2001). Se as mutações ocorrerem numa região codificante do genoma, podem resultar na formação de uma proteína modificada ou numa proteína truncada e, consequentemente, surge um fenótipo anormal para essa proteína. O fenótipo corresponde à expressão física ou ao resultado de um determinado genótipo (por exemplo, uma doença, um grupo sanguíneo, uma variante proteica ou qualquer outro atributo determinado por observação) (Passarge 2001). O genótipo refere-se à informação genética que origina o fenótipo (Passarge 2001). As diferentes formas da informação genética (ou da sequência de DNA) num dado gene são designadas por alelos (Passarge 2001). Nos organismos diplóides existem três genótipos possíveis para cada par de alelos (por exemplo, alelos A e B) num determinado gene, (i) homozigótico para um alelo (AA), (ii) heterozigóticos (AB) e (iii) homozigóticos para o outro alelo (BB).

Os alelos são diferenciados em dominantes ou recessivos consoante são reconhecidos num genótipo heterozigótico ou apenas num genótipo homozigótico, respectivamente. Se ambos os alelos são reconhecidos num genótipo heterozigótico designam-se por co-dominantes (por exemplo, os alelos A e B do grupo sanguíneo que são co-dominantes, sendo o grupo O recessivo para ambos).

Os polimorfismos descrevem características monogénicas (num único gene) que se traduzem na população em pelo menos dois fenótipos diferentes. Os alelos não mutados (selvagens ou *wild type*) correspondem ao genótipo que ocorre normalmente e que é adoptado como o genótipo normal ou padrão. A distribuição dos diferentes alelos numa população é designada por frequência alélica e quantifica a frequência com a qual um alelo está presente num dado *locus* do gene, e numa dada população (Passarge 2001). A frequência alélica varia consideravelmente entre populações com diferentes origens étnicas.

Os polimorfismos genéticos podem traduzir-se em proteínas anormais associadas ao metabolismo, transporte e receptores de xenobióticos.

Mesmo que os SNPs não estejam envolvidos na expressão de um determinado fenótipo pode haver uma relação posicional com outro SNP, o que se designa por desequilíbrio de ligação (LD; *linkage disequilibrium*). O fenómeno de ligação (*linkage*) traduz a maior probabilidade de dois ou mais marcadores (por exemplo, polimorfismos) serem herdados conjuntamente, quanto mais próxima for a sua associação. Isto é, quanto maior a proximidade entre dois ou mais SNPs num cromossoma, mais baixa é a probabilidade de estes serem separados durante a reparação ou replicação do DNA (por recombinação do DNA). (Licinio e Wong 2002). Os alelos com localização muito próxima e que são herdados como uma unidade são designados por haplotipo (Passarge 2001). Os haplotipos correspondem a combinações de SNPs herdadas conjuntamente num cromossoma.

2.4.2. Diferenças interindividuais na ocorrência de reacções adversas

O risco individual para a toxicidade dos xenobióticos pode resultar das características genéticas, de variáveis não genéticas e da interacção entre os genes e o ambiente. As variáveis não genéticas incluem a idade, etnia, sexo, factores nutricionais,

administração concomitante de fármacos e interacções medicamentosas, o estado de saúde ou de doença e a natureza da doença, e muitos outros factores dependentes do estilo de vida, tais como dependência do tabaco e consumo de álcool. Estes factores actuam conjuntamente com os genes de cada indivíduo que codificam para as determinantes farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos xenobióticos (Meyer 2002). As características individuais podem, deste modo, alterar significativamente a disposição dos xenobióticos (Meisel *et al.* 2003). Dentro de todos estes factores que podem influenciar a resposta toxicológica, as determinantes hereditárias mantêm-se geralmente estáveis durante a vida de um indivíduo ao contrário do que acontece com as determinantes não genéticas (Evans e McLeod 2003).

As variantes genéticas das enzimas metabólicas e dos transportadores estão entre os maiores modificadores da resposta farmacológica e toxicológica, uma vez que exercem um efeito preponderante na farmacocinética (Meisel *et al.* 2003). A concentração efectiva do xenobiótico depende da sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. As proteínas que medeiam a resposta farmacológica e toxicológica, e que incluem "proteínas alvo" (por exemplo, receptores), bem como as que estão indirectamente envolvidas na acção do xenobiótico (por exemplo, factores de transcrição) contribuem para variabilidade na farmacodinâmica (Johnson 2003).

Os efeitos farmacológicos e toxicológicos são normalmente resultado da interacção de vários genes que codificam proteínas envolvidas em múltiplas vias da disposição e efeitos dos xenobióticos. Estas respostas com determinantes poligénicas são muito mais difíceis de identificar, especialmente quando o metabolismo e mecanismo de acção são pouco conhecidos (Evans e Relling 1999).

2.4.3. Polimorfismos genéticos em proteínas potencialmente intervenientes na toxicidade das anfetaminas

2.4.3.1. Polimorfismo genético do metabolismo

As principais causas para a variabilidade no metabolismo são: (i) polimorfismos genéticos, (ii) indução ou inibição enzimáticas como resultado de interacções medicamentosas ou factores ambientais, (iii) situação fisiológica e (iv) situação patológica. Os polimorfismos genéticos e a indução ou inibição do metabolismo

parecem ser as de maior importância para a ocorrência de efeitos adversos (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Virtualmente, todas as etapas do metabolismo podem ser alvo de variabilidade genética (Weinshilboum 2003). Estes polimorfismos podem ou não ter uma importância clínica evidente dependendo das bases moleculares do polimorfismo, da expressão de outras enzimas metabólicas, da existência de interacções farmacológicas ou doenças e de outras alterações poligénicas com impacto na resposta farmacológica e toxicológica (Evans e Relling 1999).

Quase todos os genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos são alvo de polimorfismos genéticos comuns que podem contribuir para a variabilidade interindividual na resposta farmacológica e toxicológica (Evans e Relling 1999). Existem muitos exemplos em que a combinação de deficiência genética nas vias de conjugação (metabolismo de fase II) com um genótipo não mutado para uma via oxidativa (metabolismo de fase I), pode tornar os substratos mais reactivos através da inserção de oxigénio ou de outras modificações químicas, o que resulta num fenótipo particularmente predisposto a reacções adversas aos fármacos ou xenobióticos ambientais (Evans e Relling 1999). Contudo, foram também referidos casos em que o aumento numa enzima oxidativa de fase I associado a um baixo grau de acetilação (fase II) resulta na diminuição de toxicidade. Por exemplo, o aumento da oxidação do agente anti-cancerígeno *amonafide* pela CYP1A associado a uma reacção de acetilação lenta resulta na diminuição do grau de mielossupressão causado pelos metabolitos activos N-acetilados deste fármaco (Evans e Relling 1999; Ratain *et al.* 1996).

Uma vez que cada indivíduo representa uma dada combinação de fenótipos, e dado o elevado número de enzimas envolvido no metabolismo, é legítimo concluir que alguns indivíduos têm uma maior propensão para sofrerem os efeitos tóxicos de xenobióticos ou de combinações de xenobióticos devido à existência de múltiplos defeitos genéticos nas enzimas metabólicas. Este quadro genotípico, especialmente quando associado a polimorfismos nos receptores, é, provavelmente, o responsável pelo aparecimento dos fenómenos de intoxicação conhecidos como idiossincráticos (Evans e Relling 1999).

Os mecanismos moleculares de inactivação ou de alteração das enzimas metabólicas incluem, (i) mutações nos locais de processamento que resultam na eliminação de exões, (ii) microssatélites, (iii) duplicação de genes, (iv) mutações resultantes em codões de terminação prematuros, (v) substituições de aminoácidos que

alteram a estabilidade proteica ou actividade catalítica e (vi) deleções completas de genes (Evans e Relling 1999).

Dentro das anfetaminas que foram objecto de estudo da presente dissertação apenas foram caracterizadas as enzimas metabolizadoras da MDMA. A metabolização pelas enzimas microssomais do citocromo P450 é determinante no metabolismo de fase I desta droga. Muitos dos metabolitos de fase I são posteriormente O-metilados pela COMT e/ou conjugados e excretados na forma de sulfatos e glucuronídeos. A maior parte destas enzimas são funcionalmente polimórficas, pelo que a sua expressão pode condicionar a farmacocinética e consequentemente a toxicidade da MDMA e das anfetaminas em geral. Em seguida descrevem-se os polimorfismos genéticos que foram caracterizados para as enzimas envolvidas na metabolização da MDMA.

2.4.3.1.1. Citocromo P450

O polimorfismo do metabolismo catalisado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) pode influenciar o risco para a dependência, a quantidade ingerida, e o desenvolvimento de reacções tóxicas associadas ao consumo de drogas de abuso, incluindo as anfetaminas (Howard *et al.* 2002).

A frequência das variantes alélicas destas enzimas varia acentuadamente entre diferentes grupos étnicos, fazendo com que a extensão e as características das diferenças na resposta farmacológica e toxicológica determinadas pela variabilidade genética sejam muito específicas para uma determinada região ou grupo étnico (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

Para além do polimorfismo genético (Anzenbacher e Anzenbacherová 2001), a variabilidade da actividade das enzimas do citocromo P450 pode resultar dos fenómenos de indução (Honkakoski e Negishi 2000; Rendic e Carlo 1997) e inibição enzimática (Rendic e Carlo 1997), sendo também condicionada pela dieta (Ioannides 1999), idade (Sotaniemi *et al.* 1997) e condições patofisiológicas (Adedoyin *et al.* 1998; Morgan 1997). A maior parte das CYPs que metabolizam os xenobióticos são indutíveis. A CYP2D6 constitui uma excepção uma vez que o aumento do potencial destoxificante da enzima se dá através da selecção de alelos que contêm múltiplas cópias do gene (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

Os factores importantes para a expressão constitutiva das CYPs são ainda desconhecidos. Pelo contrário, o conhecimento acerca dos factores de transcrição que regulam a expressão indutível tem vindo a aumentar. De uma forma geral, o controlo da expressão do citocromo P450 pode ser efectuado ao nível da transcrição, do mRNA, da tradução e após a tradução (Ingelman-Sundberg 2004a). O mecanismo de controlo mais importante dá-se ao nível da transcrição e existem três receptores citosólicos cruciais sensíveis à concentração dos xenobióticos, nomeadamente, os receptores PXR, CAR e AhR (Figura 14). O receptor AhR regula as enzimas CYP1A1, CYP1A2 e CYP2S1, o receptor PXR regula as CYP2C9 e CYP3A4 e o receptor CAR regula as CYP2B6, CYP2C9 e CYP3A4 (Ingelman-Sundberg 2004a). O aumento da concentração intracelular de xenobióticos leva à activação de várias enzimas do citocromo P450 bem como de várias enzimas envolvidas no metabolismo de fase II originando a expressão de um maior número de enzimas o que por sua vez resulta numa diminuição das concentrações de xenobióticos (Ingelman-Sundberg 2004a). Sabe-se actualmente que estes factores de transcrição estão envolvidos no controlo da maior parte das enzimas do citocromo P450, embora ainda se desconheçam os detalhes das suas acções e o sinergismo entre estes receptores e outros factores de transcrição, incluindo receptores hormonais, activadores e repressores (Ingelman-Sundberg 2004a).

De uma forma geral, os alelos responsáveis por um metabolismo alterado (diminuído, aumentado ou qualitativamente alterado) de xenobióticos foram já identificados para muitas das enzimas do citocromo P450 e os mecanismos moleculares associados foram também já elucidados (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

A importância funcional das variantes alélicas difere e a frequência da sua distribuição entre diferentes grupos étnicos também varia. A descrição dos referidos alelos, a nomenclatura recomendada, e as referências mais relevantes podem ser acedidas através da página da Internet http://www.imm.ki.se/CYPalleles.

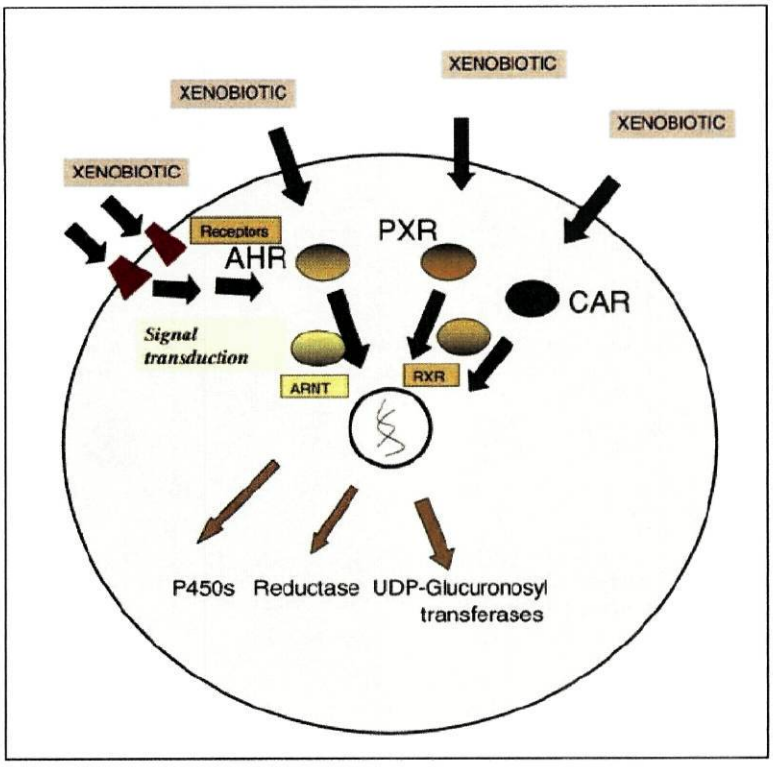


Figura 14. Mecanismos de reconhecimento de xenobióticos para a regulação das enzimas do citocromo P450 e outras enzimas metabólicas. O aumento da concentração de xenobiótico é reconhecido por receptores citosólicos (AHR, PXR e CAR), que vão por sua vez activar receptores nucleares para que se dê um aumento da expressão das enzimas metabólicas. Adicionalmente, estas vias podem ser activadas por receptores membranares através de vias de transdução do sinal que resultam na posterior activação dos receptores citosólicos. Adaptado de (Ingelman-Sundberg 2004a).

As mutações nos genes *CYP* podem traduzir-se em enzimas com actividade nula, reduzida, aumentada ou alterada (perda de capacidade de ligação ao substrato) (Figura 15). A actividade enzimática nula resulta usualmente da deleção completa do gene, mas pode também ter origem em mutações que causam alterações ao nível do processamento, codões de terminação prematuros, eliminação dos locais de iniciação da transcrição e alterações de aminoácidos (Ingelman-Sundberg 2004a). As mutações nos locais de reconhecimento do substrato podem originar a síntese de enzimas com especificidade de substrato alterada, como por exemplo acontece com o alelo *CYP2D6*17* encontrado exclusivamente em populações negras africanas (Oscarson *et al.* 1997). A especificidade de substrato pode ser também modificada por mutações responsáveis por alterações na estrutura terciária da proteína, como por exemplo acontece com o alelo *CYP2D6*10* (Fukuda *et al.* 2000). O aumento da actividade enzimática é observado em indivíduos portadores de múltiplas cópias de um gene *CYP* activo e foi descrito para os genes *CYP2D6* (Johansson *et al.* 1993) e *CYP2A6* (Rao *et al.* 2000) (Figura 15).

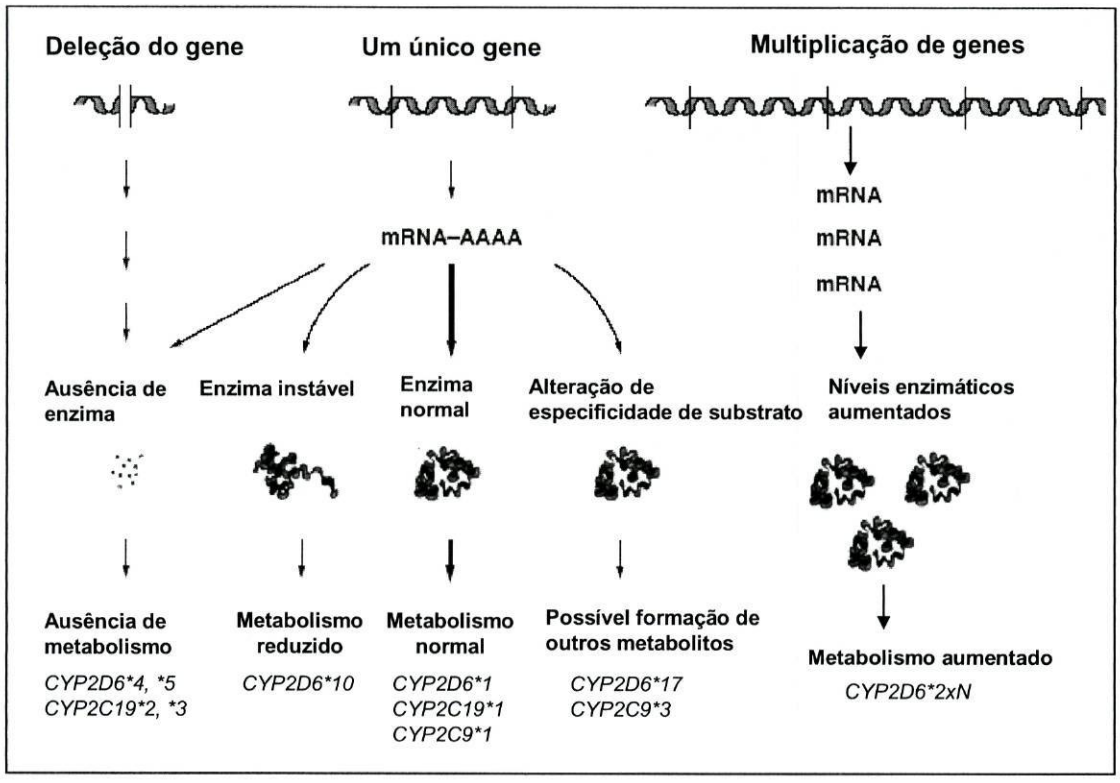


Figura 15. Principais mecanismos moleculares responsáveis por alterações no metabolismo humano e respectivos exemplos de variantes alélicas comuns de enzimas do citocromo P450. Os polimorfismos genéticos que causam a ausência de enzima ou a expressão de uma enzima inactiva incluem deleções no gene e vários tipos de mutação (codões stop prematuros, mutações nos locais de processamento). Os polimorfismos que causam trocas de aminoácidos podem originar proteínas instáveis ou alterações no local activo da enzima que alteram a especificidade de substrato. A duplicação ou a multiplicação de genes pode aumentar os níveis de mRNA e da enzima resultando no aumento do metabolismo. Adaptado de (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

Os polimorfismos nos genes *CYP* traduzem-se em quatro fenótipos distintos: (i) o de metabolizador pobre (MP), que não apresenta a enzima funcional, (ii) o de metabolizador intermédio (MI), que é heterozigótico para um alelo deficiente ou portador de dois alelos que causam uma redução da actividade enzimática, (iii) o de metabolizador extensivo (ME), que possui dois alelos normais e (iv) o de metabolizador ultra-rápido (MU), que apresenta múltiplas cópias do gene (Ingelman-Sundberg 2004b). A extensão da metabolização de um dado fármaco pode variar grandemente entre os fenótipos.

Alelos responsáveis pela inactivação de enzimas do citocromo P450

Foram identificados alelos completamente inactivos para as enzimas CYP2D6, CYP2C19 e CYP2A6. Estes alelos podem resultar de deleções genéticas, conversões genéticas com pseudogenes e SNPs. Os indivíduos homozigóticos para estes alelos apresentam total ausência de actividade enzimática e incapacidade de metabolizar os

substratos específicos da enzima, o que corresponde ao fenótipo de metabolizador pobre, também por vezes designado por metabolizador nulo (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

Alelos responsáveis pela alteração ou diminuição do metabolismo

Existem alelos com mutações que podem originar uma menor expressão da enzima funcional ou enzimas com menor afinidade para os substratos e que, deste modo, causam uma diminuição ou alteração do metabolismo. São exemplos destas alterações genéticas os alelos *CYP2D6*10* e *CYP2D6*17* descritos para as populações asiática e africana, respectivamente, bem como as variantes alélicas *CYP2C9*2* e *CYP2C9*3* descritas para enzima CYP2C9 (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

Alelos responsáveis pelo metabolismo ultra-rápido

Um outro tipo de metabolismo, conhecido como ultra-rápido, tem a sua origem na ocorrência de genes amplificados (Johansson *et al.* 1993). O exemplo mais conhecido deste fenómeno foi descrito para a enzima CYP2D6, tendo sido descritos alelos com duas, três, quatro, cinco e treze cópias de genes (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). A duplicação genética foi também descrita para a enzima glutationa S-transferase (GSTM), tendo sido identificado um alelo raro correspondendo à duplicação do gene *GSTM1* (McLellan *et al.* 1997).

2.4.3.1.1.1. CYP1A2

A CYP1A2 é uma enzima predominantemente hepática tendo como substratos aminas aromáticas, compostos policíclicos aromáticos, e variados fármacos (Anzenbacher e Anzenbacherová 2001).

Os níveis de CYP1A2 são variáveis e dependem da indução por factores ambientais e da dieta (Kall e Clausen 1995; Lampe *et al.* 2000). A CYP1A2 pode ser induzida por uma série de compostos pela via do receptor AhR (Daly 2003).

A actividade da enzima CYP1A2 apresenta, assim, uma grande variabilidade interindividual, podendo ser induzida pelo consumo de tabaco e por determinados fármacos como por exemplo, a rifampicina, fenitoína e omeprazol (Dahl 2002). As

mulheres possuem, em média, menor actividade para esta enzima do que os homens (Relling *et al.* 1992) e existem também indícios de que os anticonceptivos orais e a gravidez originam uma diminuição da sua capacidade metabólica. Apenas um polimorfismo na região codificante do gene *CYP1A2* resultante numa substituição de aminoácidos foi encontrado numa frequência significativa em populações chinesas (Huang *et al.* 1999). Os outros polimorfismos descritos são muito raros, ainda que possam apresentar uma importância funcional (Daly 2003). Foram também identificados dois polimorfismos genéticos associados à indutibilidade da enzima (Nakajima *et al.* 1999; Sachse *et al.* 1999). Estudos de fenotipagem revelaram que os fumadores portadores das variantes *CYP1A2*1C* e *CYP1A2*1F* apresentavam diferenças significativas na actividade da enzima quando comparados a fumadores portadores dos alelos não mutados, sugerindo que estes polimorfismos podem afectar a indutibilidade da enzima (Nakajima *et al.* 1999; Sachse *et al.* 1999). Um dos alelos identificados foi implicado na diminuição da actividade da CYP1A2 *in vivo* (Nakajima *et al.* 1999). No entanto, nenhum polimorfismo funcional significativo foi até à data confirmado (Welfare *et al.* 1999).

2.4.3.1.1.2. CYP2B6

Esta enzima não está ainda bem caracterizada. Os níveis hepáticos de CYP2B6 variam consideravelmente entre os indivíduos e frequentemente a sua expressão não foi detectada. Inicialmente pensava-se que esta enzima constituía apenas uma pequena percentagem do conteúdo hepático total em citocromo P450. Contudo, estudos mais recentes indicaram que, provavelmente, existe expressão desta proteína na maior parte dos indivíduos (Ekins e Wrighton 1999), mas a sua quantificação no tecido hepático por meios imunoquímicos apresenta uma grande variabilidade (entre 0,7 e 70 pmol/mg de proteína microssomal) (Ekins *et al.* 1998). Ambos os receptores PXR e CAR estão envolvidos na indução desta enzima (Goodwin *et al.* 2001; Sueyoshi *et al.* 1999).

A CYP2B6 exibe polimorfismos genéticos (Jinno *et al.* 2003), tendo sido já identificados mais de 37 alelos diferentes (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2b6.htm). A base genética para as diferenças interindividuais na expressão desta enzima foi estudada pelo grupo de Zanger e colaboradores (Lang *et al.* 2001). Nos seus

estudos foram encontradas seis variantes alélicas com cinco mutações que resultam na substituição de aminoácidos. As três mutações mais comuns, glutamina172histidina, lisina262arginina e arg487cisteína, apresentavam, respectivamente, as frequências de 28%, 32% e 14% em 215 indivíduos caucasianos. As mutações arginina22cisteína e serina259arginina apresentavam frequências de 5% e 0,5%, respectivamente. A análise dos haplotipos revelou que estas mutações podiam existir em diferentes combinações originando seis alelos diferentes (*CYP2B6*2*; **3*, **4*, **5*, **6* e **7*). O estudo da expressão hepática revelou que a mutação arginina487cisteína, comum às variantes *CYP2B6*5* e *CYP2B6*7*, causava uma diminuição significativa na expressão da enzima, não se verificando o mesmo para qualquer um dos restantes haplotipos (Lang *et al.* 2001). As variações interindividuais na actividade da CYP2B6 podem ser atribuídas a estes polimorfismos, apesar de se supor a existência de outras variantes genéticas ainda não identificadas (Ingelman-Sundberg 2004a).

2.4.3.1.1.3. CYP2D6

A enzima CYP2D6 representa um dos mais intensivamente estudados e claramente compreendidos exemplos da variação farmacogenética do metabolismo. A variabilidade da actividade desta enzima no fígado humano é atribuída exclusivamente a polimorfismos genéticos uma vez que a CYP2D6 não é indutível (Anzenbacher e Anzenbacherová 2001).

O polimorfismo genético da CYP2D6 foi originalmente descoberto de forma independente em três laboratórios diferentes como resultado de diferenças marcadas na farmacocinética e efeitos terapêuticos de vários fármacos metabolizados por esta enzima (Ingelman-Sundberg 2004b; Kroemer e Eichelbaum 1995).

A base genética do polimorfismo da CYP2D6 foi elucidada no início da década de 1990. O desenvolvimento das técnicas de genética molecular possibilitou a posterior caracterização das variantes genéticas responsáveis pela ausência ou baixos níveis de actividade da CYP2D6. Estas variantes podem corresponder a SNPs que alteram a sequência de aminoácidos da proteína codificada, SNPs que alteram o processamento do mRNA, ou mesmo deleções no gene CYP2D6 (Weinshilboum 2003). Ainda no ano de 1990 foram completamente caracterizados os alelos *CYP2D6*3* e *CYP2D6*4* (Heim e

Meyer 1990). Simultaneamente, foi identificado no Reino Unido o principal defeito genético no *locus* da CYP2D, posteriormente atribuído ao alelo *CYP2D6*4A* (Gough *et al.* 1990). Até à presente data foram já descritos 90 alelos diferentes para CYP2D6 (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm). O alelo *CYP2D6*4* é o mais frequentemente associado ao fenótipo de metabolizador pobre, com uma frequência alélica entre 12% e 21% nas populações caucasianas (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Apresenta sete mutações relativamente ao alelo *CYP2D6*1*, sendo a mutação responsável pelo defeito ao nível do processamento uma substituição G1934A na junção entre o intrão 3 e o exão 4 (Hanioka *et al.* 1990). Este alelo está praticamente ausente nas populações orientais, o que explica a baixa incidência do fenótipo de metabolizadores pobres nestas populações (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Pelo contrário, o alelo *CYP2D6*5*, que corresponde a uma deleção completa do gene *CYP2D6*, apresenta uma frequência muito semelhante em populações de diferentes origens étnicas (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Para além destes dois alelos, foi também identificado um elevado número de alelos mais raros associados ao fenótipo de metabolizador pobre. A expressão do alelo *CYP2D6*9* origina uma enzima com menor actividade catalítica (Tyndale *et al.* 1991). Foi também identificada uma mutação na extremidade 5' do gene responsável pelo comportamento bimodal do alelo comum *CYP2D6*2* e associado ao fenótipo de metabolizador intermédio em populações caucasianas (Raimundo *et al.* 2000).

Apesar de possuírem uma baixa incidência do fenótipo de metabolizadores pobres (menos de 1%), a actividade enzimática da CYP2D6 em metabolizadores extensivos orientais é mais baixa quando comparada à dos metabolizadores extensivos caucasianos. Isto deve-se à elevada frequência (cerca de 50%) do alelo *CYP2D6*10* que apresenta uma mutação no exão 1 responsável pela troca de aminoácidos prolina34serina, da qual resulta uma proteína instável (Johansson *et al.* 1994). Esta variante origina uma deficiência nas estruturas terciária e quaternária da proteína e consequentemente uma diminuição acentuada na expressão da enzima funcional (Johansson *et al.* 1994).

O mesmo perfil de metabolismo foi identificado em populações africanas tendo sido relacionado com a presença de uma outra variante, o alelo *CYP2D6*17*, identificado numa população do Zimbabwe (Masimirembwa *et al.* 1996). Os portadores deste alelo exibem uma capacidade metabólica diminuída. Esta enzima apresenta menor

afinidade para o substrato codeína e para o antagonista β-adrenérgico bufuralol *in vitro* quando comparada à enzima expressa pelo alelo não mutado (Oscarson *et al.* 1997). Estudos posteriores efectuados por Ingelman-Sundberg e colaboradores identificaram indivíduos que possuíam várias cópias adicionais do gene que codifica para a CYP2D6. Foi a primeira descoberta de uma amplificação genética estável em humanos (Johansson *et al.* 1993). Foram já descritos alelos com duas, três, quatro, cinco e treze cópias do gene *CYP2D6* e o número de indivíduos portadores destas múltiplas cópias genéticas é maior nas populações da Etiópia e Arábia Saudita, onde até um terço da população possui este genótipo (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Curiosamente, a incidência de alelos deficientes para o gene *CYP2D6* é muito baixa nestas regiões (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Em estudos posteriores foi demonstrado que as variantes alélicas correspondentes à duplicação ou amplificação do gene *CYP2D6* (*CYP2D6*1XN*, *CYP2D6*2XN* e *CYP2D6*35X2*) têm uma distribuição mais alargada a nível mundial. Estas variantes apresentam uma frequência de 29% em etíopes (Aklillu *et al.* 1996) e de cerca de 1% a 5% em caucasianos (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Nas populações italiana e turca foi já indicada uma incidência deste fenótipo de cerca de 10%, estando praticamente ausente em asiáticos e sendo muito raro nas populações do Norte da Europa (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Os dados relativamente à população da Europa Ocidental revelam uma incidência geral de 5,5% para a ocorrência do fenótipo de metabolizador ultra-rápido (Ingelman-Sundberg 2004b).

2.4.3.1.1.3.1. Influência do polimorfismo da CYP2D6 na farmacocinética da MDMA

Dada a influência da CYP2D6 no metabolismo oxidativo da MDMA e a reconhecida toxicidade dos metabolitos resultantes, foi colocada a hipótese de que os indivíduos que possuíam alelos deficientes para a CYP2D6 poderiam apresentar um risco elevado para a ocorrência dos efeitos tóxicos agudos (como por exemplo a hipertermia e os efeitos cardiovasculares associados a uma acção directa da MDMA) (Greene *et al.* 2003; Segura *et al.* 2005). Por outro lado, os indivíduos com multiplicação de alelos da CYP2D6 estariam mais predispostos à ocorrência de

neurotoxicidade dado o previsível aumento da formação dos metabolitos potencialmente neurotóxicos (Segura *et al.* 2005).

As alterações no metabolismo da MDMA e consequentemente na formação dos respectivos metabolitos catecólicos devidas à deficiência em CYP2D6 foram já avaliadas *in vitro* (Ramamoorthy *et al.* 2002; Tucker *et al.* 1994) e, mais recentemente, *in vivo* em humanos (de la Torre *et al.* 2005).

Num destes estudos foi avaliado o metabolismo em microssomas que expressavam as variantes alélicas CYP2D6*2, *10 e *17, usando a MDMA como substrato. Os autores observaram que a enzima variante CYP2D6*10 apresentava a menor capacidade metabólica, seguida pela CYP2D6*2 e CYP2D6*17 (Ramamoorthy *et al.* 2002). Os mesmos autores tinham previamente efectuado um estudo que comparava a actividade catalítica da enzima variante CYP2D6*10 com a da *wild type* CYP2D6*1 na desmetilenação da MDMA, e verificaram que a capacidade metabólica da CYP2D6*10 era muito inferior à da CYP2D6*1 (Ramamoorthy *et al.* 2001). Neste mesmo estudo os autores demonstraram igualmente que as duas variantes eram inibidas pela MDMA e que o valor de Ki era muito mais elevado no caso da variante CYP2D6*10, muito provavelemente como resultado da menor afinidade da enzima para a MDMA (Ramamoorthy *et al.* 2001).

As alterações farmacocinéticas associadas à deficiência em CYP2D6 *in vivo* foram estudadas durante um ensaio clínico realizado com dez voluntários saudáveis aos quais foi administrada MDMA de uma forma controlada (de la Torre *et al.* 2005). Um destes indivíduos era homozigótico para o alelo *CYP2D6*4*, associado a actividade enzimática reduzida, e três eram heterozigóticos para os alelos *CYP2D6*1/*4*. O perfil farmacocinético da MDMA subsequentemente avaliado exibiu diferenças de acordo com os diferentes genótipos (de la Torre *et al.* 2005). Num outro estudo realizado com a droga análoga N-etil-3,4-metilenodioxianfetamina (MDEA) foi demonstrado que um indivíduo homozigótico para o alelo *CYP2D6*4* produziu uma menor quantidade do respectivo metabolito catecólico (Kreth *et al.* 2000).

Estas observações da influência dos diferentes genótipos da CYP2D6 na farmacocinética da MDMA fomentaram estudos para a avaliação da possível associação entre o fenótipo de metabolisador pobre e a ocorrência de intoxicação aguda.

A genotipagem de três doentes que apresentavam marcada hepatotoxicidade induzida pela MDMA demonstrou que todos eram metabolisadores extensivos. O desenvolvimento de hepatotoxicidade foi atribuído apenas à ingestão de MDMA uma

vez que outras possíveis causas foram descartadas, incluindo a possível influência da hipertermia induzida pela MDMA. Os autores concluíram que a deficiência em CYP2D6 não estava associada ao desenvolvimento de hepatotoxicidade induzida pela MDMA (Schwab *et al.* 1999). Da mesma forma, outros dois estudos que recorreram à genotipagem de indivíduos intoxicados com a MDMA demonstraram que a diminuição do metabolismo oxidativo da MDMA não estava associado a uma maior susceptibilidade à ocorrência de intoxicações (Gilhooly e Daly 2002; O'Donohoe *et al.* 1998).

2.4.3.1.1.4. CYP3A4

A CYP3A4 é a principal isoforma do citocromo P450 humano no que respeita à sua abundância (cerca de 30% da totalidade do citocromo P450 hepático) e importância para a oxidação de xenobióticos (Shimada *et al.* 1994), sendo responsável por cerca de 50% do metabolismo dos fármacos com uso clínico (Ingelman-Sundberg 2004a). A CYP3A4 é altamente indutível por uma grande variedade de xenobióticos. Existe uma grande variabilidade interindividual na expressão desta enzima, podendo o conteúdo hepático microssomal da apoproteína variar entre 40 a 50 vezes (Ingelman-Sundberg 2004a). A CYP3A4 é também extensamente expressa no intestino, correspondendo a 70% da totalidade do citocromo P450 neste órgão (Ingelman-Sundberg 2004a; McKinnon *et al.* 1995).

A indução da CYP3A4 resulta da activação da transcrição mediada pelo receptor PXR (Honkakoski e Negishi 2000). A CYP3A4 é induzida por diferentes tipos de compostos, nomeadamente, agentes farmacológicos e compostos da dieta (Moore *et al.* 2000; Thummel e Wilkinson 1998).

De um modo geral, existe uma variabilidade interindividual considerável na expressão e actividade da CYP3A4 no fígado humano (Ingelman-Sundberg 2004a). A análise estatística de dados relativos à administração de substratos da CYP3A4 revelou um forte controlo genético sobre esta variabilidade (Ozdemir *et al.* 2000). Apesar de terem sido já identificados vários alelos para esta enzima, não foi ainda encontrada qualquer relação entre estes alelos e a variabilidade da sua actividade enzimática (Anzenbacher e Anzenbacherová 2001). Os esforços para sequenciar este gene a partir

de várias centenas de indivíduos permitiram apenas a identificação de alguns locais polimórficos. Até à data foram descritos 39 alelos diferentes (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm). Apenas alguns destes polimorfismos demonstraram alterar as propriedades da enzima *in vitro*. Os alelos *CYP3A4*2* (serina222prolina) e *CYP3A4*12* (leucina373fenilalanina) originam uma enzima com ligeiras alterações ao nível da especificidade para o substrato. Os alelos *CYP3A4*8* (arginina130ácido glutâmico) e *CYP3A4*13* (prolina416leucina) causam a ausência de expressão da proteína em bactérias enquanto que o alelo *CYP3A4*11* (treonina363metionina) resulta na menor expressão da enzima (Eiselt *et al.* 2001). Muitas das restantes variantes alélicas não causam, no entanto, nenhuma alteração da função enzimática *in vitro*. A análise da presença destas variantes na população humana revelou que numa população de 500 indivíduos caucasianos apenas os alelos *CYP3A4*1B* e *CYP3A4*3* se encontravam numa frequência significativa (4,1% e 1,1%, respectivamente), enquanto que as outras variantes não foram encontradas (van Schaik *et al.* 2003).

Outros possíveis mecanismos genéticos propostos para explicar a alta variabilidade na quantidade e indutibilidade da CYP3A4 observada entre os seres humanos são as variações nos genes que codificam as proteínas que regulam a transcrição do gene *CYP3A4* como, por exemplo, o receptor PXR (Hustert *et al.* 2001), bem como nos genes que determinam a regulação pós-tradução da proteína (Ingelman-Sundberg 2004a).

2.4.3.1.2. Catecol-O-metiltransferase

A enzima catecol-*o*-metiltransferase (COMT) catalisa a metilação das monoaminas neurotransmissoras, hormonas catecólicas, e fármacos como por exemplo a levodopa, metildopa e isoprenalina (Weinshilboum *et al.* 1999). No Homem, esta enzima é codificada por um único gene com dois locais de iniciação da transcrição distintos que resultam na expressão da COMT citosólica (ou forma solúvel) ou da COMT ligada à membrana (Weinshilboum *et al.* 1999). A regulação do gene *COMT* humano pode influenciar a patofisiologia de doenças muito diversas que envolvem os sistemas noradrenérgicos ou dopaminérgicos (Ameyaw *et al.* 2000; Kunugi *et al.* 1997)

e que incluem os cancros induzidos por estrogéneos, a doença de Parkinson, a depressão e a hipertensão (Ameyaw *et al.* 2000).

O polimorfismo da COMT afecta principalmente as diferenças interindividuais no metabolismo de fármacos catecólicos (Weinshilboum *et al.* 1999). Em caucasianos, as frequências dos fenótipos para os diferentes graus de actividade desta enzima são de 25% para o fenótipo asssociado a actividade elevada, 50% para o fenótipo asssociado a actividade intermédia e 25% para o fenótipo asssociado a actividade reduzida (Weinshilboum *et al.* 1999). Estes fenótipos têm sido atribuídos ao SNP G1947A que corresponde à alteração de aminoácidos valina108metionina (val108met) na COMT solúvel e val158met na COMT ligada à membrana (Lachman *et al.* 1996; Lotta *et al.* 1995; Lundstrom *et al.* 1995).

Foram observadas diferenças étnicas na actividade da COMT entre populações europeias, afro-americanas, asiáticas e africanas (McLeod *et al.* 1994; McLeod *et al.* 1998). A actividade da COMT eritrocitária é superior em indivíduos afro-americanos relativamente aos caucasianos. A frequência do fenótipo de actividade reduzida da COMT é apenas de 7% nos indivíduos afro-americanos e de 27% nos caucasianos (McLeod *et al.* 1994). A frequência de indivíduos homozigóticos para a variante G1947A que está associada ao fenótipo de actividade enzimática reduzida é de 9% numa população do Quénia, 31% em caucasianos e 27% numa população do Sudoeste asiático (McLeod *et al.* 1998). Num estudo em que foi avaliada a frequência do genótipo G1947A em indivíduos da África Ocidental ficou demonstrado que não existem diferenças significativas para este genótipo entre as populações africanas de diferentes origens geográficas e as populações afro-americanas (Ameyaw *et al.* 2000).

O estudo do efeito do polimorfismo val158met na variabilidade da resposta à anfetamina indicou que os indivíduos possuidores do genótipo met/met parecem apresentar um maior risco para o desenvolvimento de reacção adversas à anfetamina (Mattay *et al.* 2003). Num outro estudo realizado com uma população de indivíduos dependentes da metanfetamina foi encontrada uma associação entre este polimorfismo e a dependência desta droga (Li *et al.* 2004).

2.4.3.1.3. UDP-glucuroniltransferase

A glucuronidação é a reacção de conjugação mais comum no metabolismo humano. A importância da variação farmacogenética das enzimas UDP-glucuroniltransferases (UGTs) não está ainda esclarecida mas existem alguns relatos das variações interindividuais na actividade destas enzimas (Daly 2003).

O polimorfismo mais comum consiste numa inserção das bases TA na *TATA-box* (local de reconhecimento e ligação para a RNA polimerase) que resulta no decréscimo da expressão do gene (Daly 2003; Monaghan *et al.* 1996). Porém, outros polimorfismos resultantes de SNPs que originam substituições de aminoácidos podem também ser responsáveis pela expressão polimórfica destas enzimas (Aono *et al.* 1995; Daly 2003). Foram descritos polimorfismos nas sequências codificantes das enzimas UGT1A6, UGT1A7, UGT2B4, UGT2B7 e UGT2B15 (Miners *et al.* 2002). Cada um destes polimorfismos está associado a substituições de aminoácidos que podem resultar em alterações nas cinéticas enzimáticas para determinados substratos (Miners *et al.* 2002). Por exemplo, a proteína codificada pelo gene não mutado *UGT1A7*, é mais activa na glucuronidação do benzo[a]pireno do que cada uma das suas três variantes alélicas, pelo que o risco de toxicidade por exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pode ser superior para os portadores dos alelos mutados (Miners *et al.* 2002).

2.4.3.1.4. Sulfotransferase

As enzimas sulfotransferases (SULT) conjugam compostos endógenos e exógenos, incluindo neurotransmissores, transferindo um grupo sulfonato da molécula adenosina 3'-fosfato 5'-fosfossulfato (PAPS), com formação de um conjugado com sulfato (Nagata e Yamazoe 2000). Estas enzimas desempenham um papel importante no metabolismo de vários fármacos. Pelo menos 10 membros da superfamília do gene *SULT* que codifica para estas enzimas são expressos no tecido humano (Nagata e Yamazoe 2000). A sequenciação destes genes em diferentes populações revelou que muitos deles apresentam polimorfismos genéticos, alguns deles com importância funcional (Freimuth *et al.* 2001; Nagata e Yamazoe 2000).

2.4.3.2. Polimorfismo genético dos alvos de acção farmacológica e toxicológica

Para além das proteínas envolvidas na farmacocinética das anfetaminas, também as que são responsáveis pela sua acção biológica e toxicológica podem ser funcionalmente polimórficas e, como tal, estar associadas à variabilidade interindividual na susceptibilidade aos efeitos adversos causados por estas drogas de abuso. Estas proteínas podem incluir receptores, transportadores, canais iónicos, lipoproteínas, factores de coagulação, genes envolvidos no controlo do ciclo celular, sistema imune e desenvolvimento celular (Meisel *et al.* 2003).

2.4.3.2.1. Receptor da serotonina

As anfetaminas têm como alvo os receptores da serotonina (5-HT). Foi descrita uma associação entre a resposta farmacológica à clozapina e o polimorfismo T102C na região codificante do receptor 5-HT_{2A} (Hiratsuka e Mizugaki 2001; Masellis *et al.* 1995). O alelo mutado apresenta uma frequência significativamente maior nos indivíduos que não respondem a esta terapia. Uma vez que este polimorfismo não altera a expressão ou a estrutura da proteína, é provável que a resposta farmacológica seja influenciada por uma variante funcional do receptor 5-HT_{2A} que está em LD com o referido polimorfismo (Masellis *et al.* 1995).

2.4.3.2.2. Receptor da dopamina

Os polimorfismos dos receptores D3 e D4 da dopamina têm sido associados à variabilidade da resposta farmacológica no tratamento da esquizofrenia, embora os resultados de vários estudos não sejam concordantes não estando, por isso, esta associação completamente esclarecida (Cichon *et al.* 2000). No entanto, o polimorfismo do receptor D3 tem sido associado ao aumento do risco para a ocorrência da discinésia tardia induzida por fármacos neurolépticos (Steen *et al.* 1997).

Seis polimorfismos responsáveis por alterações de aminoácidos foram também identificados no gene que codifica para o receptor humano D5 (Cravchik e Gejman 1999). Entre estes polimorfismos, a alteração de aminoácidos asparagina351ácido aspártico resulta na diminuição em cerca de 10 vezes da eficácia de ligação à dopamina e de três vezes da eficácia de ligação ao agonista dopaminérgico R(+)-SKF-3893 (Cravchik e Gejman 1999).

O polimorfismo do receptor D2 da dopamina foi associado a uma maior vulnerabilidade para o abuso de drogas psicoestimulantes (Persico *et al.* 1996).

Num estudo que procurava associar o polimorfismo dos receptores D4 da dopamina e o abuso de metanfetamina foi encontrada uma associação entre um haplotipo na região promotora do gene que codifica para este receptor e o risco de dependência desta droga (Li *et al.* 2004). Um outro resultado interessante deste estudo em que foi analisado também o polimorfismo val158met do gene que codifica para a COMT, foi a existência de uma interacção significativa entre os dois polimorfismos no genes que codificam a COMT e os receptores dopaminérgicos D4, indicando um possível efeito aditivo destes polimorfismos no risco para a dependência desta droga de abuso (Li *et al.* 2004).

2.4.3.2.3. Tranportador da serotonina

A serotonina controla um sistema de comunicação neuronal altamente complexo que é mediado por múltiplos receptores pré- e pós-sinápticos. O transportador da serotonina (SERT ou 5HTT) é responsável pelo seu transporte para o interior dos neurónios pré-sinápticos, mantendo uma reserva de serotonina disponível para a subsequente libertação. Este transportador é um dos alvos iniciais da resposta toxicológica das anfetaminas.

A farmacogenética do transportador da serotonina foi alvo de uma revisão detalhada por Lesch e Gutknecht (Lesch e Gutknecht 2005). Os autores descrevem a variabilidade genética deste transportador e discutem a sua influência na ocorrência de determinadas patologias associadas ao comportamento, ansiedade, depressão, e desenvolvimento cerebral, bem como na variabilidade da resposta farmacológica aos fármacos utilizados no tratamento destas patologias e cuja acção farmacológica depende

da interacção com este transportador (Lesch e Gutknecht 2005). No Homem, a transcrição do gene que codifica o SERT (*SCL6A4*) é modulada por um elemento de repetição polimórfico localizado a montante do local de iniciação da transcrição (5HTTLPR, ou 5HTT *gene-linked polymorphic region*). Outros locais de variação genética a montante e a jusante da região codificante do gene têm sido descritos, mas este parece ser o mais importante para a variabilidade na expressão do SERT. A maior parte dos alelos caracteriza-se por elementos de repetição constituídos por 14 unidades (alelo curto) ou 16 unidades (alelo longo). Alelos constituídos por um número diferente de unidades (15, 18, 20 e 22) ou com mutações dentro destes elementos de repetição são raros. A distribuição destes alelos e consequentemente dos respectivos genótipos varia consideravelmente entre diferentes populações. Os estudos que caracterizaram a influência deste polimorfismo na capacidade de captação da serotonina pelo SERT revelaram que a expressão homozigótica do alelo curto está associada a uma menor expressão do SERT e consequentemente a uma menor capacidade de captação de serotonina (Lesch e Gutknecht 2005).

Para além deste polimorfismo, que influencia o nível de expressão do transportador, existem também polimorfismos que resultam na alteração da estrutura do SERT. Estas variantes são raras e o seu efeito na actividade do transportador não foi ainda determinado. No entanto, existem dois SNPs que alteram a sequência codificante do gene que foram já associados a alterações comportamentais relacionadas com disfunções serotonérgicas (Lesch e Gutknecht 2005).

Um estudo que avaliou os efeitos do polimorfismo 5HTTLPR na vulnerabilidade aos efeitos nocivos da MDMA ao nível cognitivo relacionados com alterações da função serotonérgica, indicou um provável efeito desta variação genética na ocorrência de deficiências ao nível cognitivo induzidas pelo consumo desta droga de abuso (Roiser *et al.* 2006). Num estudo semelhante conduzido pelo mesmo grupo de investigação tinha sido já demonstrado que os indivíduos consumidores de MDMA homozigóticos para o alelo curto demonstravam perturbações no processamento emocional determinado através da resposta a testes neuropsicológicos (Roiser *et al.* 2005). Pelo contrário, os indivíduos homozigóticos para este alelo e que não consumiam MDMA não apresentavam esta perturbação. Com base nestes resultados os autores consideraram que existe um maior risco para o desenvolvimento de disfunções ao nível emocional em indivíduos que consomem MDMA e que são portadores do alelo curto, sendo mais susceptíveis aos efeitos induzidos pela MDMA no sistema serotonérgico (Roiser *et al.*

2005). O genótipo para o SERT parece também influenciar as respostas aos efeitos das anfetaminas avaliados por uma série de testes comportamentais após administração controlada de *d*-anfetamina (Lott *et al.* 2006).

2.4.3.2.4. Outros alvos da acção toxicológica das anfetaminas

O efeito do polimorfismo da enzima glutationa-S-transferase M1 (GSTM1) no abuso de metanfetamina foi estudado, na medida em que esta enzima é crucial para a destoxificação das espécies reactivas resultantes do stress oxidativo induzido por esta droga de abuso a nível cerebral e que tem sido implicado na sua neurotoxicidade. Este estudo revelou uma possível associação entre o polimorfismo nesta enzima metabólica e a vulnerabilidade à psicose induzida pela metanfetamina numa população japonesa (Hashimoto *et al.* 2005).

O transportador da dopamina (DAT) é também um importante local de acção para a anfetamina. O efeito do polimorfismo no transportador DAT1 (codificado pelo gene *SLC6A3*) revelou que os diferentes genótipos estavam associados a uma diferente susceptibilidade aos efeitos subjectivos decorrente da administração de *d*-anfetamina, demonstrada num ensaio clínico em condições controladas. Neste ensaio clínico verificou-se uma possível influência da variabilidade genética deste transportador na susceptibilidade aos efeitos psicoestimulantes e consequentemente no risco de dependência deste tipo de drogas (Lott *et al.* 2005). Estes genótipos foram também associados a um diferente risco para o desenvolvimento de psicose numa população de indivíduos consumidores de metanfetamina (Ujike *et al.* 2003).

Outras proteínas cuja expressão polimórfica pode influenciar a resposta e/ou dependência das anfetaminas incluem o factor neurotrófico cerebral (Flanagin *et al.* 2006), o péptido opiáceo prodinorfina (Nomura *et al.* 2006), o receptor da adenosina do subtipo A_{2A} que modula o efeito dos receptores dopaminérgicos (Hohoff *et al.* 2005), a subunidade do receptor GABAérgico γ_2 (Nishiyama *et al.* 2005), e o receptor opióide μ (Ide *et al.* 2006).

PARTE II

Trabalho Experimental

3. OBJECTIVOS

A presente dissertação pretende contribuir para a caracterização do perfil toxicológico de derivados anfetamínicos através da avaliação da influência da biotransformação na expressão de toxicidade deste tipo de drogas. Adicionalmente pretende avaliar a influência do polmorfismo genético do metabolismo humano na variabilidade interindividual observada na susceptibilidade aos efeitos tóxicos destes compostos.

Deste modo, os estudos realizados no âmbito da presente dissertação tiveram como principais objectivos:

- A caracterização do perfil metabólico *in vivo* de dois novos derivados anfetamínicos, a 4-MTA e a 2C-B, usando o ratinho como modelo animal

- A caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B *in vitro*, usando hepatócitos criopreservados humanos e de cinco diferentes espécies animais (macaco, cão, coelho, rato e ratinho)

- A caracterização da citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B, usando o modelo experimental dos hepatócitos criopreservados humanos e de cinco diferentes espécies animais (macaco, cão, coelho, rato e ratinho)

- A avaliação da influência da variabilidade genética do metabolismo catalizado pela enzima polimórfica CYP2D6 na expressão da citotoxicidade da 4-MTA e da MDMA

4. METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS TRABALHOS EXPERIMENTAIS

Para cumprir os objectivos propostos para a presente dissertação foi necessário seleccionar as metodologias que se afiguravam mais adequadas à obtenção dos resultados. Esta escolha resulta inevitavelmente do compromisso entre as metodologias ideais e a disponibilidade de equipamentos e condições laboratoriais. A descrição dos protocolos e métodos, de um modo que permita uma possível replicação do trabalho experimental, foi feita de forma detalhada nas secções dedicadas aos Materiais e Métodos dos trabalhos experimentais que de seguida se apresentam na forma das publicações a que deram origem. Por este motivo, pretende-se neste capítulo justificar a utilização das metodologias seleccionadas para responder às questões analíticas e experimentais que surgiram ao longo do estudo. São apenas apresentadas com maior detalhe as metodologias cuja descrição não consta nas referidas secções dos artigos que integram a presente dissertação.

4.1. Caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B in vivo e in vitro por GC/MS

Para o estudo do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B *in vivo* e *in vitro* foi adoptada uma metodologia de cromatografia gasosa com detector de massa (GC/MS). As metodologias descritas nos trabalhos experimentais resultam da adaptação e optimização dos métodos implementados e validados pelo Laboratório de Análises e Dopagem (LAD) português, que são utilizados na rotina laboratorial para o despiste deste tipo de compostos como agentes dopantes, tendo sido aplicados nestes trabalhos experimentais a estas drogas de abuso nas diferentes matrizes em que foram analisadas (urina de ratinho, suspensões celulares de hepatócitos e meio de cultura celular). Estes métodos garantem um elevado padrão de qualidade da análise para a identificação inequívoca de substâncias, num curto espaço de tempo, tal como é indispensável nas análises de controlo de dopagem (Hemmersbach e de la Torre 1996).

Os métodos analíticos de GC/MS são indubitavelmente os mais extensamente utilizados e referidos na literatura científica para a análise qualitativa e quantitativa das drogas de abuso, incluindo as anfetaminas. Existem na literatura vários exemplos da aplicação de metodologias semelhantes às que foram implementadas nos trabalhos experimentais da presente dissertação que demonstraram ser adequadas para o estudo analítico deste tipo de compostos e também dos seus metabolitos (Ensslin *et al.* 1996; Maurer 1996). Para a confirmação analítica destes compostos em casos forenses e de controlo de dopagem é obrigatório o uso de metodologias por GC/MS (Hemmersbach e de la Torre 1996; Kraemer e Maurer 1998). O uso de detectores menos específicos como, por exemplo, o detector de fósforo e nitrogénio (NPD) ou o detector electroquímico, que são particularmente úteis na análise quantitativa, não dispensa o uso do detector de massa quando se pretende a confirmação analítica da presença destas drogas de abuso e/ou dos seus metabolitos (Kraemer e Maurer 1998).

Uma vez que o perfil metabólico das duas drogas em estudo era à partida desconhecido, a utilização do detector de massa foi crucial para a interpretação dos espectros correspondentes aos picos seleccionados como suspeitos após comparação dos cromatogramas obtidos por análise dos extractos de urina dos animais dos animais ou suspensões celulares controlo e dos cromatogramas obtidos após administração *in vivo* ou incubação *in vitro* das drogas. A subsequente interpretação do perfil de fragmentação dos espectros obtidos permitiu propor a estrutura molecular dos possíveis metabolitos que foram encontrados, quer com a administração *in vivo* das drogas a ratinhos, quer após a incubação dos diferentes modelos de células testadas nos estudos *in vitro*.

A preparação das amostras, que inclui processos extractivos e de derivatização, é um pré-requisito importante para a análise cromatográfica de amostras biológicas. Os métodos extractivos mais frequentemente utilizados na análise das anfetaminas recorrem a extracções líquido/líquido (Hemmersbach e de la Torre 1996). São também muito frequentemente adoptados processos extractivos que recorrem a colunas de separação de compostos (colunas SPE, *solid phase extraction*) que estão disponíveis comercialmente e que são preparadas com diferentes materiais de enchimento optimizados para a separação de diferentes tipos de compostos. Estes métodos de SPE apresentam a vantagem de possuir uma maior capacidade de purificação dos extractos, facilitando deste modo a análise cromatográfica (Hemmersbach e de la Torre 1996). Adicionalmente, estes métodos permitem a utilização de um volume substancialmente menor de solventes orgânicos o que constitui uma enorme vantagem em termos

ambientais e também para o operador (Hemmersbach e de la Torre 1996). Apesar das reconhecidas vantagens dos métodos extractivos por SPE, foram adoptadas extracções líquido/liquido nas metodologias desenvolvidas no âmbito do trabalho experimental da presente dissertação. O solvente utilizado nas extracções alcalinas da urina nos estudos *in vivo* e adoptado pelos protocolos do LAD, o terc-butilmetiléter, é especialmente recomendado para a extracção deste tipo de compostos, tendo sido demonstrada a elevada recuperação (superior a 80%) das anfetaminas com este solvente extractor (Hemmersbach e de la Torre 1996). Por outro lado, o seu baixo ponto de ebulição (55 ºC) torna-o igualmente adequado ao processo extractivo (Hemmersbach e de la Torre 1996). Para as extracções ácidas da urina foi utilizada a mistura de solventes n-hexano/acetato de etilo (9:1; v/v) de acordo com os protocolos existentes no LAD. Nas extracções das suspensões celulares ou de meio de cultura celular, cada uma das extracções, ácida e alcalina, foi precedida de uma extracção prévia utilizando como solvente extractor uma mistura dos solventes n-hexano/acetato de etilo (9:1; v/v), conduzida a pH ácido no caso das extracções alcalinas, e a pH alcalino no caso das extracções ácidas, para uma maior purificação dos extractos. Dada a maior complexidade do meio de incubação das células, optou-se por utilizar uma mistura de solventes com maior polaridade relativamente aos solventes utilizados nas amostras de urina. O solvente extractor utilizado nas extracções ácidas e alcalinas das amostras dos estudos *in vitro* foi uma mistura de clorofórmio e 2-propanol (9:1; v/v) que tem sido utilizado na extracção de aminas simpaticomiméticas, incluindo as anfetaminas (Valentine e Middleton 2000).

Após a extracção podem ocorrer perdas dos compostos dado que é necessário empregar processos evaporativos para eliminar o solvente extractor. Para prevenir as perdas por evaporação são por vezes adicionados outros reagentes, como por exemplo ácido clorídrico aos extractos alcalinos, para que ocorra a formação de sais com menor volatilidade. No entanto, este procedimento resulta por vezes na formação de artefactos indesejáveis (Kraemer e Maurer 1998). Nos trabalhos experimentais desta dissertação foi utilizado para este fim o reagente N-metil-bis-trifluoroacetamida (MBTFA) que foi adicionado após ocorrer a maior parte do processo de evaporação das amostras. A adição deste reagente constitui o melhor método para prevenir a perda de compostos por evaporação (Hemmersbach e de la Torre 1996). Esta evaporação foi feita sem aquecimento e sob uma corrente de azoto muito moderada também com o objectivo de minimizar as perdas de compostos voláteis.

Para a análise destes compostos, é indispensável a sua derivatização para obter uma sensibilidade suficiente na sua detecção (Ewald *et al.* 2005). A derivatização permite melhorar as qualidades cromatográficas dos compostos (nomeadamente modificando a sua polaridade, para uma melhor separação na fase estacionária apolar da coluna cromatográfica) e também a formação de fragmentos mais característicos no espectro de massa, o que por sua vez permite uma melhor diferenciação dos grupos funcionais (Segura *et al.* 1998). Isto é particularmente importante para a análise qualitativa de compostos cuja estrutura é à partida desconhecida, e para cuja identificação estrutural é necessária a interpretação do perfil de fragmentação obtido no respectivo espectro de massa.

São muito variados os reagentes de derivatização utilizados nas metodologias de GC/MS e que resultam na inclusão de diferentes grupos químicos nas moléculas a analisar (Segura *et al.* 1998). Nos trabalhos experimentais da presente dissertação foram utilizadas como reacções de derivatização dos extractos alcalinos a trifluoroacetilação com o reagente MBTFA [que reage com aminas primárias e secundárias; (N-TFA)] e a trimetilsililação com o reagente N-metil-(N-trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) [que reage com os grupos hidroxilo (alifáticos e aromáticos) e carboxilo; (O-TMS)]. Estas reacções de derivatização encontram-se entre as mais comummente adoptadas para este tipo de compostos (Hemmersbach e de la Torre 1996; Kraemer e Maurer 1998) originando derivados que são muito estáveis em solução e com excelentes propriedades cromatográficas para GC (Segura *et al.* 1998). A utilização do laranja de metilo permitiu garantir a selectividade da derivatização N-TFA e O-TMS, impedindo a formação de outros derivados (por exemplo, N-TFA-TMS ou N-TFA-TFA) (Pilon 1997). Foi também utilizado um processo de derivatização alternativo usando como reagentes o anidrido trifluoroacético (TFAA) e o acetato de etilo que resulta na trifluoroacetilação quer dos grupos amina primários e secundários, quer dos grupos hidroxilo e carboxilo (N,O-TFA) (Pilon 1997). Os extractos ácidos foram derivatizados por trimetilsililação com o reagente MSTFA (Pilon 1997) e o catalisador trimetilclorosilano (TMSC) que aumenta a capacidade derivatizante do MSTFA (Segura *et al.* 1998). A utilização de diferentes processos de derivatização permite, por análise comparativa dos respectivos espectros, compreender melhor a fragmentação dos compostos, sendo desta forma uma ajuda substancial para a identificação da estrutura molecular dos compostos detectados (Segura *et al.* 1998).

A possibilidade do uso da eluição em cromatografia líquida acoplada ao detector de massa (LC/MS) pode dispensar o uso de reacções de derivatização, tendo sido descritos vários estudos em que foram obtidos bons resultados analíticos na ausência deste processo [ver referências em (Kraemer e Maurer 1998)]. No entanto, o desempenho cromatográfico de aminas primárias e secundárias é deficiente, pelo que a maior parte das metodologias de LC utiliza também procedimentos de derivatização para a optimização do comportamento cromatográfico e da detecção (Kraemer e Maurer 1998).

A análise por cromatografia gasosa é feita mediante separação em colunas capilares com enchimento de sílica. Para além da fragmentação característica observada nos espectros de massa, a identidade dos compostos pode ser adicionalmente assegurada pela elevada reprodutibilidade dos índices de retenção (obtidos pela razão entre o tempo de retenção do composto e o do padrão interno) nestas colunas cromatográficas. Nos métodos de GC/MS os compostos mais adequados para serem utilizados como padrão interno são os isótopos estáveis (por exemplo deuterados) dos compostos a analisar, uma vez que, na maior parte dos casos, são estes os análogos que mais se assemelham nas propriedades analíticas do composto em estudo (Kraemer e Maurer 1998). Uma vez que estes isótopos não estavam disponíveis no caso da 4-MTA e da 2C-B, foi utilizado como padrão interno o composto fenilpropanolamina para as fracções resultantes da extracção alcalina. Este metabolito β-hidroxilado da *d*-anfetamina foi escolhido porque o objectivo destes estudos era a análise do perfil metabólico, pelo que se esperava a presença de compostos com maior hidrofília relativamente aos compostos pai. Quando se testou a possibilidade de formação dos metabolitos β-hidroxilados da *d*-anfetamina foi necessário utilizar outro composto como padrão interno, tendo sido escolhidos os compostos nalorfina e toliprolol que são utilizados nos métodos validados do LAD. Para as fracções acídicas foi utilizado o ketoprofeno como padrão interno, tal como previsto nos protocolos do LAD.

A utilização de temperaturas elevadas no injector e na coluna cromatográfica pode resultar na formação de artefactos analíticos, o que constitui uma desvantagem da utilização da GC para a separação cromatográfica (Kraemer e Maurer 1998), ao contrário do que acontece com a eluição por cromatografia líquida. Após separação cromatográfica, os compostos são então fragmentados e detectados no detector de massa. Nos trabalhos experimentais foi utilizado um detector de massa do tipo quadrupolo simples com ionização por impacto electrónico. Existem dois métodos

possíveis para a detecção dos iões resultantes da fragmentação dos compostos que eluem da coluna cromatográfica. Um destes métodos baseia-se na detecção selectiva de alguns iões característicos que são previamente seleccionados (método SIM). O método utilizado nos trabalhos experimentais desta dissertação foi o método de detecção por varrimento contínuo (*full-scan*). Apesar da maior selectividade do método SIM, a natureza da análise dos trabalhos experimentais levou à escolha do modo de detecção em varrimento contínuo para aumentar a probabilidade de encontrar compostos que potencialmente corresponderiam a metabolitos e que poderiam não ser detectados se fosse feita uma escolha prévia de apenas alguns iões a monitorizar.

À excepção dos compostos 4-MTA, 2C-B, ácido 4-metiltiobenzóico e ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético, para os quais estavam disponíveis padrões, a interpretação dos espectros de massa dos metabolitos foi feita com base no perfil de fragmentação do espectro, comparando com os compostos pai ou compostos análogos para os quais se esperava um perfil de fragmentação semelhante, e recorrendo à bibliografia para a interpretação dos fragmentos característicos dos grupos funcionais derivatizados (Halket 1993; Pelah *et al.* 1963).

4.2. Utilização de hepatócitos criopreservados para a caracterização do perfil metabólico e da citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B in vitro

Para o estudo do perfil metabólico e citotoxicidade *in vitro* da 4-MTA e da 2C-B em hepatócitos humanos foram utilizados hepatócitos criopreservados e hepatócitos obtidos imediatamente após o isolamento (pós-isolamento) que foram incubados com diferentes concentrações destas drogas em suspensão celular. A disponibilidade de hepatócitos criopreservados de cinco outras espécies (ratinho, rato, coelho, cão e macaco) permitiu a realização de um estudo comparativo inter-espécies.

Os hepatócitos primários constituem um modelo *in vitro* de reconhecida utilidade para estudos metabólicos. Estes modelos demonstraram ser mais vantajosos do que outros modelos *in vitro* para a metabolização de compostos, como por exemplo as fracções microssomais, como resultado do efeito de barreira oferecido pela integridade da membrana celular e da perda de co-factores que ocorre na preparação dos homogeneizados celulares (Hengstler *et al.* 2000b). Existe também uma boa correlação

entre os resultados *in vitro* obtidos com os hepatóctos e os resultados obtidos *in vivo* (Akrawi *et al.* 1993; de Sousa *et al.* 1995; Kelly *et al.* 1992; Li *et al.* 1997), o que permite utilizar este modelo *in vitro* para prever o metabolismo *in vivo* de compostos cujo perfil metabólico é à partida desconhecido. Isto é de particular importância no caso das anfetaminas cuja investigação *in vivo* em humanos está fortemente condicionada pelas restrições éticas que lhe estão naturalmente associadas. No caso dos hepatócitos humanos, a criopreservação permite tornar as experiências independentes da imprevisibilidade na obtenção de tecido hepático fresco para a obtenção das células isoladas. A viabilidade destas células após isolamento, criopreservação e descongelamento é superior a 80%. A actividade de diferentes enzimas incluindo as UDP-glucoronosiltransferases, glutationa-S-transferases, sulfotransferases, epóxido hidrolase, entre outras, foi testada e avaliada em cerca de 60% relativamente aos hepatócitos isolados pós-isolamento, uma vez que pode haver perda destas enzimas como resultado do procedimento de isolamento e subsequente criopreservação das células. (Hengstler *et al.* 2000b). Deste modo, os hepatócitos criopreservados em suspensão têm sido aplicados com sucesso a estudos metabólicos de curta duração (até 3 a 4 h) e também como modelos de metabolização em estudos de mutagenicidade (Hengstler *et al.* 2000b). Os estudos que requerem tempos de incubação mais prolongados podem ainda recorrer a estas células, mas neste caso torna-se necessário utilizar técnicas de cultura celular. A viabilidade celular dos hepatócitos criopreservados em suspensão decresce rapidamente a partir de 3 a 4 h de incubação. Deste modo, quando se pretendem estudar reacções metabólicas mais lentas (por exemplo, algumas reacções de metabolismo de fase II), ou fenómenos de indução enzimática, estas células são mantidas em condições de cultura celular (Hengstler *et al.* 2000a). Mesmo quando as células são mantidas em cultura, é provável que a expressão das enzimas, apesar de estável durante vários dias e até semanas, ocorra em muito menor grau do que acontece *in vivo* (Hengstler *et al.* 2000b). No entanto, isto não compromete a utilidade deste modelo e existem muitos estudos em que os hepatócitos criopreservados, quer em suspensão, quer em cultura, foram aplicados com sucesso para a avaliação de metabolismo e de citotoxicidade (Bronley-DeLancey *et al.* 2006; Brown *et al.* 2006; de Sousa *et al.* 1999; Guillouzo *et al.* 1999; Hewitt *et al.* 2000; Koebe *et al.* 1999; Li 1999; Li *et al.* 1999a; Li *et al.* 1999b; Lu *et al.* 2006; Madan *et al.* 1999; Reinach *et al.* 1999; Silva *et al.* 1999; Skett *et al.* 1999; Steinberg *et al.* 1999).

Os passos fundamentais para a obtenção destas células são três: o isolamento dos hepatócitos, a sua criopreservação e o descongelamento e posterior incubação.

Para o isolamento dos hepatócitos humanos foram utilizadas porções de tecido hepático obtido após intervenção cirúrgica, que foi imediatamente refrigerado e transportado nestas condições até ao laboratório. Para optimização da perfusão as fracções de tecido obtidas devem ter aproximadamente 100 g, sendo por vezes necessário seccionar o tecido tendo em atenção que este só deverá apresentar uma superfície de corte onde são introduzidas as cânulas para perfusão através dos vasos de maior calibre presentes nessa superfície. A perfusão inicia-se com uma solução tampão contendo EGTA e decorre a pH fisiológico (7,4) e a 37 ºC. As soluções são previamente saturadas com carbogénio que é posteriormente adicionado de forma contínua ao longo da perfusão. O fluxo de perfusão deve também ser ajustado. Após 20 minutos de perfusão com esta solução é feita a substituição por uma solução idêntica sem EGTA, durante 20 minutos. Seguidamente é feita a perfusão com um tampão contendo colagenase durante aproximadamente 30 minutos. A escolha da enzima é crítica para a boa qualidade dos hepatócitos humanos, ao contrário do que acontece com os hepatócitos de rato e de ratinho. Deste modo, a escolha prévia do lote de enzima a utilizar é necessária, bem como o ajuste da quantidade de enzima utilizada em função do lote. Após perfusão enzimática o tecido é removido do sistema de isolamento de células e transferido para uma placa de petri com tampão de suspensão. Este tampão contém, para além das soluções salinas, glucose, vários aminoácidos, glutamina, insulina e albumina sérica bovina. O tecido é rompido e as células são colocadas em suspensão que é filtrada, centrifugada e sujeita a duas lavagens com solução de suspensão para eliminar as células inviáveis. Após suspensão dos hepatócitos depositados, a viabilidade celular é avaliada através do método da exclusão do azul de tripano. As células podem então ser directamente utilizadas para incubação dos hepatócitos pós-isolamento (com uma eventual centrifugação prévia por percoll para aumentar a viabilidade celular da suspensão antes da incubação dos compostos) ou então são criopreservadas e posteriormente descongeladas para a realização da incubação com os compostos. Nos trabalhos experimentais da presente dissertação foram efectuados ambos os estudos em hepatócitos humanos pós-isolamento e criopreservados.

O isolamento dos hepatócitos de ratinho obedece aos mesmos passos, sendo no entanto o procedimento mais simples. A perfusão (não enzimática e enzimática) é feita

in situ mediante canulação da veia porta. As soluções utilizadas são diferentes na sua composição para os hepatócitos humanos e de ratinho, mas o princípio da perfusão é semelhante. Inicialmente a perfusão é feita com um tampão contendo EGTA que é depois substituído por um tampão contendo colagenase e sem EGTA. Após perfusão o fígado é removido e obtém-se uma suspensão celular de um modo semelhante ao utilizado com os hepatócitos humanos. Após determinação da viabilidade celular as células são criopreservadas. O rendimento celular obtido após o isolamento dos hepatócitos de ratinho foi relativamente baixo, nas condições laboratoriais disponíveis e com o lote de enzima utilizado. Por este motivo foram realizados vários isolamentos e as suspensões celulares obtidas da perfusão do fígado de quatro a cinco animais, que foram reunidas e criopreservadas. Os hepatócitos de rato, coelho, cão e macaco foram disponibilizados pelo Professor Jan Georg Hengstler (Instituto de Toxicologia da Universidade de Mainz, Alemanha) não tendo sido realizado o seu isolamento e criopreservação no decurso dos trabalhos experimentais.

Para a criopreservação dos hepatócitos, a densidade da suspensão celular é ajustada a três milhões de células por mL. Após uma incubação no tampão de suspensão durante 30 minutos a 37 ºC e com carbogénio a suspensão celular é centrifugada a 4 ºC após ser medido o seu volume. Cerca de dois terços do sobrenadante é removido e as células são então suspensas no restante volume. A esta suspensão celular é adicionado cerca de 50% do volume inicial da suspensão (antes da centrifugação) de tampão de suspensão refrigerado contendo 12% (v/v) de DMSO, o que resulta numa concentração final de 4% de DMSO e cerca de 6 milhões de células por mL de suspensão celular. Após um período de 5 minutos é adicionado um volume de tampão de suspensão contendo 16% (v/v) de DMSO suficiente para completar o volume inicial da suspensão celular, o que resulta numa concentração final de 10% de DMSO e cerca de 3 milhões de células por mL. Após um novo período de 5 minutos a suspensão celular é dividida por criotubos contendo cada um cerca de 1,5 mL de suspensão celular. O programa de congelamento é imediatamente iniciado, não devendo passar mais do que 10 minutos após a última adição de DMSO para evitar o dano celular. O congelamento é feito em câmara de arrefecimento apropriada cujo ciclo de arrefecimento é previamente programado e controlado através de software adequado, sendo a temperatura final de -100 ºC. O programa de arrefecimento depende de cada tipo de célula e no caso dos hepatócitos compõe-se das seguintes etapas: (i) um arrefecimento inicial até aos 0 ºC durante 10 minutos mantendo-se esta temperatura durante 8 minutos, (ii) um

arrefecimento até -8 ºC durante 4 minutos, (iii) um arrefecimento a -28 ºC durante 0,1 minutos, (iv) um arrefecimento a -33 ºC durante 2 minutos seguido de (v) um aquecimento a -28 ºC durante 2 minutos, (vi) um arrefecimento a -60 ºC durante 16 minutos e finalmente (vii) um arrefecimento a -100 ºC durante 4 minutos. Quando terminado o programa de congelamento os criotubos são transferidos imediatamente para um tanque de azoto líquido onde são guardados até ao descongelamento.

Para o descongelamento é feito um aquecimento inicial rápido dos criotubos em banho de água termostatado a 37 ºC. Seguidamente a suspensão celular é transferida para um matraz ao qual são adicionadas lentamente e com intervalos de 3 minutos, alíquotas de volume progressivamente maior (0,5; 1; 2 e 3 vezes o da suspensão celular) de tampão de suspensão refrigerado sem carbogénio, com o objectivo de diminuir a concentração do DMSO em solução e minimizar o dano celular. A suspensão celular é finalmente centrifugada e o sobrenadante removido. Os hepatócitos assim obtidos são suspensos em tampão de suspensão e sujeitos, na maior parte das vezes, a uma centrifugação por percoll para aumento da viabilidade celular da suspensão.

Os factores mais críticos para a obtenção de hepatócitos criopreservados com boa qualidade são: (i) o protocolo de congelamento, (ii) a concentração do reagente crioprotector (10% de dimetilsulfóxido, DMSO), (iii) a adição lenta do DMSO antes da criopreservação e a remoção igualmente lenta deste reagente após o descongelamento, (iv) a utilização do carbogénio durante o isolamento e antes da criopreservação, e (v) a remoção de células não viáveis utilizando uma centrifugação por percoll após descongelamento das células (Hengstler *et al.* 2000b).

O protocolo para o isolamento, criopreservação e descongelamento das células, que aqui se pretende apresentar de forma mais detalhada, uma vez que a sua descrição não consta dos artigos que de seguida se apresentam, está descrito na referência bibliográfica (Hengstler *et al.* 2000b). Nesta referência consta também a descrição detalhada das soluções, técnicas e condições laboratoriais, empregues nos trabalhos experimentais da presente dissertação.

Para avaliar o perfil metabólico e a citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B neste modelo celular foram realizadas incubações dos hepatócitos obtidos das diferentes espécies. Estas incubações decorreram nas condições especificadas nos artigos, tendo sido efectuadas no tampão de suspensão, a 37 ºC, com agitação moderada, e durante um período de 3 h. No início e no final deste tempo de incubação foram retiradas alíquotas que se conservaram a -80 ºC até análise do perfil metabólico por GC/MS recorrendo às

metodologias acima descritas. Para a avaliação da citotoxicidade foram retiradas alíquotas que se conservaram a -20 °C até ao momento da determinação do conteúdo intracelular de ATP. Esta determinação foi efectuada recorrendo a um kit disponível comercialmente. O procedimento laboratorial consiste na lise celular e extracção do ATP, seguida da medição de luminescência após adição do reagente contendo a mistura da enzima luciferase e do cromogéneo luciferina. A concentração de ATP foi determinada com recurso a uma curva de calibração efectuada diariamente com padrões de ATP preparados nas concentrações adequadas.

4.3. Utilização do ensaio da eficácia de crescimento de colónias celulares para a avaliação da influência do polimorfismo da enzima CYP2D6 na citotoxicidade da MDMA e da 4-MTA

No protocolo utilizado para a avaliação da influência do polimorfismo da enzima CYP2D6 na citotoxicidade da MDMA e da 4-MTA recorreu-se à utilização de linhas celulares geneticamente modificadas para a expressão de enzimas do citocromo P450 humanas. As células V79 são fibroblastos pulmonares da estirpe de Hamster Chinês (*Cricetulus griseus*). Estas linhas celulares foram estabelecidas na década de 1950 [ver referência (Ford e Yerganian 1958) em (Doehmer *et al.* 1999)] e desde então têm sido extensamente usadas em ensaios toxicológicos. As características destas linhas celulares tornam-nas extremamente úteis em estudos de citotoxicidade e mutagenicidade. Estas células são particularmente vantajosas em ensaios de mutagenicidade porque (i) possuem um cariótipo diplóide e estável, (ii) têm uma eficácia de crescimento de colónias superior a 90%, (iii) têm um tempo de duplicação inferior a 12 h, (iv) são morfologicamente estáveis e (v) não apresentam qualquer actividade enzimática do sistema citocromo P450 (Doehmer *et al.* 1999). A incapacidade destas células em activar metabolicamente os xenobióticos cujos metabolitos tóxicos são formados pela via do citocromo P450 foi ultrapassada pelo uso de fracções microssomais pós mitocondriais (S9) (Horner *et al.* 1985) ou de culturas primárias de hepatócitos (Langenbach *et al.* 1978) de origem animal e/ou humana. Esta aparente desvantagem foi convertida numa enorme vantagem com o aparecimento das linhas celulares V79 geneticamente modificadas para a expressão de enzimas do citocromo P450 animais e

humanas (Doehmer *et al.* 1999) ao possibilitar o estudo da influência das diferentes isoformas das enzimas do citocromo P450 na expressão de citotoxidade e mutagenicidade dos xenobióticos (Philip *et al.* 1999; Rueff *et al.* 1996). Com a possibilidade de modificar geneticamente estas células para a expressão de enzimas do metabolismo de fase II ou mesmo obter linhas que expressam simultaneamente enzimas do citocromo P450 e enzimas do metabolismo de fase II como, por exemplo, glutationa-S-transferases (Fields *et al.* 1999), N-acetiltransferases (Gabelova *et al.* 2002) e sulfotransferases (Teubner *et al.* 2002), construíram-se novas ferramentas precisas e específicas para estudos toxicológicos metabólicos, mecanísticos, e de interacção entre o metabolismo e a citotoxicidade dos xenobióticos. A expressão de enzimas de diferentes espécies animais e humanas pode contribuir para a compreensão das diferenças na activação metabólica e na toxicidade para as diferentes espécies e auxiliar à extrapolação dos resultados obtidos da experimentação animal para a exposição em humanos (Doehmer *et al.* 1999). Deste modo, estes estudos *in vitro* permitem não só reduzir o número de animais necessários na experimentação animal como conferem também maior confiança na extrapolação dos resultados para a situação humana, especialmente no que respeita ao uso dos modelos que expressam enzimas humanas.

A mais vasta aplicação do ensaio de eficácia de crescimento de colónias celulares tem sido na realização de ensaios de mutagenicidade e citotoxicidade de xenobióticos sem activação metabólica, por exemplo, de potenciais fármacos anticancerígenos (Barca *et al.* 1999) ou de poluentes ambientais (Svensson *et al.* 1997). Os ensaios de mutagenicidade *in vitro* com activação metabólica constam dos ensaios validados e recomendados pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) e pela EPA (*Environmental Protection Agency*) (EPA 1998; OECD 1997). Para a activação metabólica, estes protocolos recomendam a incubação simultânea das células V79 com o composto em estudo e fracções microssomais S9 ou o recurso a células geneticamente modificadas para a expressão das isoenzimas do citocromo P450 que estão envolvidas no metabolismo do composto (EPA 1998; OECD 1997; Rueff *et al.* 1996).

Vários são os estudos que indicam que este modelo possui relevância clínica ao permitir a extrapolação dos resultados *in vitro* para a situação humana *in vivo*. Vários compostos com propriedades farmacológicas e/ou toxicológicas foram estudados utilizando o modelo das células V79 genéticamente transformadas para a expressão de enzimas humanas, incluindo o tamoxifeno (Krebsfaenger *et al.* 2003), dextrometorfano

(Coecke *et al.* 2001), bufuralol (Coecke *et al.* 2001), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Doehmer *et al.* 1999), ciclofosfamida (Philip *et al.* 1999) e ifosfamida (Philip *et al.* 1999). No entanto, as células V79 não constituem um alvo de toxicidade das drogas em estudo, como por exemplo, os hepatócitos ou os neurónios, não permitindo desta forma a identificação de mecanismos de toxicidade específicos de cada tipo de célula. Contudo, estas células V79 apresentam a grande vantagem de avaliar a contribuição específica de determinada enzima e/ou variante para um determinado efeito tóxico.

Nos trabalhos experimentais da presente dissertação foram utilizadas linhas celulares V79 que incluíram, (i) a linha *Parental* que corresponde às células V79 não geneticamente modificadas e constitui um controlo da experiência, (ii) a linha V79 *Mockneo* corresponde às células V79 que expressam o gene de resistência à neomicina, (iii) a linha h2D6*1 que expressa a enzima codificada pelo alelo não mutado *CYP2D6*1*, (iv) as linhas celulares h2D6*2, h2D6*9, h2D6*10 e h2D6*17 que expressam a enzima codificada pela respectiva variante mutada e que apresentam uma actividade metabólica reduzida, e (v) a linha h3A4 que expressa a enzima humana CYP3A4.

A linha V79 *Mockneo* constitui um controlo adicional e mais rigoroso uma vez que esta linha celular também sofreu transformação genética. O gene de resistência à neomicina é incorporado para permitir a selecção das células que incorporaram o plasmídeo contendo o gene da enzima do citocromo P450. Se as células incorporaram o plasmídeo com o gene de interesse (neste caso o gene que expressa a CYP2D6 humana) então também expressam o gene que confere resistência à neomicina e, consequentemente, serão capazes de crescer num meio suplementado com o antibiótico, podendo deste modo ser distinguidas das células que não incorporaram o referido plasmídeo. Uma vez que estes procedimentos podem alterar as características das células, o controlo com a linha celular *Mockneo* é idealmente testado conjuntamente com o controlo da linha celular *Parental*.

Nestes estudos, o grau de toxicidade induzido pela droga nas diferentes linhas celulares foi avaliado, no final do tempo de incubação, para cada concentração testada, pela percentagem de colónias viáveis das linhas V79 que expressavam as diferentes enzimas relativamente às linhas V79 controlo *Parental* e *Mockneo*.

4.4. Caracterização analítica da 4-MTA, da MDMA, e dos possíveis metabolitos nos estudos de metabolismo realizados com as células V79

Para a quantificação da 4-MTA e da MDMA no meio de cultura celular após incubação das células V79, foi adoptada uma metodologia por HPLC/UV previamente desenvolvida e validada por Soares e colaboradores (Soares *et al.* 2004). Este método consiste num protocolo extractivo por SPE após hidrólise ácida das amostras. A eluição das amostras através de colunas extractivas comercialmente disponíveis foi realizada com uma solução de 5% de amónia em metanol após duas lavagens da coluna com ácido clorídrico e metanol. Os extractos assim obtidos, depois de levados à secura por evaporação do solvente e dissolução em volume reduzido de metanol, foram injectados num sistema de HPLC acoplado a um detector de UV. A eluição cromatográfica decorreu à temperatura ambiente, em modo de gradiente, com uma fase móvel composta por uma mistura de metanol/acetato de amónio (0,05 M) contendo 0,1% de trietilamina, com pH ajustado a 3,9, e utilizando uma coluna cromatográfica C18 como fase estacionária. Os compostos foram detectados no comprimento de onda de 210 nm (Soares *et al.* 2004).

Para a avaliação qualitativa do perfil metabólico das duas drogas no meio de cultura celular foram utilizadas as metodologias por GC/MS acima referidas para a caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B *in vivo* e *in vitro*.

Para a identificação e quantificação dos metabolitos resultantes do metabolismo oxidativo da MDMA catalisado pela CYP2D6 foi desenvolvido um método por HPLC com detecção electroquímica, com base numa metodologia desenvolvida para a determinação analítica dos aductos da adrenalina com a GSH em soro humano (Silva *et al.* 2006). O método adoptado compreende a extracção dos metabolitos com estrutura catecólica por adsorção na alumina a pH alcalino, seguida da dessorção destes compostos por acidificação com o solvente extractor (ácido perclórico). Os extractos são posteriormente injectados no aparelho de HPLC acoplado a um detector coulométrico, tendo sido aplicado um potencial de +0,4 V ao eléctrodo analítico para a detecção dos compostos. Este método foi posteriormente adaptado e validado para a quantificação do metabolito N-Me-α-MeDA em soro humano (Mergen *et al.* 2006).

5. TRABALHO EXPERIMENTAL

Apresentam-se neste capítulo: a descrição detalhada dos protocolos experimentais, os resultados obtidos e o respectivo tratamento estatístico, e a discussão dos resultados no âmbito de cada trabalho, na forma das publicações que originaram:

Trabalho I. Identification of 4-Methylthioamphetamine and Some of its Metabolites in Mice Urine by GC-MS, after Acute Administration. Reprinted from Journal of Analytical Toxicology, 26(4): 228-232. Copyright (2002) Preston Publications. Permission request submitted

Trabalho II. Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration. Reprinted from Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 811(2):143-152. Copyright (2002) Elsevier Science Ltd. Permission request submitted

Trabalho III. Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse. Reprinted from Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 369(2):198-205. Copyright (2004) with kind permission of Springer Science and Business

Trabalho IV. Hepatic metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) constructed by analysis with hepatocytes of six species including human. Reprinted from Toxicology, 206(1):75-89. Copyright (2005) Elsevier Science Ltd. Permission request submitted

Trabalho V. Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity. Reprinted from Pharmacogenet Genomics, 16(11):789-799. Copyright (2006) with kind permission of Lippincott Williams & Wilkins

Trabalho VI. CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA). Reprinted from Toxicology, doi:10.1016/j.tox.2006.10.024. Copyright (2006) Elsevier Science Ltd. Permission request submitted

5.1. Trabalho I

Identification of 4-Methylthioamphetamine and Some of its Metabolites in Mice Urine by GC-MS after Acute Administration

Technical Note

Identification of 4-Methylthioamphetamine and Some of its Metabolites in Mouse Urine by GC–MS after Acute Administration

Helena Carmo[1,*], Douwe de Boer[2], Fernando Remião[1], Félix Carvalho[1], Lesseps A. dos Reys[2], and Maria de Lourdes Bastos[1]

[1]ICETA/CEQUP, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, Porto University, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal and [2]Laboratory of Doping Control, LADB, Lisbon Sports Medicine Centre, Portugal

Introduction

p-Methylthioamphetamine, also known as 4-methylthioamphetamine (4-MTA), is a stimulant drug originally synthesized as a potential antidepressant, although at present it has no therapeutic use. It is currently submitted to control measures and criminal penalties within the Member States of the European Union (1). 4-MTA has been associated with several deaths in the United Kingdom and the Netherlands (1).

Animal studies have shown that 4-MTA induces convulsive effects and respiratory depression (mentioned in report of EMCDDA [1]) and typical serotonergic behavioral syndromes (2). The major acute neuropharmacological effects of 4-MTA in the rat consist of increase in the release of serotonin and inhibition of serotonin uptake from nerve endings (2) and also inhibition of monoamine oxidase A (3,4). Synaptosome monoamine uptake inhibition studies showed that 4-MTA is a very selective serotonergic agent (2) with a low affinity for noradrenaline and dopamine uptake sites and monoamine receptors (2,3). An increase in the secretion of several hormones such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone, prolactin, oxytocin, and renin induced by 4-MTA through stimulation of serotonergic neurotransmission has also been reported (3).

After drug seizures in the United Kingdom and the Netherlands it became necessary to implement analytical procedures for the identification and quantitation of 4-MTA. Consequently, gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (5–8), GC–nitrogen-phosphorus (NPD) (2) nuclear magnetic resonance (NMR) (6,8), high-performance liquid chromatography–diode-array detection (HPLC–DAD) (5), capillary electrophoresis–UV (8), and infrared spectrometric data (7,8) concerning 4-MTA were already reported. However, data concerning the metabolic profile of this drug are still lacking. A recent study following a fatal human poisoning with 4-MTA reported the presence of 4-MTA and two possible metabolites in the postmortem blood and urine (5). A sulfoxide and a hydroxylated structure were proposed for the two metabolites. In our study, we used an animal model to investigate the metabolic profile of 4-MTA. GC–MS data of our preliminary findings are presented.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: helenacarmo@ff.up.pt.

Materials and Methods

Reagents

All chemicals and reagents were of reagent grade. Trimethylsilylchloride (TMSCl), *N*-methylbis(trifluoroacetamide) (MBTFA) and *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) were obtained from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Trifluoroacetic anhydride (TFAA) was obtained from Janssen Chimica (Beerse, Belgium). Methyl orange solution was prepared at a concentration of 2 mg/mL by dissolving sufficient methyl orange (Koch-Light Laboratories, Colnbucks Buck, U.K.) in a mixture of acetonitrile and trifluoroacetic acid (6:4; v/v). *d*-Amphetamine sulfate was obtained from Sigma (St. Louis, MO). 4-MTA hydrochloride was a generous gift of Dr. David Nichols (Purdue University, West Lafayette, IN).

Drug administration and sample collection

Male Charles-River CD1 mice weighing 30-35 g were used. The animals were housed individually in metabolic cages in a temperature-controlled room with a 12/12 h lighting schedule. Water was available ad libitum, but food was withdrawn after the administration of 4-MTA. Urine samples were collected for 24 h after the intraperitoneal (i.p.) administration of either 20, 40, and 80 mg/kg 4-MTA or saline. *d*-Amphetamine sulfate was administered i.p. at a 20 mg/kg dose and urine was collected for 24 h after administration of drug. For each 4-MTA dose, four different animals were dosed on four different days and two different animals were dosed with *d*-amphetamine

Reproduction (photocopying) of editorial content of this journal is prohibited without publisher's permission.

sulfate on a different day. All samples were centrifuged at 3000 × *g* for 5 min and then stored at –20°C until GC–MS analysis.

Isolation of compounds of interest

Basic fraction. Volumes of 2 mL of urine were transferred to a 25-mL tube and 200 µL of 5M potassium hydroxide solution were added in order to obtain a pH > 13. The basic compounds were extracted by adding 2.5 mL of *tert*-butylmethyl ether. The tube was vortex mixed for a few seconds, shaken for 10 min, and centrifuged for 5 min at 2500 rpm. The organic phase was transferred to a clean tube, and the water phase was kept. The basic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed partially under a gentle nitrogen stream. A 10-µL aliquot of MBTFA was added to prevent the loss of volatile compounds, after which the evaporation process was completed. The obtained residue was dried under reduced pressure over diphosphorus pentoxide and potassium hydroxide for at least 1 h.

Acidic fraction. To the remaining water phase sufficient drops of concentrated hydrochloric acid were added to obtain a pH < 3.4. The acidic compounds were extracted by adding 3 mL of a mixture of *n*-hexane and ethyl acetate (9:1; v/v). The tube was vortex mixed for a few seconds, shaken for 10 min, and centrifuged for 5 min at 2500 rpm. The organic phase was transferred to a clean tube and the water phase was kept. The acidic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed in a rotating evaporator. The obtained residue was dried under reduced pressure over diphosphorus pentoxide and potassium hydroxide for at least 1 h.

Derivatizations

N-TFA-O-TMS derivatization of the basic fraction. To the respective dry residue 50 µL of a methyl orange solution were added. Sufficient MSTFA was added until a yellow color appeared. The mixture was heated for 5 min at 80°C. After cooling to room temperature 10 µL of MBTFA were added. The mixture was vortex mixed and heated for 10 min at 80°C. If in one of the previous steps the color of the mixture turned to red, sufficient drops of MSTFA were added to re-obtain a yellow color. After cooling to room temperature the mixture was used without further preparation for GC-MS analysis.

N,O-TFA derivatization of the basic fraction. To the dry residue, 50 µL of ethyl acetate and 50 µL of TFAA were added. The mixture was heated for 30 min at 65°C. After cooling to room temperature the excess of reagents was evaporated under a gentle stream of nitrogen. The obtained residue was dissolved in 100 µL of ethyl acetate and used without further preparation for GC–MS analysis.

N,O-TMS derivatization of the acidic fraction. To the respective dry residue 50 µL of a mixture of MSTFA and TMSCl (95:5, v/v) were added. The mixture was heated for 30 min at 80°C. After cooling to room temperature, the mixture was used without further preparation for GC–MS analysis.

GC–MS analysis

GC–MS analysis was performed on a Hewlett Packard 6890 GC (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) coupled to a Hewlett-Packard 5971 mass selective detector (MSD, Agilent Technologies). The GC was equipped with a Hewlett Packard capillary column HP-1 (18-m long, 0.20-mm i.d., and 0.33-µm film thickness, Agilent Technologies). A two-level oven program was applied: the temperature was maintained at 100°C for 1 min, programmed up to 300°C at 15°C/min, and maintained at 300°C for 20 min. The temperatures of the injection port and the transfer line were 250 and 310°C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. A specimen volume of 2 µL was injected at a split ratio of 1:10. The MSD was operated in the electron ionization mode according the manufacturer's recommendations in the full scan range of *m/z* 50-600.

Results

Basic extraction

The mono-*N*-TFA derivative of 4-MTA, extracted at basic pH, was always a dominant peak in the chromatograms obtained after the analysis of the urine samples (Figure 1, peak 2). Its identification was based on the retention time and the mass spectrum relative to the analysis of the 4-MTA standard.

Besides the peak of the parent compound, several peaks were observed in the chromatograms that could potentially correspond to metabolites. Two peaks with identical mass spectra for example were observed in the retention time interval from 7.6 to 8 min (Figure 1, peaks 3a and 3b). The MS characteristics are given in Table I. These characteristics are consistent with those of the mono-*N*-TFA-mono-*O*-TMS derivative of β-hydroxyamphetamine-like compounds, such as cathine (norpseudoephedrine) and phenylpropanolamine (norephedrine). Both β-hydroxyamphetamine-like compounds are characterized by the ions $M^{+\bullet}$ and $[M - CH_3\bullet]^+$, which appear at low abundance, and a cleavage between Cα and Cβ resulting in two ions at

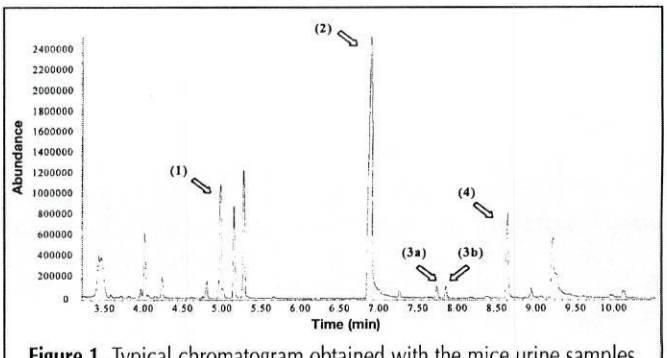


Figure 1. Typical chromatogram obtained with the mice urine samples extracted at basic pH. Peak identification: 1, mono-*N*-TFA-mono-*O*-TMS derivative of phenylpropanolamine; 2, mono-*N*-TFA derivative of 4-MTA; 3a and 3b, mono-*N*-TFA-mono-*O*-TMS derivative of 4-methylthiocathine and mono-*N*-TFA-mono-*O*-TMS derivative of 4-methylthiophenylpropanolamine, respectively; and 4, mono-*N*-TFA-mono-*O*-TMS derivative of the third hydroxylated compound.

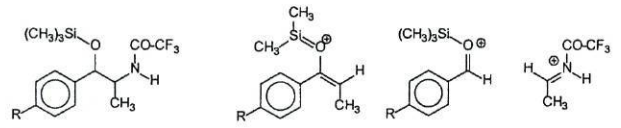
relatively high abundance. In Table I, a comparison of the data of peaks 3a and 3b and the mono-*N*-TFA-mono-*O*-TMS derivative of the respective β-hydroxyamphetamine-like compounds is made. Those ions that include the phenyl ring are shifted 46 amu corresponding to the difference between the mass of the methylthio group and that of a hydrogen atom. Therefore, it could be suggested that the peaks 3a and 3b correspond to the β-hydroxy-4-MTA-like metabolites 4-methylthiocathine and 4-methylthiophenylpropanolamine. In order to test whether Charles River CD1 mice can produce these β-hydroxyamphetamine metabolites, *d*-amphetamine was administered. The analysis of those urine samples showed the presence of both phenylpropanolamine and cathine. Although phenylpropanolamine was a predominant peak relative to cathine, this was not observed with the β-hydroxy-4-MTA-like metabolites. These two 4-MTA metabolites were apparently excreted in the same amount.

In order to confirm the presence of β-hydroxy-4-MTA-like metabolites of 4-MTA, a second derivatization reaction was performed, namely the *N,O*-TFA derivatization. This type of derivatization also resulted in typical mass spectra for the mono-*N*-TFA-mono-*O*-TFA derivatives of cathine and phenylpropanolamine. An additional characteristic was that the derivatives of cathine and phenylpropanolamine were not separated chromatographically under these conditions. These data and those obtained with the analysis of the respective residues is after *N,O*-TFA derivatization are given in Table II. It is shown that the fragmentation pattern of the observed peak (peak 3') is similar to that of the β-hydroxyamphetamine-like compounds. Thus, it was confirmed that the peaks 3a and 3b correspond to 4-methylthiocathine and 4-methylthiophenylpropanolamine.

Besides 4-methylthiocathine and 4-methylthiophenylpropanolamine, which are β-hydroxy metabolites, a third metabolite was observed also with a hydroxyl group. It was

Table I. Partial Mass Spectrometric Characteristics of the *N*-TFA-*O*-TMS Derivatives of the Two β-Hydroxyamphetamine Diastereomers and Peaks 3a and 3b and the General Structure of the *N*-TFA-*O*-TMS Derivative and Proposed Structures of Relevant Ions

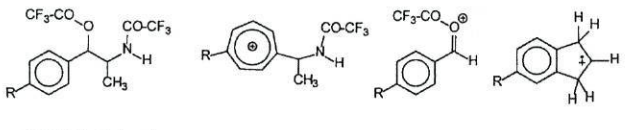
Ion structure	Mass-to-Charge Ratios of Molecular Ions and Fragments (Relative Intensity) cathine (R = H)	phenylpropanolamine (R = H)	peak 3a R = CH_3S)	peak 3b (R = CH_3S)
$M^{+\bullet}$	319 (–)	319 (–)	365 (< 1)	365 (< 1)
$[M - CH_3^{\bullet}]^+$	304 (1)	304 (1)	350 (< 1)	350 (< 1)
(i)	191 (8)	191 (7)	237 (4)	237 (3)
(ii)	179 (100)	179 (100)	225 (100)	225 (100)
no proposal	163 (8)	163 (4)	163 (5)	163 (4)
(iii)	140 (3)	140 (10)	140 (12)	140 (11)



N-TFA-*O*-TMS derivative *i* *ii* *iii*

Table II. Partial Mass Spectrometric Characteristics of the *N,O*-TFA Derivatives of Two β-Hydroxyamphetamine Disastereomers Compounds and of Peaks 3a and 3b and the General Structure of the *N,O*-TFA Derivative and Proposed Structures of Relevant Ions*

Ion Structure	Mass-to-Charge Ratios of Molecular Ions and Fragments (Relative Intensity) cathine and phenylpropanolamine (R = H)	peak 3' (R = CH3S)
$M^{+\bullet}$	343 (< 1)	389 (< 1)
(iv)	230 (17)	276 (103)
(v)	203 (8)	249 (38)
(iii)	140 (100)	140 (100)
(vi)	117 (6)	163 (10)



N,O-TFA derivative *iv* *v* *vi*

* See Table I for structure of fragment iii.

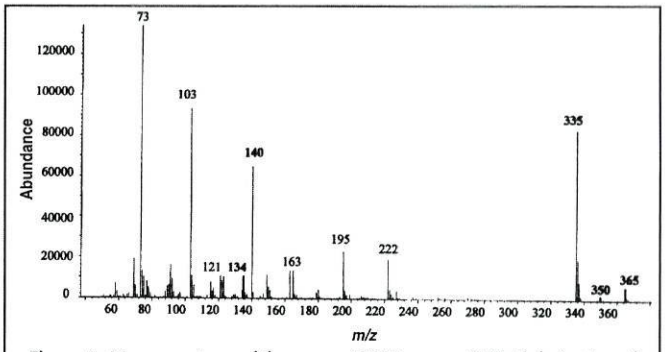


Figure 2. Mass spectrum of the mono-*N*-TFA-mono-*O*-TMS derivative of the third hydroxylated compound observed in the chromatogram obtained with the mice urine samples extracted at basic pH (Figure 1, peak 4)

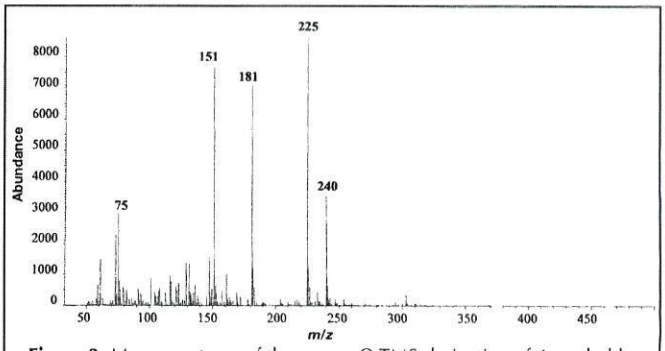


Figure 3. Mass spectrum of the mono-*O*-TMS derivative of 4-methylthiobenzoic acid obtained with the mice urine samples extracted at acidic pH.

concluded that this hydroxyl group was located either at the phenyl ring or at the methylthio group. This was based on some characteristics of its mass spectrum, showing ions at *m/z* 365 ($M^{+\bullet}$), *m/z* 350 ($[M - CH_3^{\bullet}]^+$), *m/z* 335 and *m/z* 140, respectively (Figure 2). The presence of the ion at *m/z* 140 and the absence of one at *m/z* 225 indicated that the hydroxyl group neither was located at the Cα nor at the Cβ in the amine side chain. Therefore, the hydroxyl group must be located at the phenyl ring or at the methylthio group. It could be argued that the dominant loss of 30 amu corresponds to that of CH_2O, suggesting that the hydroxyl group is located at the methylthio moiety. This loss of CH_2O could be explained through an intra-rearrangement of the trimethylsilyl moiety at the sulphur atom. However, as far as it is known, no literature data supports such a rearrangement and therefore the exact position could not be assigned based on the current available information. More definite proof will require further investigation.

Acidic extraction

The mono-*O*-TMS derivative of 4-methylthiobenzoic acid (Figure 3) was a relatively small peak in the chromatograms obtained after the analysis of the residues that were extracted at acidic pH. As with 4-MTA, its identification was based on the retention time and the mass spectrum relative to the analysis of 4-methylthiobenzoic acid standard.

Discussion

The results of these preliminary investigations on the metabolism of 4-MTA show that, after acute administration, 4-MTA is partially metabolized by Charles-River CD1 mice. The unchanged parent compound and its respective metabolites are excreted in the urine. The β-hydroxylated isomers and 4-methylthiobenzoic acid metabolites are structurally related to those of amphetamine, which undergoes aromatic hydroxylation and oxidative deamination and to a minor extent aliphatic hydroxylation and conjugation at the nitrogen atom (9).

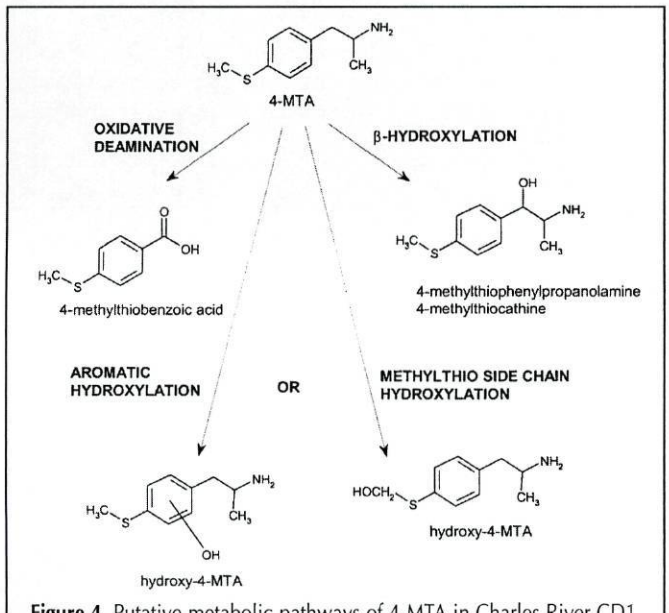


Figure 4. Putative metabolic pathways of 4-MTA in Charles River CD1 mice.

In our studies a third hydroxylated metabolite resulting from either aromatic hydroxylation or hydroxylation on the methylthio group was also found. Interestingly, in a study performed with a series of 4-alkoxy-substituted amphetamines, the aliphatic hydroxylation of the propoxy side chain of 4-propoxyamphetamine was reported as one of the major metabolic routes for this compound in mice (10).

Our preliminary results seem therefore to indicate that 4-MTA possibly undergoes the same metabolic pathways as those of amphetamine and 4-propoxyamphetamine (Figure 4).

Amphetamine in mice is predominantly excreted as unchanged compound, 4-hydroxyamphetamine and benzoic acid as well as its conjugates (11). Although β-hydroxylation is not reported as one of the major metabolic routes for *d*-amphetamine in mice (9) we have observed both phenylpropanolamine and cathine in mice urine after *d*-amphetamine administration. It is noteworthy that after *d*-amphetamine administration phenylpropanolamine is predominantly excreted, whereas the β-hydroxy-4-MTA-like metabolites are apparently excreted in the same amount. This would mean that the β-hydroxylation of 4-MTA is not stereospecific.

To our knowledge these are the first reported findings on the metabolism of this compound in an experimental animal model. A recent study performed on postmortem blood and urine samples after a fatal human poisoning involving 4-MTA reports the presence of unchanged 4-MTA and two possible metabolites: hydroxy-4-MTA and a sulfoxide (5). Besides from the β-hydroxy-4-MTA-like metabolites a third hydroxylated derivative of 4-MTA was also found in our studies. However, we did not observe the presence of a sulfoxide derivative in mice urine.

Given the high abuse potential of this drug it is of great toxicological and forensic interest that the metabolic profile of such compounds is enlightened. Additional studies are still necessary in order to obtain additional information, namely in what concerns the possible excretion of putative conjugates of the identified metabolites and also the investigation of the interspecies variations in view of the fact that species differences in amphetamine metabolism are widely known (9,11,12).

Acknowledgment

This work was supported by Fundação Para a Ciência e a Tecnologia (Praxis XXI/BD/20088/99). The authors wish to thank Dr. David Nichols (Purdue University, West Lafayette, IN) for generously providing 4-MTA.

References

1. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Report on the risk assessment of 4-MTA in the framework

of the joint action on new synthetic drugs. Office for official publications of the European communities, Luxembourg, 1999
2. X. Huang, D. Marona-Lewicka, and D.E. Nichols. p-Methylthioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotonin-releasing agent. *Eur. J. Pharmacol.* **229:** 31–38 (1992).
3. Q. Li, I. Murakami, S. Stall, A.D. Levy, M.S. Brownfield, D.E. Nichols, and L.D. Van de Kar. Neuroendocrine pharmacology of three serotonin releasers: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butane (MBDB), 5-methoxy-6-methyl-2-aminoindan (MMAI) and p-methylthioamphetamine (MTA). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279(3):** 1261–1267 (1996).
4. M.C. Scorza, C. Carrau, R. Silveira, G. Zapata-Torres, B.K. Cassels, and M. Reyes-Parada. Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives. Structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **54:** 1361–1369 (1997).
5. S.P. Elliot. Fatal poisoning with a new phenylethylamine: 4-methylthioamphetamine (4-MTA). *J. Anal. Toxicol.* **24:** 85–89 (2000).
6. C.J. Groombridge. The identification of 4-methylthioamphetamine in a drug seizure. *Microgram* **31(5):** 150–159 (1998).
7. A.J. Poortman. The identification of 4-methylthioamphetamine. *Microgram* **31(6):** 174–180 (1998).
8. A.J. Poortman and E. Lock. Analytical profile of 4-methylthioamphetamine (4-MTA), a new street drug. *Forensic Sci. Int.* **100:** 221–233 (1999).
9. J. Caldwell. The metabolism of amphetamines and related stimulants in animals and man. In *Amphetamines and Related Stimulants: Chemical, Biological, Clinical, and Sociological Aspects*, S.J. Mulé, Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1980, pp 29–46.
10. B.C. Foster, D.L. Litster, H.S. Buttar, B. Dawson, and J. Zamecnik. Biotransformation and urinary excretion of 4-substituted amphetamines in pregnant mice. *Biopharm. Drug Dispos.* **14:** 709–719 (1993).
11. L.G. Dring, R.L. Smith, and R.T. Williams. The metabolic fate of amphetamine in man and other species. *Biochem. J.* **116:** 425–435 (1970).
12. C.E. Green, S.E. LeValley, and C.A. Tyson. Comparison of amphetamine metabolism using isolated hepatocytes from five species including human. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237(3):** 931–936 (1986).

Manuscript received July 24, 2001;

5.2. Trabalho II

Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Journal of Chromatography B, 811 (2004) 143–152
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B
www.elsevier.com/locate/chromb

Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration

Helena Carmo[a,*], Douwe de Boer[b], Fernando Remião[a], Félix Carvalho[a], Lesseps A. dos Reys[b], Maria de Lourdes Bastos[a]

[a] *REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto. Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal*
[b] *Laboratory of Doping Control, Institute of Sports Portugal. Av. Prof. Egas Moniz, Estádio Universitário, 1600-190 Lisbon, Portugal*

Received 5 May 2004; accepted 18 August 2004
Available online 19 September 2004

Abstract

4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) is a psychoactive drug of abuse often sold under the general street name "Ecstasy". Recent reports on the abuse of 2C-B and analogues denote the lack of knowledge on this drug metabolism. In the present study, we investigated the metabolic profile of 2C-B in the mouse and found unchanged 2C-B and several metabolites, which could be identified by GC/MS in the mice urine. The identification of 2C-B metabolites may give important clues for the biological and toxicological effects of this drug of abuse and provides new important data for forensic analysis on samples taken from 2C-B abusers.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: 2C-B; Designer drugs of abuse; Metabolism; Mice

1. Introduction

4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B), also known under the street names "Venus", "Bromo", "Erox", "XTC" or "Nexus", is a psychoactive drug related both with the amphetamine-like stimulants and the mescaline-like hallucinogens. It has been recently recommended for international control [1] and listed as a controlled substance in most European countries. Information about its use and related morbidity and mortality is scarce. However, the fact that 2C-B is often sold under the general street name "Ecstasy", and frequently taken together with 3,4-methylenedioxyamphetamine-like compounds, and also with other drugs such as ketamine, gives raise to concern regarding its abuse potential and the possibility of cumulative or even potentiation of toxic effects [2–4]. Recent reports on the abuse of 2C-B and analogues in the Netherlands and in Japan denote the lack of knowledge on the metabolism of such compounds, which may in turn lead to the inability to detect intoxications [5,6].

In humans, 2C-B is usually consumed at doses between 4 and 30 mg, which induce euphoria and increased receptiveness of the visual, auditory, olfactory and tactile sensations [4]. Doses between 5 and 10 mg induce amphetamine-like stimulating effects while doses between 10 and 20 mg are required to obtain the hallucinogenic effects of the drug [7]. Higher doses are known to cause frightening hallucinations and sympathomimetic effects such as tachicardia, hypertension and hyperthermia [2]. Accordingly, in a behavioral study performed in the newly hatched chicken, 2C-B not only induced some amphetamine-like effects but also produced an effect typical of mescaline [8].

The available pharmacological data on 2C-B indicate that its effects are probably mediated by the serotonergic pathways since it has been shown to have affinity to 5-HT_1 receptors and a high affinity for 5-HT_2 receptors, thus suggesting that it is a potential 5-HT_2 agonist [9]. Studies performed on isolated rat thoracic aorta also indicate that 2C-B behaves as

* Corresponding author. Tel.: +351222078922; fax: +351222003977.
E-mail address: helenacarmo@ff.up.pt (H. Carmo).

1570-0232/$ – see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jchromb.2004.08.026

a partial agonist for both α_1-adrenergic receptors and 5-HT_2 serotonergic receptors [10].

Up to the present moment some analytical procedures for the identification and quantification of 2C-B in seized drug samples have already been implemented, namely: gas chromatography–mass spectrometry detection (GC/MS) [4] nuclear magnetic ressonance [4], ultraviolet spectrophotometry [11], high performance liquid chromatography–diode-array detection (DAD) [4], capillary electrophoresis–DAD [4], infrared spectroscopy [11], Raman spectroscopy [12] and Fourier-transform infrared spectroscopy [4].

In reported drug seizures in the Netherlands [7] and Switzerland [3,4] 2C-B was found in tablets in association with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and *N*-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine (MBDB) and in the USA 2C-B was found alone in a powder used to spike a drink during a student's party [11].

Given its abuse potential it is of great toxicological and forensic interest that the metabolism of this drug is enlightened. Preliminary studies on the human metabolism of 2C-B reported the presence of unchanged 2C-B in the urine of a male subject abusing this drug [13]. Some metabolites were also found of which 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid, 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid and 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine could be identified by GC/MS [13]. An in vivo study performed in the rat reports the formation of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid, 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol, 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine, 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine and also the acetylated derivatives of metabolites 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine and 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine [14].

The aim of our study was to investigate the metabolic profile of 2C-B in the mouse, also in an attempt to find a good animal model for further toxicokinetic studies with this drug. GC/MS data of our findings are presented.

2. Experimental

2.1. Materials

All chemicals and reagents were of analytical grade. Trimethylsilylchloride (TMSCl), *N*-methylbis(trifluoroacetamide) (MBTFA) and *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) were obtained from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Trifluoroacetic anhydride (TFAA) was obtained from Janssen Chimica (Beerse, Belgium). Phenaceturic acid was obtained from Tokyo Kasei (Tokyo, Japan). Methyl orange solution was prepared at a concentration of 2 mg/mL by dissolving sufficient methyl orange (Koch-Light Laboratories, Colnbucks Buck, UK) in a mixture of acetonitrile and trifluoroacetic acid (6:4, v/v). 2C-B hydrochloride was generously provided by the United Nations – Scientific Section, PDAB/DOA/UNDCP (Vienna, Austria). 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid was kindly provided by The Netherlands Institute of Drugs and Doping Research (Utrecht, The Netherlands).

2.2. Drug administration and sample collection

Male CD1 mice (Charles-River, Barcelona, Spain) weighing 30–35 g were used. The animals were housed individually in metabolic cages in a temperature-controlled room at 20 °C ± 1 °C with a 12/12 h lighting schedule. Water was available ad libitum but food was withdrawn after the administration of 2C-B. Urine samples were collected during 24 h after the i.p. administration of either 20 or 40 mg/kg 2C-B or saline. Five different animals were used for each 2C-B dose. All urine samples were centrifuged at 3000 × *g* for 5 min and then stored at −20 °C until GC/MS analysis.

Housing and experimental treatment of the animals were conducted under the European Community guidelines for the use of experimental animals (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, 1986, and Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, 1998).

2.3. Isolation of compounds of interest for GC/MS analysis

2.3.1. Basic fraction

Aliquots of 2 mL of mice urine were transferred to a 25 mL tube and 200 μL of 5 M KOH solution were added in order to obtain a pH >13. The basic compounds were extracted by adding 2.5 mL of *tert*-butylmethyl ether. The tube was vortex mixed for a few seconds, shaken for 10 min and centrifuged for 5 min at 1500 × *g*. The organic phase was transferred to a clean tube and the water phase was kept. The basic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed partially under a gentle nitrogen stream. An aliquot of 10 μL of MBTFA was added to prevent the loss of volatile compounds, after which the evaporation process was completed. The obtained residue was dried under reduced pressure over P_2O_5 and KOH for at least 1 h.

2.3.2. Acidic fraction

To the remaining water phase obtained after the basic extraction, sufficient drops of 37% HCl were added to obtain a pH <3.4. The acidic compounds were extracted by adding 3 mL of a mixture of *n*-hexane and ethyl acetate (9:1, v/v). The tube was vortex mixed for a few seconds, shaken for 10 min and centrifuged for 5 min at 1500 × *g*. The organic phase was transferred to a clean tube and the water phase was kept. The acidic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed in a rotating evaporator. The obtained residue

was dried under reduced pressure over P_2O_5 and KOH for at least 1 h.

2.3.3. Conjugates fraction

After the basic and acidic extraction the remaining water phase was kept and chemical hydrolysis was performed for the finding of possible conjugates metabolites. To the water phase 200 μL of 5 M KOH solution were added in order to obtain a pH >13. The tube was vortex mixed for a few seconds, and incubated at 60 °C for 15 min. Basic and acidic compounds were extracted according to the procedures described above for the extractions of the basic and acidic fractions.

2.4. Derivatization procedures for GC/MS analysis

2.4.1. N-TFA-O-TMS derivatization of the basic fraction

To the respective dry residue, 50 μL of a methyl orange solution were added. Sufficient MSTFA was added until a yellow colour appeared. The mixture was heated for 5 min at 80 °C. After cooling to room temperature 10 μL of MBTFA were added. The mixture was vortex mixed and heated for 10 min at 80 °C. If in one of the previous steps the colour of the mixture turned to red, sufficient drops of MSTFA were added to re-obtain a yellow colour. After cooling to room temperature the mixture was used without further preparation for GC/MS analysis.

2.4.2. N,O-TFA derivatization of the basic fraction

To the respective dry residue, 50 μL of ethyl acetate and 50 μL of TFAA were added. The mixture was heated for 30 min at 65 °C. After cooling to room temperature the excess of reagents was evaporated under a gentle stream of nitrogen. The obtained residue was dissolved in 100 μL of ethyl acetate and used without further preparation for GC/MS analysis.

2.4.3. N,O-TMS derivatization of the acidic fraction

To the respective dry residue, 50 μL of a mixture of MSTFA and TMSCl (95:5, v/v) were added. The mixture was heated for 30 min at 80 °C. After cooling to room temperature, the mixture was used without further preparation for GC/MS analysis.

2.5. GC/MS analysis

GC/MS analysis was performed on a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) coupled to a Hewlett Packard 5971 mass selective detector (Agilent Technologies). The gas chromatograph was equipped with a Hewlett Packard capillary column HP-1 (Agilent Technologies), 18 m long, 0.20 mm i.d. and 0.33 μm film thickness. A two level oven program was applied: the temperature was maintained at 100 °C for 1 min, programmed up to 300 °C at 15 °/min and maintained at 300 °C for 20 min. The temperatures of the injection port and the transfer line were 250 and 310 °C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. An aliquot of 2 μL was injected at a split ratio of 1:10. The mass selective detector was operated in the electron ionization mode according the manufacturer's recommendations in the full scan range of *m/z* 50/600.

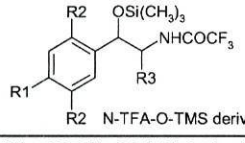
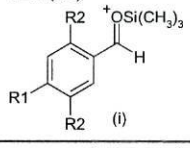
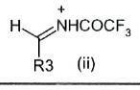
3. Results

3.1. Basic extraction

The *N*-TFA derivative of 2C-B, extracted at basic pH, was always present in the chromatograms obtained after the analysis of the urine samples. Its identification was based on the retention time and the mass spectrum relative to the analysis of the 2C-B standard. Besides the peak of the parent compound, several peaks were observed in the chromatograms that could potentially correspond to metabolites. These metabolites were searched taking into account that bromine containing compounds show a characteristic pattern of their mass spectrum isotope peaks (2 ions with a very similar abundance and with a difference of 2 Da).

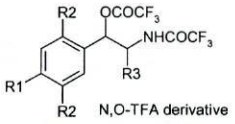
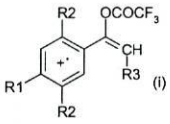
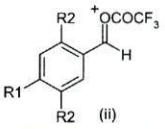
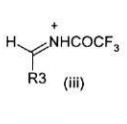
Using *N*-TFA-*O*-TMS derivatization, two peaks with identical mass spectra were observed in the retention time interval from 9.0 to 9.2 min. The mass spectrometric characteristics are given in Table 1. These characteristics are consistent with those of the *N*-TFA-*O*-TMS deriva-

Table 1
Partial mass spectrometric characteristics of the *N*-TFA-*O*-TMS derivatives of the two β-hydroxyamphetamine diastereomers (cathine and phenylpropanolamine) and of the β-hydroxylated 2C-B diastereomers (β-OH-2C-B)

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)					
	R_1, R_2 = H; R_3 = CH_3		R_1 = Br; R_2 = OCH_3; R_3 = H			
	Cathine	Phenylpropanolamine	β-OH-2C-B (diastereomer no. 1)		β-OH-2C-B (diastereomer no. 2)	
$M^{+\bullet}$	319 (<1)	319 (<1)	443 (3)	445 (4)	443 (3)	445 (2)
(i)	179 (100)	179 (100)	317 (88)	319 (100)	317 (98)	319 (100)
(ii)	140 (3)	140 (10)	126 (45)		126 (34)	
						
	R2 N-TFA-O-TMS derivative		R2 (i)	R3 (ii)		

General structure of the *N*-TFA-*O*-TMS derivative and proposed structures of relevant ions.

Table 2
Partial mass spectrometric characteristics of the *N,O*-TFA derivative of the two β-hydroxyamphetamine diastereomers (cathine and phenylpropanolamine) and β-hydroxylated 2C-B diastereomers (β-OH-2C-B)

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)		
	Cathine/phenylpropanolamine (R_1, R_2 = H; R_3 = CH_3)	β-OH-2C-B (diastereomers no. 1 and 2) (R_1 = Br; R_2 = OCH_3; R_3 = H)	
$M^{+\bullet}$	343 (<1)	467 (56)	469 (43)
(i)	230 (15)	354 (47)	356 (61)
(ii)	203 (7)	341 (113)	343 (111)
(iii)	140 (100)	126 (100)	
			
R2 OCOCF3 NHCOCF3 R3 R1 R2 N,O-TFA derivative	R2 OCOCF3 CH R3 (i) R1 R2	R2 +OCOCF3 H R1 R2 (ii)	H NHCOCF3 R3 (iii)

General structure of the *N,O*-TFA derivative and proposed structures of relevant ions.

tive of β-hydroxyamphetamine-like compounds, such as cathine (norpseudoephedrine) and phenylpropanolamine (norephedrine), also presented in Table 1. Both β-hydroxyphenethylamine-like compounds fragmentations are characterised by the cleavage between C_α and C_β resulting in two ions at relatively high abundance. Furthermore, similarly to what was previously observed with the amphetamine metabolism in mice [15], the presence of one diastereomer was more dominant than the one of the other. Therefore, it could be suggested that these peaks correspond to the isomers of 4-bromo-2,5-dimethoxy-β-hydroxyphenethylamine metabolites. In order to confirm this proposal a second derivatization reaction was performed, namely *N,O*-TFA derivatization. This type of derivatization also resulted in typical mass spectra for the *N*-TFA-*O*-TFA derivatives of cathine and phenylpropanolamine (see Table 2). An additional characteristic was that the derivatives of cathine and phenylpropanolamine were not separated chromatographically under these conditions. Additionally, a fragment at *m/z* 287/289 and a fragment at *m/z* 311/313 resulting from the simultaneous β-cleavage and loss of a methoxyl group was also observed in the mass spectra obtained with both derivatization procedures (see fragment (A) in Figs. 1 and 2). Thus, it was confirmed that those peaks corresponded to the β-hydroxylated metabolites of 2C-B.

A possible metabolite, with a molecular ion at *m/z* 413/415 was observed at 8.9 min, which could correspond to a demethylated metabolite of 2C-B. The presence of the ion at *m/z* 126 and the absence of one at *m/z* 317/319 indicated that the hydroxyl group was not located at the C_β in the amine side chain. Therefore, the hydroxyl group must be located at the phenyl ring. A comparison between the fragmentation pattern of this metabolite and that of the parent compound 2C-B is presented in Table 3. The same fragmentation pattern was found for both compounds and the fragments of the demethylated metabolite showed a shift of 58 Da corresponding to the difference between the mass of the *O*-TMS derivatized hydroxyl group and that of a methoxyl group. The α-cleavage that originates ions at *m/z* 242/244 and *m/z* 302/304 in the mass spectra of 2C-B and demethylated 2C-B, respectively, has already been reported [14]. It was thus concluded that the metabolite corresponded to either 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine or to its isomer 4-bromo-5-hydroxy-2-methoxyphenethylamine.

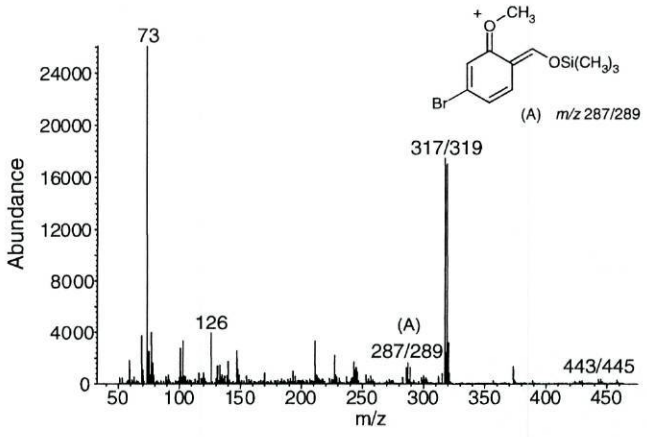


Fig. 1. Mass spectrum of the *N*-TFA-*O*-TMS derivative of the two peaks corresponding to the two β-hydroxylated 2C-B diastereomers (β-OH-2C-B) observed in the chromatograms obtained with the mice urine samples extracted at basic pH. (A) Characteristic fragment at *m/z* 287/289.

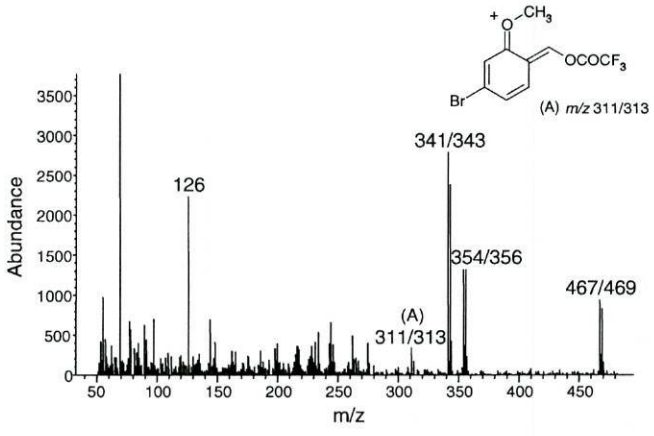
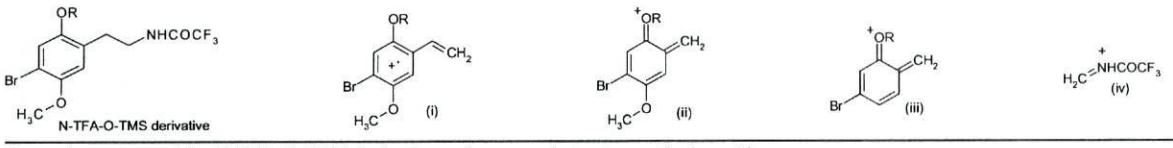


Fig. 2. Mass spectrum of the *N,O*-TFA derivative of the peak corresponding to the two β-hydroxylated 2C-B diastereomers (β-OH-2C-B) observed in the chromatograms obtained with the mice urine samples extracted at basic pH. (A) Characteristic fragment at *m/z* 311/313.

Table 3
Partial mass spectrometric characteristics of the *N*-TFA-*O*-TMS derivative of 2C-B and 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine (B-2-HMPEA)

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)			
	2C-B (R = CH_3)		B-2-HMPEA (R = $Si(CH_3)_3$)	
$M^{+\bullet}$	355 (49)	357 (49)	413 (75)	415 (88)
(i)	242 (99)	244 (100)	300 (82)	302 (100)
(ii)	229 (76)	231 (61)	287 (59)	289 (50)
(iii)	199 (39)	201 (39)	257 (10)	259 (16)
(iv)	126 (56)		126 (62)	



General structure of the *N*-TFA-*O*-TMS derivative and proposed structures of relevant ions.

Theoretically, it can be predicted that the 2-hydroxy-5-methoxy metabolite was observed rather than the 5-hydroxy-2-methoxy metabolite. This is based on the assumption that fragment (iii) in Table 3 can be explained by the formation of a stable quinonoid-like ion, which can only be formed in the case of the 2-hydroxy-5-methoxy metabolite [16].

Another peak showing the typical bromine isotope pattern was observed at 8.2 min. The molecular ion at *m/z* 332/334 and the presence of an ion at *m/z* 103, which is characteristic of *O*-TMS derivatives of primary alcohols [17] suggested that this compound could correspond to the neutral ethanol derivative of 2C-B. A comparison between the mass spectrometric characteristics of the spectra obtained with *O*-TMS derivatization and those of the mass spectra obtained with *O*-TFA derivatization is made in Table 4. The characteristic β-cleavage resulting in ions at *m/z* 229/231 at relatively high abundance has already been reported [14]. Additionally, a fragment at *m/z* 242/244 resulting from the α-cleavage and a fragment at *m/z* 199/201 resulting from the simultaneous β-cleavage and loss of the methoxyl group were also observed in the mass spectra obtained with *N,O*-TFA derivatization (see fragments (A) and (B) in Fig. 3). It was concluded that the 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol was the fourth metabolite observed in the chromatograms of the mouse urines extracted at basic pH.

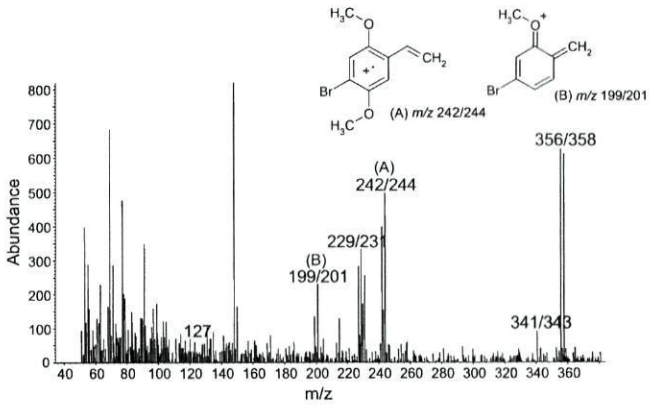


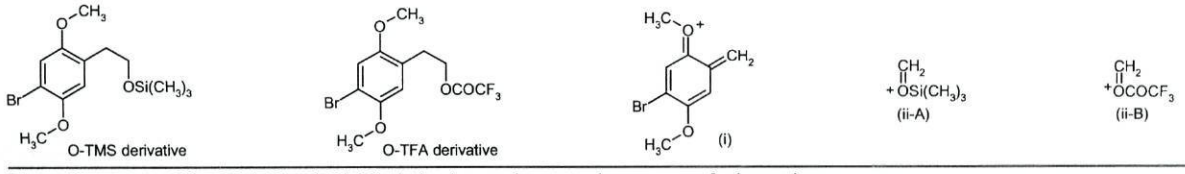
Fig. 3. Mass spectrum of the *O*-TFA derivative of the peak corresponding to the 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol (BDMPE) metabolite observed in the chromatograms obtained with the mice urine samples extracted at basic pH. (A) Characteristic fragment at *m/z* 242/244; (B) characteristic fragment at *m/z* 199/201.

3.2. Acidic extraction

The *O*-TMS derivative of the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid, extracted at acidic pH, was always a dominant peak in the chromatograms obtained after the analysis of the urine samples (see Fig. 4;

Table 4
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS and *O*-TFA derivatives of 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol (BDMPE)

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)			
	BDMPE (*O*-TMS derivative)		BDMPE (*O*-TFA derivative)	
$M^{+\bullet}$	332 (108)	334 (100)	356 (102)	358 (100)
$[M\text{-}CH_3^{\bullet}]^+$	317 (29)	319 (21)	341 (16)	343 (10)
(i)	229 (68)	231 (61)	229 (52)	231 (39)
(ii)	103 (156)		127 (14)	



General structure of the *O*-TMS and *O*-TFA derivatives and proposed structures of relevant ions.

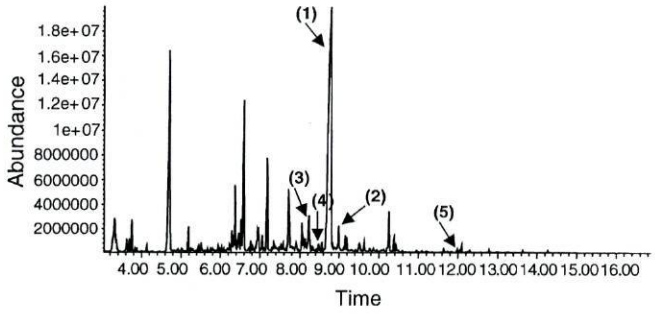


Fig. 4. Typical chromatogram obtained with the mice urine samples extracted at acidic pH. Peak identification: 1, *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid; 2, *O*-TMS derivative of 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenylacetic acid; 3, *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid; 4, *O*-TMS derivative of 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol; and 5, *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenaceturic acid.

peak 1). Its identification was based on the retention time and the mass spectrum relative to the analysis of the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid standard.

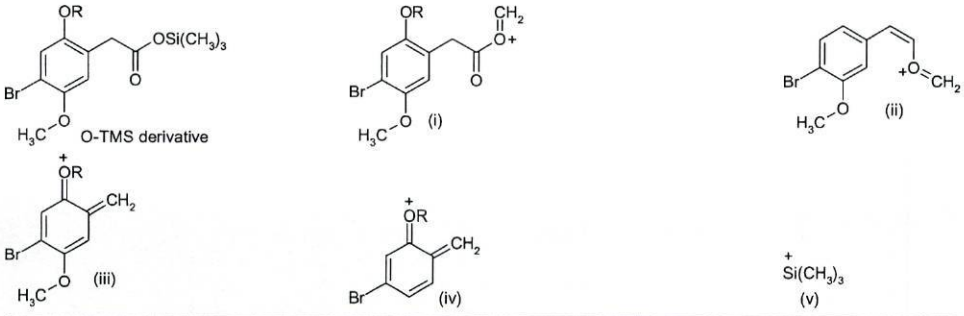
A possible metabolite, with a molecular ion at *m/z* 404/406 was observed at 9 min, which could correspond to the demethylated 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid. A comparison between the fragmentation pattern of this metabolite and that of the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid is presented in Table 5. The same fragmentation pattern was found for both compounds and the fragments of the demethylated metabolite showed a shift of 58 Da corresponding to the difference between the mass of the O-TMS derivatized hydroxyl group and that of a methoxyl group. It was thus concluded that the metabolite corresponded to either the 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenylacetic acid or to the 4-bromo-5-hydroxy-2-methoxyphenylacetic acid. Similarly to what was discussed above for the demethylated metabolite of 2C-B it is theoretically predictable that the observed metabolite corresponds to the 2-hydroxy-5-methoxy metabolite rather than to the 5-hydroxy-2-methoxy metabolite [16].

A small peak with a molecular ion at *m/z* 332/334 was observed at 8.3 min, which could correspond to the 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid. A comparison of the fragmentation pattern of this metabolite with that of the 2,5-dimethoxybenzoic acid is presented in Table 6. The matching fragmentation pattern of both compounds and the shift of 78/80 Da corresponding to the difference between the mass of the bromine atom and that of a hydrogen atom, confirmed that this brominated metabolite corresponded to the 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid.

Another relatively small peak showing the characteristic brominated pattern was found at 12 min. The molecular ion at *m/z* 403/405 suggested that this peak could correspond to the conjugation product of the phenylacetic acid-like metabolite with glycine, i.e. to the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenaceturic acid metabolite. In order to confirm this hypothesis a comparison with the fragmentation pattern of the ring unsubstituted phenaceturic acid was performed and a matching profile of both fragmentations was found, as can be seen in Table 7. Additionally a fragment at *m/z* 199/201 resulting from the simultaneous β-cleavage and loss of the methoxyl group and also a fragment at *m/z* 241/243 resulting from the cleavage at the amide were found (see fragments (A) and (B) in Fig. 5).

Table 5
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid (BDMPAA) and 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenylacetic acid (B-2-HMPAA)

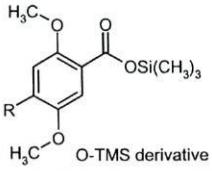
Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)			
	BDMPAA (R = CH_3)		B-2-HMPAA (R = $Si(CH_3)_3$)	
$M^{+\bullet}$	346 (21)	348 (21)	404 (12)	406 (13)
$[M\text{-}CH_3^{\bullet}]^+$	331 (6)	333 (6)	389 (2)	391 (2)
$[M\text{-}CH_2O^{\bullet}]^+$	316 (5)	318 (5)	374 (1)	376 (1)
(i)	287 (9)	289 (9)	345 (2)	347 (1)
(ii)	241 (5)	243 (5)	241 (1)	243 (1)
(iii)	229 (4)	231 (4)	287 (3)	289 (2)
(iv)	199 (4)	201 (4)	257 (5)	259 (5)
(v)	73 (100)		73 (100)	

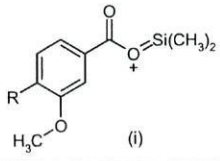


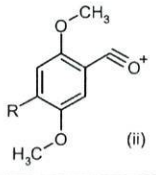
General structure of the *O*-TMS derivative and proposed structures of relevant ions.

Table 6
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid (BDMBA) and 2,5-dimethoxybenzoic acid (DMBA)

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)		
	BDMBA (R = Br)		DMBA (R = H)
$M^{+\bullet}$	332 (66)	334 (51)	254 (47)
$[M-CH_3^{\bullet}]^+$	317 (46)	319 (43)	239 (19)
$[M-CH_2O^{\bullet}]^+$	302 (100)	304 (100)	224 (100)
(i)	287 (29)	289 (32)	209 (30)
(ii)	243 (102)	245 (97)	165 (49)



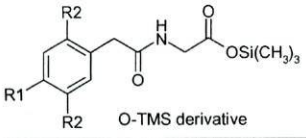


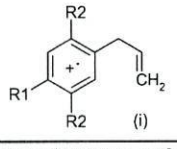


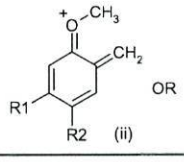
General structure of the *O*-TMS derivative and proposed structures of relevant ions.

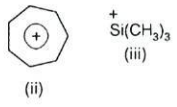
Table 7
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenaceturic acid (BDMPA) and phenaceturic acid (PA)

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)		
	BDMPA (R_1 = Br; R_2 = OCH_3)		PA (R_1, R_2 = H)
$M^{+\bullet}$	403 (16)	405 (17)	265 (31)
$[M-CH_3^{\bullet}]^+$	388 (7)	390 (9)	250 (40)
(i)	256 (57)	258 (53)	118 (26)
(ii)	229 (55)	231 (51)	91 (160)
(iii)	73 (100)		73 (100)









General structure of the *O*-TMS derivative and proposed structures of relevant ions.

At 8.5 min a peak was observed with a mass spectrum showing a molecular ion at *m/z* 390/392 and also the presence of an ion at *m/z* 103, which, as mentioned above is characteristic of the *O*-TMS derivatives of primary alcohols [17]. It was thus hypothesised that the corresponding metabolite could be the demethylated ethanol derivative of 2C-B. The fragmentation pattern observed in the mass spectra was consistent with that of the *O*-TMS derivative of the 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol, which was found in the mouse urines extracted at basic pH (see Table 8). Additionally, a fragment at *m/z* 257/259 resulting from the β-cleavage and loss of methoxyl group was identified in the mass spectrum (see fragment (A) in Fig. 6). Concerning the position of the hydroxyl group in the phenyl ring it was assumed once more, that it is theoretically predictable that the observed metabolite corresponds to the 2-hydroxy-5-methoxy metabolite rather than to the 5-hydroxy-2-methoxy metabolite. After all, fragment (i) in Table 8 can only be formed if this is the case [16]. Based on these consistent findings it was concluded that the corresponding metabolite is the 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol.

A summary of the 2C-B metabolites found in this study is presented in Table 9.

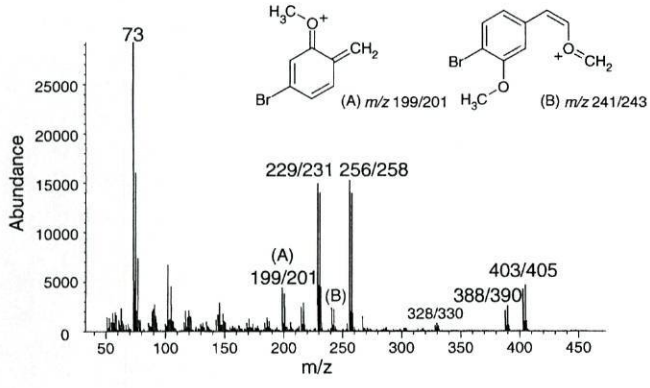
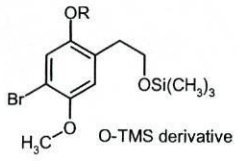
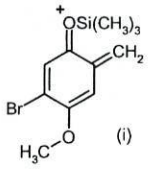
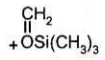


Fig. 5. Mass spectrum of the *O*-TMS derivative of the peak corresponding to the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenaceturic acid (BDMPA) metabolite observed in the chromatograms obtained with the mice urine samples extracted at acidic pH. (A) Characteristic fragment at *m/z* 199/201; (B) characteristic fragment at *m/z* 241/243.

3.3. Conjugates fraction

Under our experimental conditions we could not detect the formation of conjugates.

Table 8
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivative of 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol (B-2-HMPE) and 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol (BDMPE)

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)			
	B-2-HMPE (R = $Si(CH_3)_3$)		BDMPE (R = CH_3)	
$M^{+\bullet}$	390 (11)	392 (12)	332 (23)	334 (22)
$[M\text{-}CH_3^{\bullet}]^+$	375 (1)	377 (1)	317 (6)	319 (5)
$[M\text{-}CH_2O^{\bullet}]^+$	360 (1)	362 (2)	302 (13)	304 (9)
(i)	287 (13)	289 (13)	229 (15)	231 (13)
(ii)	103 (21)		103 (34)	
(iii)	73 (100)		73 (100)	
				
O-TMS derivative	(i)		(ii)	(iii)

General structure of the *O*-TMS derivative and proposed structures of relevant ions.

Table 9
Excretion of 2C-B metabolites identified in the mice urines extracted at basic and acidic pH after 24 h of the administration of the drug

2C-B metabolites extracted at basic pH				
2C-B	BDMPE	B-2-HMPEA	β-OH-2C-B	
+++	+	+	++	
2C-B metabolites extracted at acidic pH				
BDMPAA	B-2-HMPAA	BDMPA	BDMBA	B-2-HMPE
++++	+	+	+	+

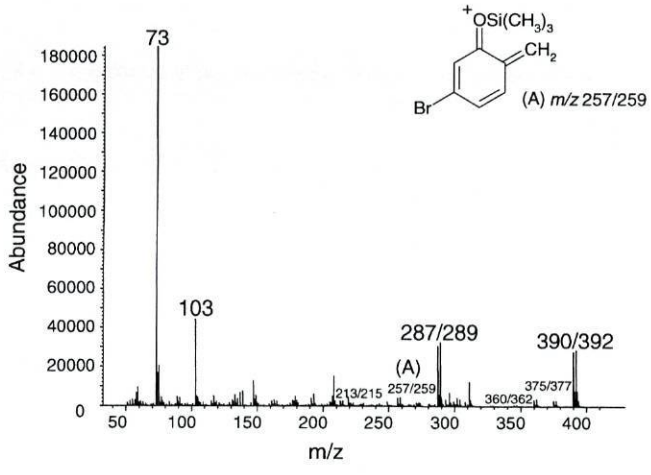


Fig. 6. Mass spectrum of the *O*-TMS derivative of the peak corresponding to the 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol (B-2-HMPE) metabolite observed in the chromatograms obtained with the mice urine samples extracted at acidic pH. (A) Characteristic fragment at *m/z* 257/259.

4. Discussion

The increasing number of reports on the abuse of 2C-B in several countries has raised concern due to its similarity to both amphetamine-like stimulants and to the hallucinogen mescaline [1]. Although its use seems to be less common than that of other more popular amphetamine derivatives such as MDMA, it has been noted that abusers of this type of compounds are often polydrug users and frequently ingest different compounds under the general name "Ecstasy" even though convinced that they are ingesting amphetamine or MDMA [4]. The limited number of available studies on 2C-B makes it more likely that its use is undetected and therefore underestimated, as well as the toxicological consequences of its abuse left undetermined. The present study was conducted in order to study the in vivo metabolism of this drug using the mouse as the animal model. We have identified several metabolites excreted in the mouse urine. With the exception of 2C-B and the dominant acidic metabolite 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid, for which reference standards were available, all other metabolites found in the present study were identified based on the characteristic fragmentations shown in their mass spectra. The metabolic pathways for 2C-B in mice as constructed by our findings are presented in Fig. 7. In mice, the main metabolite found in our experimental model was the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid. The oxidative deamination leading to the formation of both the phenylacetic acid metabolite and the 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol seems to be the most important pathway for 2C-B metabolism. This is also the case for the related hallucinogenic compound mescaline [18]. It is well known that monoamine oxidase (MAO) catalyses this metabolic transformation of mescaline in vivo [19,20]. It can be expected that an aldehyde intermediate is produced and further oxidized to the phenylacetic acid metabolite or reduced to the ethanol metabolite. Although the aldehyde intermediate and the enzymes responsible for its formation have not been identified in our study, this mechanism is likely to

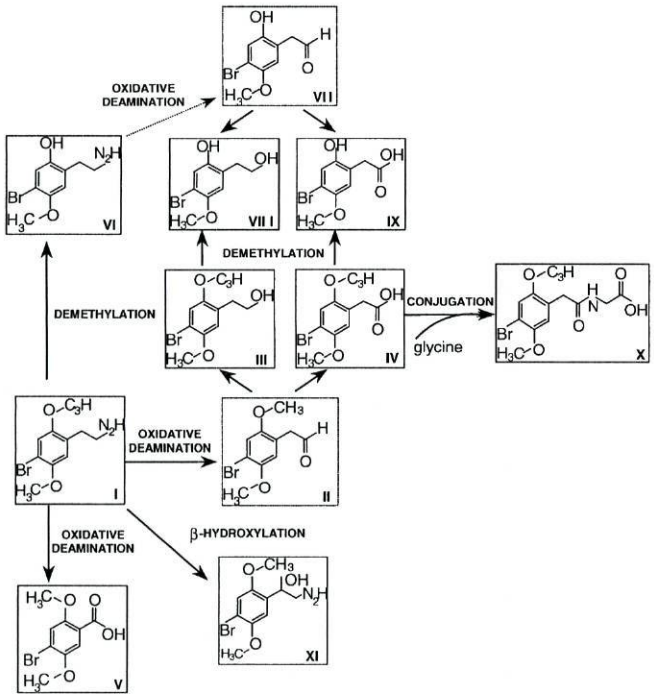


Fig. 7. Metabolic pathways found for 2C-B in mice after 24 h of acute drug administration. (I) 2C-B; (II) 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetaldehyde; (III) BDMPE; (IV) BDMPAA; (V) BDMBA; (VI) B-2-HMPEA; (VII) 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethyacetaldehyde; (VIII) B-2-HMPE; (IX) B-2-HMPAA; (X) BDMPA; and (XI) β-OH-2C-B. Structures outlined with full-line rectangles correspond to metabolites identified in the present study; structures outlined with discontinuous-line rectangles correspond to possible intermediate metabolites not identified in the present study.

occur since a similar pathway has already been described for mescaline in vitro [21].

Another observed pathway is the oxidative deamination with side chain degradation of the parent compound resulting in the formation of the respective benzoic acid metabolite, 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid. It can be expected that this reaction is catalysed by a cytochrome P450 dependent reaction similarly to what has been described for other amphetamines [22–25] and also for mescaline [26].

Demethylation of 2C-B was also found to be of relevance resulting in the production of 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine. Although the involved isoforms were not identified in the present study, it is expected that demethylation is catalysed by a cytochrome P450 dependent reaction. This metabolic pathway has been previously observed with other methoxylated amphetamine derivatives both in vitro [27–29] and in vivo [30,31]. 4-Bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine can subsequently undergo oxidative deamination to the respective demethylated phenylacetic acid metabolite and ethanol metabolites, which were also identified in the present study. Alternatively, the later metabolites may be generated by direct demethylation of the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid and 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol metabolites, respectively.

A metabolic pathway also observed in mice was the hydroxylation of the aliphatic side chain of 2C-B originating two β-hydroxylated isomers. β-Hydroxylation is a minor metabolic pathway for other amphetamines, including *d*-amphetamine, but it is of considerable interest since it occurs in the sympathetic nerve terminals, and its products, norephedrine and *p*-hydroxynorephedrine, have relevant pharmacological activities ([32] and references therein [33,34]).

We have also identified, in the mice urine, a conjugate of the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid with glycine, the 4-bromo-2,5-dimethoxyphenaceturic acid metabolite. Conjugation of amphetaminic compounds with glycine is well documented for several species, including mice and human [25,33].

Although extensively metabolised, it must be stress out that 2C-B was also excreted without biotransformation in the mice urine. This is a feature common to other amphetamine derivatives, including *d*-amphetamine [33] and it is of high relevance for forensic control of these substances, namely in human intoxications, since its presence in the urine can unequivocally identify the ingestion of the drug. The data collected in the present in vivo study indicates that 2C-B shares the same metabolic pathways common to other amphetamine-like compounds.

A recently published in vivo study with 2C-B performed in the rat also indicates the formation of the phenylacetic acid and ethanol metabolites indicating that oxidative deamination also occurs in that species [14]. However, according to the same study some discrepancies between the metabolism of 2C-B in the rat and in the mouse can be pointed out. Namely, the rat seems to demethylate both methoxy groups of 2C-B at positions 2 and 5 of the aromatic ring while in mice urine only the 2-*O*-desmethyl-metabolite was found. Additionally, the conjugates found in the rat urine were the *N*-acetylated metabolites of both the 2-*O*-desmethyl- and 5-*O*-desmethyl-metabolites, which were formed to a great extent [14]. In contrast, no *N*-acetylation seems to occur in mice. The later species produces the conjugate of the phenylacetic acid metabolite with glycine, yielding the phenaceturic metabolite. In fact, *N*-acetylation is known to be only a minor reaction in the metabolism of amphetamine and apparently limited to the rat and rabbit [33]. Additionally, there is no evidence for β-hydroxylation of 2C-B in the rat as well as for the oxidative deamination with side chain degradation to produce the benzoic acid metabolite. It therefore seems that more metabolic pathways for 2C-B are active in the mouse when compared to the rat.

In humans, only a preliminary study performed with the urine of a male subject abusing 2C-B is available. In that study unchanged 2C-B, the phenylacetic and benzoic acid metabolites and also the demethylated metabolite, 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine, were identified in urine, thus indicating that oxidative deamination and demethylation are probably important metabolic pathways for 2C-B operating in mice and humans [13]. Although a

more complete pattern of metabolites could be observed in mice urine, it must be considered that human in vivo studies with intoxicated individuals have the limitation that an ideal sampling after optimal exposure periods cannot be established and therefore some metabolites may be missed.

In conclusion, we have identified some metabolic pathways operative for 2C-B metabolism in the mouse. Additionally to the oxidative deamination and demethylation metabolic pathways that have been previously described for 2C-B in man and in the rat, both β-hydroxylation and conjugation of the phenylacetic acid metabolite with glycine seem to occur in the mouse. The identification of 2C-B metabolites may give extremely important clues for the biological and toxicological effects of this drug of abuse and provides new important data for forensic analysis on samples taken from 2C-B abusers. The finding of similar metabolic pathways operating in man and mouse for the metabolism of 2C-B seems to indicate that the mouse is a good animal model for further toxicokinetic and toxicity studies with this drug.

Acknowledgement

This work was supported by Fundação Para a Ciência e a Tecnologia (Praxis XXI/BD/20088/99) and by a project of FCT/POCTI/FEDER European Community funding (POCTI/36099/FCB/2000). The authors wish to thank the United Nations, Scientific Section, PDAB/DOA/UNDCP for generously providing 2C-B hydrochloride and The Netherlands Institute of Drugs and Doping Research, Utrecht, for generously providing 2,5-dimethoxyphenylacetic acid and the reference spectrum of the *O*-TMS derivative of the 2,5-dimethoxybenzoic acid.

References

[1] World Health Organization (WHO), World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 903 (2001) 1.
[2] D. Velea, M. Hautefeuille, G. Vazeille, C. Lantran-Davoux, L'Encéphale XXV (1999) 508.
[3] C. Giroud, M. Augsburger, F. Sadeghipour, E. Varesio, J.-L. Veuthey, L. Rivier, Praxis 86 (1997) 510.
[4] C. Giroud, M. Augsburger, L. Rivier, P. Mangin, F. Sadeghipour, E. Varesio, J.L. Veuthey, P. Kamalaprija, J. Anal. Toxicol. 22 (1998) 345.
[5] M. Katagi, H. Tsuchihashi, J. Health Sci. 48 (2002) 14.
[6] D. de Boer, I. Bosman, Pharm. World Sci. 26 (2004) 110.
[7] D. de Boer, M.J. Gijzels, I.J. Bosman, R.A.A. Maes, J. Anal. Toxicol. 23 (1999) 227.
[8] M.E. Bronson, W. Jiang, J. DeRuiter, C.R. Clark, Pharmacol. Biochem. Behav. 51 (1995) 473.
[9] R.A. Glennon, M. Titeler, R.A. Lyon, Pharmacol. Biochem. Behav. 30 (1988) 597.
[10] M. Lobos, Y. Borges, E. Gonzalez, B. Cassels, Gen. Pharmacol. 23 (1992) 1139.
[11] J.F.A. Ragan, S.A. Hite, M.S. Samuels, R.E. Garey, J. Anal. Toxicol. 9 (1985) 91.
[12] S.E.J. Bell, D.T. Burns, A.C. Dennis, J.S. Speers, Analyst 125 (2000) 541.
[13] D. de Boer, L.J.A.L.d. Reys, N. Pylon, M. Gijzels, I.J. Bosman, R.A.A. Maes, Br. J. Pharmacol. 127 (1999) 41.
[14] T. Kanamori, H. Inoue, Y. Iwata, Y. Ohmae, T. Kishi, J. Anal. Toxicol. 26 (2002) 61.
[15] H. Carmo, D. de Boer, F. Remião, F. Carvalho, L.A.d. Reys, M.d.L. Bastos, J. Anal. Toxicol. 26 (2002) 228.
[16] Z. Pelah, J.M. Wilson, M. Ohashi, H. Budzikiewicz, C. Djerassi, Tetrahedron 19 (1963) 2233.
[17] J.M. Halket, in: K. Blau, J.M. Halket (Eds.), Handbook of Derivatives for Chromatography, Wiley, Chichester, 1993, p. 297.
[18] G.J. Kapadia, M.B. Fayez, J. Pharm. Sci. 59 (1970) 1699.
[19] N.S. Shah, H.E. Himwich, Neuropharmacology 10 (1971) 547.
[20] N. Seiler, L. Demisch, Biochem. Pharmacol. 23 (1974) 273.
[21] K. Watanabe, Y. Kayano, T. Matsunaga, I. Yamamoto, H. Yoshimura, Biol. Pharm. Bull. 18 (1995) 696.
[22] F. Musshoff, Drug Metab. Rev. 32 (2000) 15.
[23] S. Shiiyama, T. Soejima-Ohkuma, S. Honda, Y. Kumagai, A.K. Cho, H. Yamada, K. Oguri, H. Yoshimura, Xenobiotica 27 (1997) 379.
[24] H. Yamada, S. Shiiyama, T. Soejima-Ohkuma, S. Honda, Y. Kumagai, A.K. Cho, K. Oguri, H. Yoshimura, J. Toxicol. Sci. 22 (1997) 65.
[25] L.G. Dring, R.L. Smith, R.T. Williams, Biochem. J. 116 (1970) 425.
[26] L. Demisch, N. Seiler, Biochem. Pharmacol. 24 (1975) 575.
[27] M.V. Bach, R.T. Coutts, G.B. Baker, Xenobiotica 29 (1999) 719.
[28] J.S. Zwieg, J.N. Castagnoli, Psychopharmacol. Commun. 1 (1975) 359.
[29] D. Wu, S.V. Otton, T. Inaba, W. Kalow, E.M. Sellers, Biochem. Pharmacol. 53 (1997) 1605.
[30] B.C. Foster, D.L. Wilson, T.D. Cyr, J. Moffatt, H.S. Buttar, Biopharm. Drug Dispos. 16 (1995) 1.
[31] B.C. Foster, D.L. Litster, H.S. Buttar, B. Dawson, J. Zamecnik, Biopharm. Drug Dispos. 14 (1993) 709.
[32] R.J. Baldessarini, Pediatrics 49 (1972) 694.
[33] J. Caldwell, in: J. Caldwell (Ed.), Amphetamines and Related Stimulants: Chemical, Biological, Clinical, and Sociological Aspects, CRC Press, Boca Raton, 1980, p. 29.
[34] H.S. Shin, Drug Metab. Dispos. 25 (1997) 657.

5.3. Trabalho III

Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2004) 369 : 198–205
DOI 10.1007/s00210-003-0850-0

ORIGINAL ARTICLE

**Helena Carmo · Jan G. Hengstler · Douwe de Boer
Michael Ringel · Félix Carvalho · Eduarda Fernandes
Fernando Remião · Lesseps A. dos Reys · Franz Oesch
Maria de Lourdes Bastos**

Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse

Received: 29 April 2003 / Accepted: 26 October 2003 / Published online: 16 December 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract Several cases of death associated with 4-methylthioamphetamine (4-MTA) have raised public concern about the abuse of this designer drug that is usually sold as "Ecstasy" or "Flatliners". Since only very little is known about the metabolism of 4-MTA in humans we performed an in vitro study incubating racemic 4-MTA with primary hepatocytes isolated from three male human donors. Additionally, hepatocytes from male monkey (Cynomolgus), dog (Beagle), rabbit (Chinchilla), rat (Sprague-Dawley), and mouse (CD1) were examined for the metabolism of racemic 4-MTA. We observed that 4-MTA was not extensively metabolised by hepatocytes from all species examined. The main metabolite was identified as 4-methylthiobenzoic acid which, for the first time has been described as a human metabolite. In addition to metabolism we also examined 4-MTA-induced toxicity as evidenced by the ATP cellular content. Interestingly, one of the three human donors showed a dramatically increased sensitivity to the reduction in ATP content induced by 4-MTA. Comparing the species examined, the most extensive formation of 4-methylthiobenzoic acid was observed in the rabbit hepatocytes followed by human, monkey, dog and mouse hepatocytes, whereas no formation of 4-methylthiobenzoic acid was seen in the rat hepatocytes. Toxicity data suggest that rabbit hepatocytes are more resistant to 4-MTA than the other species, which may be due to the more extensive metabolism. In conclusion, we have shown that 4-methylthiobenzoic acid is the main metabolite formed from 4-MTA by human hepatocytes and also by the hepatocytes of the other tested species except the rat. Toxicity data suggest only moderate interspecies differences.

Keywords 4-Methylthioamphetamine · Designer drugs · Metabolism · In vitro · Cryopreserved hepatocytes

H. Carmo (✉) · F. Carvalho · E. Fernandes · F. Remião
M. de Lourdes Bastos
REQUIMTE, Toxicology Department,
Faculty of Pharmacy, Porto University,
Rua Aníbal Cunha 164, 4050–047 Porto, Portugal
Fax: +35-12-22003977,
e-mail: helenacarmo@ff.up.pt

J. G. Hengstler · M. Ringel · F. Oesch
Institute of Toxicology, University of Mainz,
Obere Zahlbacher Strasse 67, 55131 Mainz, Germany

D. de Boer · L. A. dos Reys
Laboratory of Doping Control, Lisbon Sports Medicine Centre,
Av. Prof. Egas Moniz, Estádio Universitário,
1600 Lisboa, Portugal

Introduction

4-Methylthioamphetamine (4-MTA) is an amphetamine-like stimulant drug originally synthesised as a potential antidepressant (Winstock et al. 2002). Recently, 4-MTA raised public concern since it was identified as a substance of abuse within the dance club scene in Europe. 4-MTA is usually sold as tablets and has been marketed as "Ecstasy" and as a novel drug named "Flatliners". Since its first identification in 1997 there have been at least six cases of death associated with 4-MTA in the UK and in the Netherlands (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction [EMCDDA] 1999). In addition, one fatal and seven non-fatal intoxications in Belgium have been reported (de Letter et al. 2001). Therefore, 4-MTA has been submitted to control measures and criminal penalties within the member States of the European Union (EMCDDA 1999). More recently a World Health Organization Expert Committee on Drug Dependence recommended the international control of 4-MTA (World Health Organization 2001).

The stimulatory effects induced by 4-MTA are due to the increase in the release of serotonin, the inhibition of serotonin uptake from nerve endings (Huang et al. 1992) and also inhibition of monoamine oxidase A (Li et al. 1996; Scorza et al. 1997). It has been suggested that 4-MTA is more dangerous than most other designer drugs, because its slow onset of action has encouraged abusers to administer further doses assuming that the first dose was inadequate (EMCDDA 1999; Kavanagh et al. 1999). Tox-

icity of 4-MTA may be related with its ability to induce a hyperserotonergic state known as the serotonin syndrome, which is characterised by a constellation of symptoms (confusion, fever, shivering, diaphoresis, ataxia, hyperreflexia, myoclonus or diarrhoea; Sporer 1995). This syndrome was already observed in neurotoxicity studies performed with rats treated with 4-MTA (Huang et al. 1992). In the reported 4-MTA-related intoxications in humans, symptoms typical for the sympathomimetic effects of amphetamine-like compounds were observed, such as tachycardia, tremors, stomach cramps, headache and sweating (de Boer et al. 1999; Elliott 2000; de Letter et al. 2001).

Despite of its high potential of abuse and high forensic relevance, the knowledge about the metabolism of 4-MTA in humans is still very scarce. Recently, 4-MTA and two possible metabolites, a sulfoxide and one unidentified hydroxylated metabolite were found in the post-mortem blood and urine of a male subject fatally poisoned with 4-MTA (Elliott 2000).

It is generally accepted that in vitro systems with hepatocytes can be used to predict the hepatic metabolism in vivo (Hengstler et al. 2000a, 2000b). In order to examine the human hepatic metabolism of 4-MTA we incubated 4-MTA with human hepatocytes. Since we have previously examined the metabolism of 4-MTA in CD1 mice in vivo (Carmo et al. 2002), we also included CD1 mouse hepatocytes in the present in vitro study in order to compare in vivo metabolism in the mouse to the data obtained by our in vitro system. In addition, hepatocytes from Sprague-Dawley rat, Beagle dog, Chinchilla rabbit and Cynomolgus monkey were included to allow interspecies comparison.

Materials and methods

Isolation, cryopreservation and thawing of hepatocytes

Isolation, cryopreservation and thawing of hepatocytes were performed as previously described in the standard operation procedures published by Hengstler et al. (2000b).

Housing and experimental treatment of the animals were conducted under the European Community guidelines for the use of experimental animals (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, 1986, and Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, 1998).

Incubation of the hepatocytes with 4-MTA

In this study we used the hepatocytes of three human donors. From donor 1 (male; 60 years old) only cryopreserved hepatocytes were used. From donor 2 (male; 62 years old) freshly isolated as well as cryopreserved hepatocytes were used to examine whether cryopreservation allowed a sufficient maintenance of drug metabolism. From donor 3 (male; 46 years old) only freshly isolated hepatocytes were used. The rat cryopreserved hepatocytes were prepared from three male Sprague-Dawley rats (Charles-River, Sulzfeld, Germany; 200–300 g body weight). Three cryopreserved hepatocytes pools were obtained from 4–5 male CD1 mice (Charles River, Sulzfeld, Germany; 30–35 g body weight). Due to the relatively small number of hepatocytes obtained from a single mouse (ap-

Table 1 Formation of 4-methylthiobenzoic acid from 4-MTA by human, monkey, dog, rabbit, rat and mouse hepatocytes after incubation with 100 µM and 1,000 µM 4-MTA. *nd* not determined, *fresh* human freshly isolated hepatocytes, *cryo* human cryopreserved hepatocytes

	Human				Monkey			Dog	Rabbit			Rat			Mouse			Suspension buffer only
	Donors				Experiment[a]													
	1 (cryo)	2 (fresh)	2 (cryo)	3 (fresh)	1	2	3		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
4-MTA 100 µM	nd	–	nd	–	–	nd	–	nd	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
4-MTA 1,000 µM	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	–

[a]Hepatocytes from all other species were cryopreserved

proximately 60 million), we pooled the hepatocytes from 4–5-mice to obtain cryopreserved batches of mouse hepatocytes. Cryopreserved hepatocytes from three male Cynomolgus monkeys (Aventis, Germany; 9–10 months old), one male Chinchilla rabbit (Charles-River, Sulzfeld, Germany, 1,500 g body weight) and one male Marshall Beagle dog (Merck, Darmstadt, Germany; 9–18 months old) were also used.

After the hepatocytes isolation and/or thawing, the obtained hepatocytes suspensions were diluted to a cell density of 1 million cells per ml in suspension buffer prepared as previously described in the standard operation procedures published by Hengstler et al. (Hengstler et al. 2000b). Briefly, the buffer consisted of: 620 ml glucose solution (50 mM D-glucose), 100 ml Krebs-Henseleit buffer (1 M NaCl, 24 mM KCl, and 12 mM KH_2PO_4; adjusted to pH 7.6), 100 ml HEPES buffer (250 mM HEPES; adjusted to pH 7.6), 150 ml amino acid solution (Hengstler et al. 2000b), 10 ml glutamine solution (48 mM L-glutamine; freshly prepared), 5 ml insulin solution (0.35 mM insulin dissolved with 1 M NaOH, adjusted to pH 7.6; freshly prepared), 8 ml $CaCl_2$ solution (129 mM $CaCl_2.2\ H_2O$), 4 ml $MgSO_4$ solution (100 mM $MgSO_4.7\ H_2O$) and 2 g/l of bovine serum albumin that was dissolved in the mixture of the above mentioned solutions. These suspensions were then incubated with 4-MTA hydrochloride salt (racemic mixture; David Nichols, Indiana, USA) at a concentration of either 100 µM or 1,000 µM for 3 h, as indicated in Table 1, in a water bath kept at 37°C with moderate shaking. Solvent controls were also assayed by incubating 100 µM and 1,000 µM 4-MTA with only suspension buffer.

After 3 h of incubation aliquots were taken from the hepatocytes suspensions for subsequent GC/MS analysis and/or ATP content determination. These samples were stored at –20°C until ATP content determination or at –80°C until GC-MS analysis.

Isolation of compounds of interest for GC/MS analysis

Basic fraction. Aliquots of 500 µl hepatocyte suspensions spiked with 20 µg of phenylpropanolamine (internal standard) were transferred to a 25 ml tube and 500 µl of water were added. The pH was adjusted to values smaller than 3.4 by addition of 37% HCl. The acidic compounds were extracted by adding 4 ml of mixture of n-hexane and ethyl acetate (10:1; v/v). The tube was vortexed for a few seconds, shaken for 10 min and centrifuged for 5 min at 1,500 × *g*. The organic phase was discarded and the aqueous phase was kept. This washing process was repeated and the organic solvent removed from the aqueous phase under nitrogen stream. To the remaining aqueous phase containing the basic compounds 100 µl of 10 M KOH solution were added in order to obtain a pH >13. The basic compounds were extracted by adding 4 ml of mixture of chloroform and 2-propanol (10:1; v/v). The tube was vortexed for a few seconds, shaken for 30 min and centrifuged for 10 min at 1,500 × *g*. The organic phase was transferred to a clean tube and the aqueous phase was kept. This basic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed partially under a gentle nitrogen stream. An aliquot of 10 µl of *N*-methylbis(trifluoroacetamide) (MBTFA; Macherey-Nagel, Düren, Germany) was added to prevent the loss of volatile compounds, after which the evaporation process was completed. The obtained residue was dried under reduced pressure over P_2O_5 and KOH for at least 1 h.

Acidic fraction. Aliquots of 500 µl hepatocyte suspensions spiked with 10 µg of ketoprofen (internal standard) were transferred to a 25 ml tube and 500 µl of water and 50 µl of 10 M KOH solution were added in order to obtain a pH >13. The basic compounds were extracted by adding 4 ml of mixture of n-hexane and ethyl acetate (10:1; v/v). The tube was vortexed for a few seconds, shaken for 10 min and centrifuged for 5 min at 1,500 × *g*. The organic phase was discarded and the aqueous phase was kept. This washing process was repeated and the organic solvent removed from the aqueous phase under nitrogen stream. The pH of the remaining aqueous phase containing the acidic compounds was adjusted to values smaller than 3.4 by addition of 37% HCl. The acidic compounds were extracted by adding 4 ml of mixture of chloroform and 2-propanol (10:1; v/v). The tube was vortexed for a few seconds, shaken for 30 min and centrifuged for 10 min at 1,500 × *g*. The organic phase was transferred to a clean tube and the aqueous phase was kept. This acidic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed in a rotating evaporator. The obtained residue was dried under reduced pressure over P_2O_5 and KOH for at least 1 h.

Derivatisations for GC/MS analysis

N,O-TFA derivatisation of the basic fraction. To the respective dry residue 50 µl of ethyl acetate and 50 µl of trifluoroacetic anhydride (TFAA; Janssen Chimica, Beerse, Belgium) were added. The mixture was heated for 30 min at 65°C. After cooling to room temperature the excess of reagents was evaporated under a gentle stream of nitrogen. The obtained residue was dissolved in 100 µl of ethyl acetate and analysed by GC/MS.

N,O-TMS derivatisation of the acidic fraction. To the respective dry residue 50 µl of a mixture of *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA; Macherey-Nagel, Düren, Germany) and trimethylsilylchloride (TMSCl; Macherey-Nagel, Düren, Germany) (95:5; v/v) were added. The mixture was heated to 80°C for 30 min. After cooling to room temperature, the mixture was analysed by GC/MS.

GC/MS analysis

GC/MS analysis was performed on a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph coupled to a Hewlett Packard 5971 mass selective detector (Agilent Technologies, Waldbron, Germany). The gas chromatograph was equipped with a Hewlett Packard capillary column HP-1 (Agilent Technologies, Waldbron, Germany), 18 m long, 0.20 mm i.d. and 0.33 µm film thickness. A two level oven program was applied: the temperature was maintained at 100°C for 1 min, programmed up to 300°C at 15°/min and maintained at 300°C for 20 min. The temperatures of the injection port and the transfer line were 250 and 310°C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 ml/min. A sample volume of 2 µl was injected at a split ratio of 1:10. The mass selective detector was operated in the electron ionisation mode according the manufacturer's recommendations in the full scan range of *m/z* 50–600.

Determination of the hepatocytes ATP content

ATP content of the hepatocytes was determined as described previously (Fritz et al. 1997; Hengstler et al. 1999) using a commercially available kit (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Germany). Briefly, 150 µl of cell suspension containing 20,000 hepatocytes were lysed and extracted by gently mixing with 50 µl of extraction reagent (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Germany), into each well. The ATP concentration was measured 20–60 min later in a Berthold LB-953 luminometer using 50 µl of the hepatocyte suspension extract mixed with 50 µl of the Luciferin-Luciferase reagent (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Germany). An ATP standard curve was performed using 50 µl aliquots of a 250 ng/ml ATP standard serially diluted 1:3 in dilution buffer. All samples were analysed in duplicate and mean values were used for further calculation. For each incubation period with 4-MTA a control hepatocytes sample was assayed. ATP content of these control samples was set to 100% to calculate the percentage of viability for the hepatocytes incubated with the test substance. Human, monkey and rabbit hepatocyte samples from three independent experiments were analysed after incubation with 1,000 µM 4-MTA and mean values as well as standard deviations were calculated. For rat, mouse and dog only one batch of hepatocytes per species was analysed for ATP content.

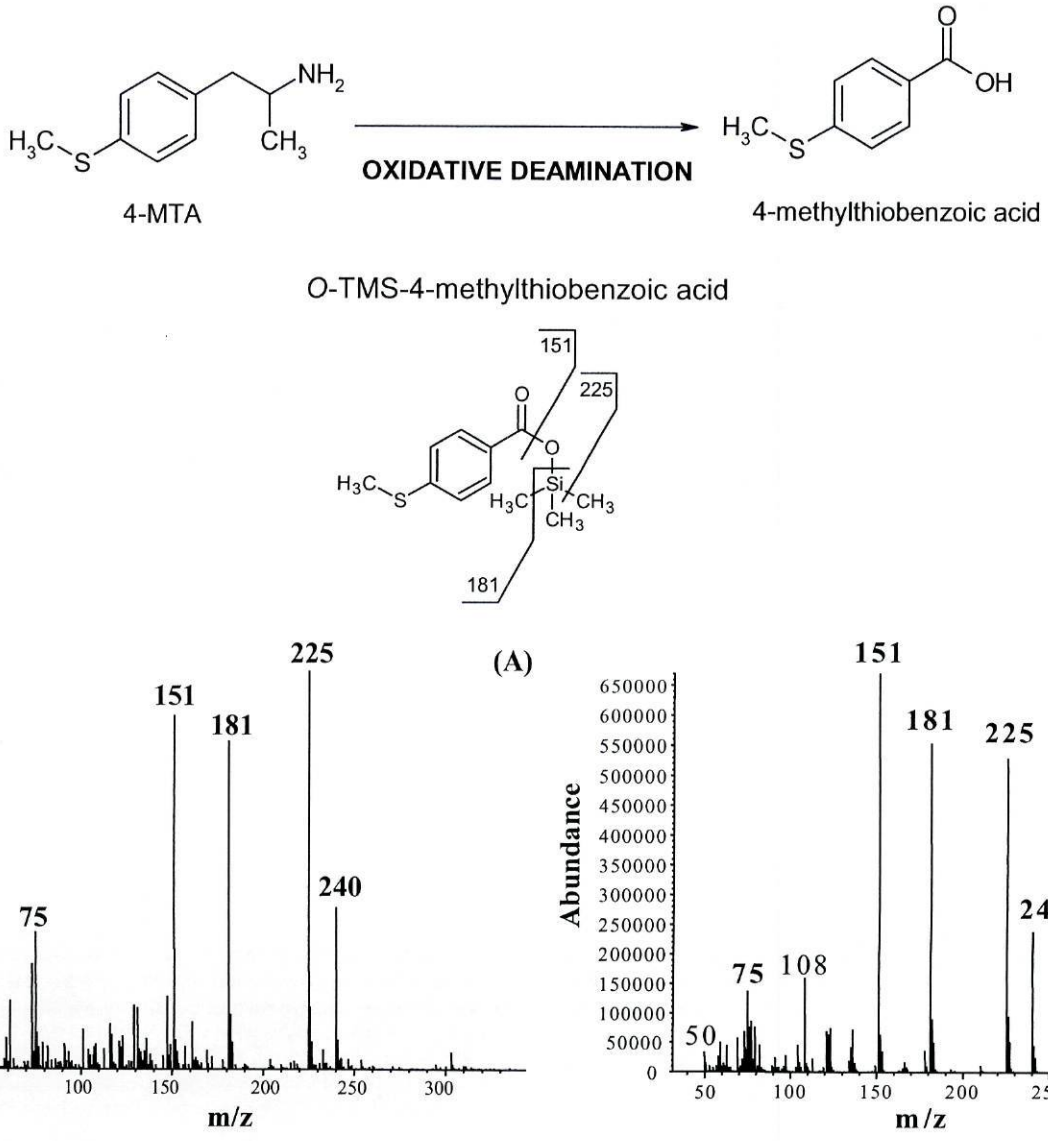


Fig. 1A, B Mass spectrum of the mono-*O*-TMS derivative of 4-methylthiobenzoic acid. **A** Hepatocytes samples extracted at acidic pH. **B** 4-Methylthiobenzoic acid standard

Results

Identification of 4-methylthiobenzoic acid as the main metabolite of 4-MTA

4-MTA was incubated with human, monkey, dog, rabbit, rat and mouse hepatocytes. The main metabolite observed was identified as 4-methylthiobenzoic acid (Fig. 1). The mono-*O*-TMS derivative of 4-methylthiobenzoic acid (Fig. 1A) originated a relatively small peak in the chromatograms obtained after the analysis of the residues that were extracted at acidic pH. As with 4-MTA, its identification was based on the retention time and the mass spectrum compared to the analysis of a 4-methylthiobenzoic acid standard (Fig. 1B).

Interspecies differences in 4-MTA metabolism

Clear qualitative interspecies differences in the formation of 4-methylthiobenzoic acid were observed (Table 1). 4-Methylthiobenzoic acid was formed by hepatocytes from all three human donors examined. No obvious difference was observed between fresh and cryopreserved hepatocytes from donor 2 (Table 1). Similarly, all rabbit and dog hepatocytes tested produced this metabolite. In contrast, rat hepatocytes were not able to produce this metabolite under our study conditions. Only two of the three examined pools of hepatocytes from mice were able to generate measurable amounts of 4-methylthiobenzoic acid. The same constellation was observed for the monkey. No 4-methylthiobenzoic acid was spontaneously formed in a control experiment, where 4-MTA was incubated in suspension buffer without hepatocytes.

The concentration of the parent compound was not substantially reduced during incubation with hepatocytes for all species except the rabbit, showing that 4-MTA was only poorly metabolised by these species. A reduction of ap-

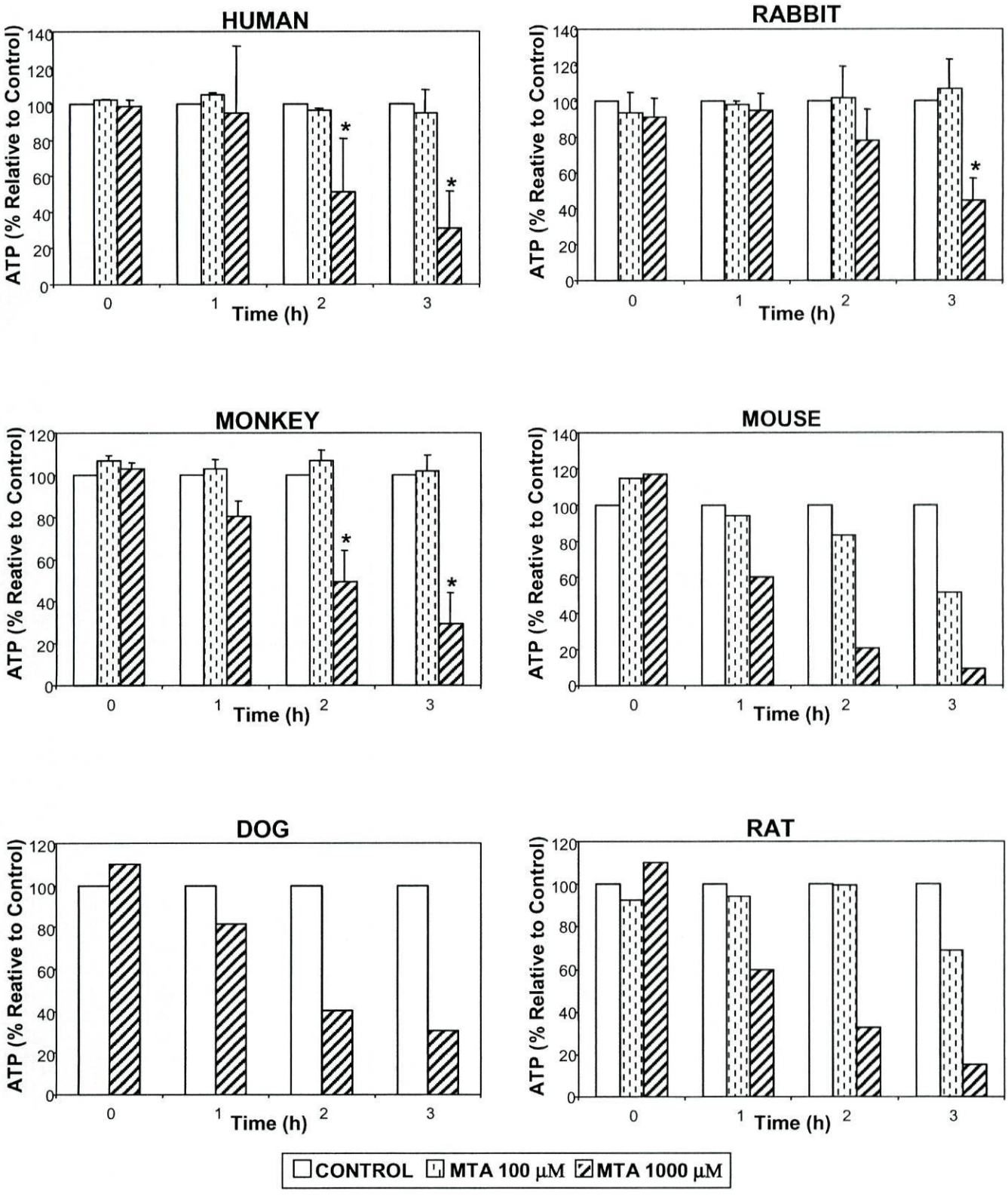


Fig. 2 Toxicity of 100 µM and 1,000 µM 4-MTA in hepatocytes of the six tested species after 0, 1, 2 and 3 h of incubation. Reduction in ATP content was used as a measure of toxicity to the hepatocytes. Data with human, monkey and rabbit are presented as mean ± standard deviation from three independent experiments. Data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures, followed by the Scheffé test. *$P<0.05$, compared to control. Hepatocytes from mouse, rat and dog were examined only once, since no major interspecies differences were obvious

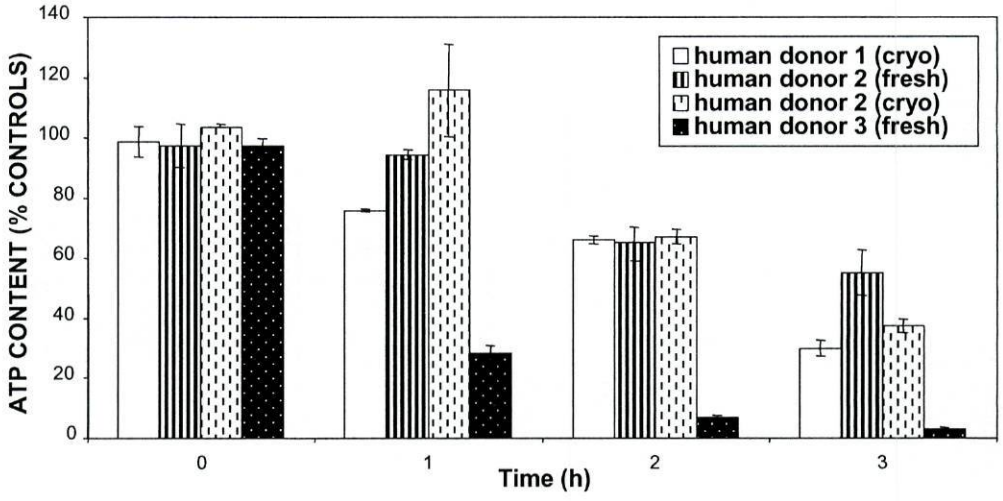


Fig. 3 Variability in TP content observed with the human hepatocytes after 0, 1, 2 and 3 h of incubation with 1,000 µM 4-MTA. Data are presented as mean ± range of duplicate measurements for each sample

proximately 26% in 4-MTA content was observed in rabbit hepatocytes incubated with 100 µM 4-MTA after 3 h of incubation. After the incubation of rabbit hepatocytes with 1,000 µM 4-MTA a reduction of approximately 10% in the 4-MTA content was observed.

In addition to 4-methylthiobenzoic acid, other structures were identified in the hepatocytes suspensions, namely two β-hydroxylated isomers of 4-MTA (4-methylthiophenylpropanolamine and 4-methylthiocathine) and 4-MTA sulfoxide. However, these substances were also formed spontaneously in suspension buffer without addition of hepatocytes.

Interspecies differences in toxicity of 4-MTA

Human, monkey, dog, rabbit, rat and mouse hepatocytes were incubated with 100 and 1,000 µM 4-MTA and toxicity was measured after 0, 1, 2 and 3 h by determination of the ATP content. A reduction in ATP content after incubation with 1,000 µM 4-MTA was observed in the hepatocytes from all species whereas 100 µM 4-MTA represents a non-toxic concentration (Fig. 2). To be able to identify possible interspecies differences in toxicity we compared ATP data from the human, monkey and rabbit hepatocytes of three independent experiments (Fig. 2). The data suggest that human and monkey hepatocytes might be slightly more susceptible to 4-MTA toxicity than the rabbit hepatocytes. After 1 h of incubation with 1,000 µM 4-MTA mean ATP content was reduced to 95% in rabbit hepatocytes compared to 79% in humans and 80% in monkey (Fig. 2). After 2 h of incubation with 1,000 µM 4-MTA the data were 78%, 51% and 49% for rabbit, human and monkey hepatocytes, respectively (Fig. 2). However, the human data should be interpreted with caution due to the observed relatively high interindividual differences, since hepatocytes from donor 3 were more susceptible than hepatocytes from the other donors (Fig. 3). In fact, after 1 h of incubation with 1,000 µM 4-MTA, ATP content of donor 1 was 76% of controls, donor 2 resulted in 94% (freshly isolated hepatocytes) or 115% (cryopreserved hepatocytes), but was much lower for donor 3 resulting in 29% of controls (Fig. 3). The data after 2 h were 66%, 65%, 67% and 7% for donor 1, donor 2 (fresh), donor 2 (cryopreserved) and donor 3, respectively (Fig. 3).

Discussion

Recently, much concern has surrounded the cases of death associated with 4-MTA abuse in the dance club scene in Europe. Although it is clear that 4-MTA will act by similar mechanisms as other amphetamine-like drugs, very little is known about its toxicity and metabolism in humans. From animal studies it has been reported that 4-MTA induces respiratory depression, convulsive effects and typical serotonergic behavioural syndromes (Huang et al. 1992; EMCDDA 1999). In humans, adverse effects include nausea, hyperthermia, memory loss, nystagmus, thirst, shivering, confusion, sweating, and amnesic effects (EMCDDA 1999). In addition, hepatotoxicity has occurred in many cases of intoxication with d-amphetamine or amphetamine-related analogues such as methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"; Jones et al. 1994; Andreu et al. 1998; Jones and Simpson 1999).

In the present study we incubated human, monkey, dog, rabbit, rat and mouse hepatocytes with 4-MTA to predict its in vivo metabolism. Previous studies have reported a very good correlation between metabolic data obtained with isolated hepatocytes in vitro and the in vivo situation (Hengstler et al. 2000a, 2000b). We could identify 4-methylthiobenzoic acid as the major metabolite of 4-MTA. Formation of this metabolite in humans has not been described before. We observed formation of 4-methylthiobenzoic acid by human, monkey, dog, rabbit and mouse hepatocytes, but not by rat hepatocytes. In rabbit hepatocytes, formation of 4-methylthiobenzoic acid was already observed when a concentration of 100 µM of the parent compound was used. In contrast, for all other species 1,000 µM of 4-MTA had to be used in order to detect formation of the metabolite. This suggests that 4-MTA is metabolised more extensively by the rabbit

compared to man, monkey, dog and mouse, whereas no metabolite was identified in the rat hepatocyte suspensions. Accordingly, comparative metabolic studies performed with d-amphetamine and other related compounds have shown that the rabbit metabolises these drugs more extensively than other species (Caldwell 1980). Further metabolites were observed, namely two β-hydroxylated isomers of 4-MTA (4-methylthiophenylpropanolamine and 4-methylthiocathine) and 4-methylthioamphetamine sulfoxide. However, these substances appeared already in suspension buffer controls without hepatocytes, suggesting that they are formed spontaneously without the interference of hepatic metabolism. Recently, GC/MS analysis has been performed in blood and urine of an individual fatally poisoned with 4-MTA (Elliott 2000). In the later study the presence of two possible not clearly identified metabolites was reported, one being possibly the 4-MTA sulfoxide and the other a hydroxylated form of 4-MTA.

In our study we included also cryopreserved hepatocytes from male CD1 mice since this mouse strain has already been analysed for 4-MTA metabolism in vivo in a previous study (Carmo et al. 2002). This gave us the chance to compare the metabolism by our in vitro system with cryopreserved mouse hepatocytes to the in vivo situation. Totally, four metabolites were observed in the former in vivo study. Similar to the present in vitro study 4-methylthiobenzoic acid was also formed in CD1 mice in vivo. In addition, also the two β-hydroxylated isomers of 4-MTA (4-methylthiophenylpropanolamine and 4-methylthiocathine) that appeared spontaneously in the suspension buffer were observed in the in vivo study. A third metabolite identified in the in vivo study, hydroxy-4-methylthioamphetamine (a metabolite hydroxylated either at the phenyl ring or at the methylthio group of 4-MTA) was not identified after in vitro incubation with cryopreserved hepatocytes. One explanation might be that hydroxy-4-methylthioamphetamine is formed extrahepatically. Another possibility is that in the in vivo study urine was collected during 24 h, whereas the incubation period in vitro was only 3 h, which possibly was not long enough to generate a detectable amount of hydroxy-4-methylthioamphetamine. It should be considered that all 4-MTA metabolites were formed only at very little amounts. The concentration of the parent compound 4-MTA was not substantially reduced during incubation with hepatocytes for all species except the rabbit, showing that 4-MTA is only poorly metabolised. This agrees well with the in vivo situation in mice, where 4-MTA was metabolised to a low extent, but predominantly excreted unchanged in the urine (Carmo et al. 2002).

To examine whether the concentrations of 4-MTA used in this study were toxic to hepatocytes we measured their ATP content to determine cellular viability. The lower concentration of 100 µM 4-MTA did not cause a decrease in ATP content compared to the respective controls. In contrast, the higher concentration of 1,000 µM 4-MTA reduced ATP content in hepatocytes of all species tested. Interestingly, large differences in susceptibility to 4-MTA were found among the three examined human donors hepatocytes. Indeed, hepatocytes from one of the donors showed a remarkably higher sensitivity towards 4-MTA compared to the two other individuals. There is no evidence that the higher toxicity observed for donor 3 is due to a bad quality of this batch of hepatocytes, since ATP content in the controls of donor 3 were similar when compared to the other donors. In addition, hepatocytes of donor 3 were able to produce 4-methylthiobenzoic acid in a similar way to that observed for donors 1 and 2. Also, no major difference was observed between freshly isolated and cryopreserved hepatocytes from donor 2. Interindividual differences in tolerance to other amphetamine-related designer drugs toxicity have already been noticed (Tucker et al. 1994; Colado et al. 1995; Jones and Simpson 1999 and references therein; Malpass et al. 1999). In addition to the observed differences between human hepatocytes batches we also observed evidence for interspecies differences. Hepatocytes of the rabbit seemed to be more resistant to 4-MTA toxicity compared to human hepatocytes and hepatocytes from the other species. This might be due to the more extensive metabolism of 4-MTA by rabbit hepatocytes.

In conclusion, the results of the present study show that, similar to what was already observed in vivo in mice, the designer drug 4-MTA is also metabolised by human hepatocytes as well as by monkey, dog, rabbit, rat, and mouse hepatocytes. The main metabolite of 4-MTA was 4-methylthiobenzoic acid in all species tested except the rat. This metabolite was identified for the first time in humans. The identification of 4-MTA metabolism in humans is extremely important for elucidating the biological and toxicological effects of this drug of abuse and provides new important data for forensic analysis on samples taken from 4-MTA abusers.

Acknowledgements The authors wish to thank Doctor David Nichols (Purdue University, West Lafayette, IN), for generously providing 4-MTA. The authors wish to thank Renate Santos for excellent technical assistance and helpful discussion. This work was supported by Fundação Para a Ciência e a Tecnologia (Praxis XXI/BD/20088/99), by a project of FCT/POCTI/FEDER European Community funding (POCTI/36099/FCB/2000) and by the BMBF.

References

Andreu V, Mas A, Bruguera M, Salmeron JM, Moreno V, Nogue S, Rodes J (1998) Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. J Hepatol 29:394–397

Caldwell J (1980) The metabolism of amphetamines and related stimulants in animals and man. In: Caldwell J (ed) Amphetamines and related stimulants: chemical, biological, clinical, and sociological aspects. CRC, Boca Raton, pp 29–46

Carmo H, de Boer D, Remião F, Carvalho F, Reys LA, Bastos ML (2002) Identification of 4-methylthioamphetamine and some of its metabolites in mouse urine by GC-MS after acute administration. J Anal Toxicol 26:228–232

Colado MI, Williams JL, Green AR (1995) The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. Br J Pharmacol 115:1281–1289

De Boer D, Egberts T, Maes RA (1999) Para-methylthioamphetamine, a new amphetamine designer drug of abuse. Pharm World Sci 21:47–48

De Letter EA, Coopman VA, Cordonnier JA, Piette MH (2001) One fatal and seven non-fatal cases of 4-methylthioamphetamine (4-MTA) intoxication: clinico-pathological findings. Int J Legal Med 114:352–356

Elliott SP (2000) Fatal poisoning with a new phenethylamine: 4-methylthioamphetamine (4-MTA). J Anal Toxicol 24:85–89

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (1999) Report on the risk assessment of 4-MTA in the framework of the joint action on new synthetic drugs. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Luxembourg

Fritz G, Hengstler JG, Kaina B (1997) High-dose selection with mafosfamide results in sensitivity to DNA cross-linking agents: characterization of hypersensitive cell lines. Cancer Res 57: 454–460

Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhöfer N, Meinert R, Arand M, Knapstein PG, Becker R, Oesch F, Tanner B (1999) Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIa to chemoresistance in ovarian cancer. Cancer Res 59:3206–3214

Hengstler JG, Ringel M, Biefang K, Hammel S, Milbert U, Gerl M, Klebach M, Diener B, Platt KL, Böttger T, Steinberg P, Oesch F (2000a) Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. Chem Biol Interact 125:51–73

Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Ringel M, Swales N, Biefang K, Platt KL, Diener B, Böttger T, Fischer T, Oesch F (2000b) Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. Drug Metab Rev 32:81–118

Huang X, Marona-Lewicka D, Nichols DE (1992) p-Methylthioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotonin-releasing agent. Eur J Pharmacol 229:31–38

Jones AL, Simpson KJ (1999) Review article: mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications. Aliment Pharmacol Ther 13:129–133

Jones AL, Jarvie DR, McDermid G, Proudfoot AT (1994) Hepatocellular damage following amphetamine intoxication. J Toxicol Clin Toxicol 32:435–444

Kavanagh PV, Corrigan D, Maguire RT, Meegan MJ, Keating JJ, Clancy J, Burdett J (1999) Excretion profile of 4-methylthioamphetamine in dogs. Pharm Pharmacol Commun 5:653–655

Li Q, Murakami I, Stall S, Levy AD, Brownfield MS, Nichols DE, Van de Kar LD (1996) Neuroendocrine pharmacology of three serotonin releasers: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino) butane (MBDB), 5-methoxy-6-methyl-2-aminoindan (MMAI) and p-methylthioamphetamine (MTA). J Pharmacol Exp Ther 279:1261–1267

Malpass A, White JM, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F (1999) Acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and dark Agouti Rats. Pharmacol Biochem Behav 64:29–34

Scorza MC, Carrau C, Silveira R, Zapata-Torres G, Cassels BK, Reyes-Parada M (1997) Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives. Biochem Pharmacol 54:1361–1369

Sporer KA (1995) The serotonin syndrome. Implicated drugs, pathophysiology and management. Drug Saf 13:94–104

Tucker GT, Lennard MS, Ellis SW, Woods HF, Cho AK, Lin LY, Hiratsuka A, Schmitz DA, Chu TY (1994) The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). Biochem Pharmacol 47:1151–1156

Winstock AR, Wolff K, Ramsey J (2002) 4-MTA: a new synthetic drug on the dance scene. Drug Alcohol Depend 67:111–115

World Health Organization (2001) WHO Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-second report. World Health Organ Tech Rep Ser 903:1–26

5.4. Trabalho IV

Hepatic metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) constructed by analysis with hepatocytes of six species including human

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
ELSEVIER
Toxicology 206 (2005) 75–89
TOXICOLOGY
www.elsevier.com/locate/toxicol

Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human

Helena Carmo[a,*], Jan G. Hengstler[b], Douwe de Boer[c], Michael Ringel[b], Fernando Remião[a], Félix Carvalho[a], Eduarda Fernandes[a], Lesseps A. dos Reys[c], Franz Oesch[b], Maria de Lourdes Bastos[a]

[a] *REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal*
[b] *Institute of Toxicology, University of Mainz, 55131 Mainz, Germany*
[c] *Laboratory of Doping Control, Institute of Sports Portugal, 1600-190 Lisbon, Portugal*

Received 1 June 2004; received in revised form 7 July 2004; accepted 9 July 2004
Available online 21 August 2004

Abstract

4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) is a psychoactive designer drug of abuse that is sold under the street names "Venus", "Bromo", "Erox", "XTC" or "Nexus". Concern has been raised because only little is known about its toxicity and metabolism in humans. In the present study we incubated 2C-B with human, monkey, dog, rabbit, rat and mouse hepatocytes to identify the metabolites formed and to determine possible toxic effects as evidenced by an ATP assay. Our data allow construction of the main metabolic pathways of 2C-B. Oxidative deamination results in the 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol (BDMPE) and 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid (BDMPAA) metabolites. Additionally, 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid (BDMBA) can be produced also by oxidative deamination. Further metabolism of BDMPE and BDMPAA may occur by demethylation. Alternatively, the later metabolites can be generated by demethylation of 2C-B followed by oxidative deamination. Two remarkable interspecies differences in metabolism of 2C-B were observed (i) a hitherto unknown metabolite, 4-bromo-2,5-dimethoxy-phenol (BDMP), was identified after incubation only with mouse hepatocytes; (ii) 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol (B-2-HMPE) was produced by hepatocytes from human, monkey and rabbit but not by dog, rat and

Abbreviations: 2C-B, 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine; BDMPE, 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol; BDMPAA, 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid; BDMBA, 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid; BDMP, 4-bromo-2,5-dimethoxy-phenol; B-2-HMPE, 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol; B-2-HMPAA, 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenylacetic acid; B-2-HMPEA, 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine; B-5-HMPEA, 4-bromo-5-hydroxy-2-methoxyphenethylamine; MBTFA, *N*-methylbis(trifluoroacetamide); TFAA, trifluoroacetic anhydride; MSTFA, *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide; TMSCl, trimethylsilylchloride; MAO, monoamine oxidase

* Corresponding author. Tel.: +351 222 078 22; fax: +351 222 003977.
E-mail address: helenacarmo@ff.up.pt (H. Carmo).

0300-483X/$ – see front matter © 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tox.2004.07.004

mouse. Comparing the toxic effects of 2C-B between hepatocytes of the six examined species we observed only minor interspecies differences. However, large inter-individual differences in susceptibility of hepatocytes from three human donors were observed.
© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: 2C-B; Designer drugs of abuse; Hepatic metabolism; Cryopreserved hepatocytes

1. Introduction

4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) is a psychoactive designer drug of abuse that is sold under the street names "Venus", "Bromo", "Erox", "XTC" or "Nexus". The effects of 2C-B combine both the amphetamine-like stimulating effects and the mescaline-like hallucinogenic effects. These effects are probably mediated by the serotonergic pathways, since data from animal studies have shown that it acts as a potential 5-HT_2 agonist and also as a α_1-adrenoceptor agonist (Glennon et al., 1988; Lobos et al., 1992). In humans, it is active at doses between 4 and 30 mg inducing euphoria and increased receptiveness of the visual, auditory, olfactory and tactile sensations (Giroud et al., 1998). Doses between 5 and 10 mg induce amphetamine-like stimulating effects while doses between 10 and 20 mg are required to obtain the hallucinogenic effects of the drug (de Boer et al., 1999a). Higher doses are known to cause frightening hallucinations and sympathomimetic effects such as tachicardia, hypertension and hyperthermia (Velea et al., 1999).

The abuse of 2C-B has been reported in Europe and also in the Unites States (Ragan et al., 1985; Giroud et al., 1997; Giroud et al., 1998; de Boer et al., 1999a) and therefore 2C-B has been recently recommended for international control (WHO, 2001). Although of great forensic and toxicological interest, little is known about the metabolism of this drug. Recent reports on the abuse of 2C-B and analogues in the Netherlands and in Japan denote the lack of knowledge on the metabolism of such compounds which may in turn lead to the inability to detect intoxications (Katagi and Tsuchihashi, 2002; de Boer and Bosman, 2004). A preliminary study in human metabolism has been reported in which some metabolites were described in urine samples of a male subject abusing 2C-B (de Boer et al., 1999b). In addition to the unchanged 2C-B, 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid (BDMPAA), 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid (BDMBA), and 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine (B-2-HMPEA) were excreted in the urine of this subject. In a recent in vivo study performed in the rat formation of BDMPAA, 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol (BDMPE), B-2-HMPEA, 4-bromo-5-hydroxy-2-methoxyphenethylamine (B-5-HMPEA), and the acetylated forms of B-2-HMPEA and B-5-HMPEA were reported (Kanamori et al., 2002).

In the present study we examined the metabolism and toxicity of 2C-B using fresh and cryopreserved human hepatocytes from three male donors and additionally cryopreserved hepatocytes from male (i) monkey (Cynomolgus), (ii) dog (Beagle), (iii) rabbit (Chinchilla), (iv) rat (Sprague-Dawley) and (v) mouse (CD1). We report formation of some yet unknown metabolites and construct the main metabolic pathways for 2C-B in humans and in five different animal species. The possible toxic effects as evidenced by an ATP assay were also studied.

2. Methods

2.1. Isolation, cryopreservation and thawing of hepatocytes

Isolation, cryopreservation and thawing of hepatocytes were performed as previously described in the standard operation procedures published by Hengstler et al. (2000b). Housing and experimental treatment of the animals were conducted under the European Community guidelines for the use of experimental animals (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, 1986, and Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, 1998).

2.2. Incubation of the hepatocytes with 2C-B

In this study we examined the hepatocytes of three human donors. From donor 1 (male; 60 years old) only cryopreserved hepatocytes were used. From

donor 2 (male; 62 years old) freshly isolated as well as cryopreserved hepatocytes were used to examine whether cryopreservation allowed a sufficient maintenance of drug metabolism. From donor 3 (male; 46 years old) only freshly isolated hepatocytes were used. Cryopreserved hepatocytes were used from three male Sprague-Dawley rats (Charles River, Sulzfeld, Germany; 200–300 g body weight). Three cryopreserved hepatocyte pools were obtained from 4–5 male CD1 mice (Charles River, Sulzfeld, Germany; 30–35 g body weight). Due to the relatively small number of approximately 60 million hepatocytes obtained from a single mouse, we pooled the hepatocytes from 4–5 mice to obtain each cryopreserved batch of mouse hepatocytes. Cryopreserved hepatocytes from three male Cynomolgus monkeys (Aventis, Germany; 9–10 months old), one male Rabbit (Chinchilla strain; Charles-River, Sulzfeld, Germany, 1500 g body weight) and one male Marshall Beagle dog (Merck, Darmstadt, Germany; 9–18 months old) were also used. After the hepatocytes isolation and/or thawing, the obtained hepatocytes suspensions were diluted to a cell density of 1 million cells per mL in suspension buffer consisting of 620 mL glucose-solution (50 mM D-glucose), 100 mL Krebs–Henseleit buffer (1 M NaCl, 24 mM KCl, and 12 mM KH_2PO_4; adjusted to pH 7.6 with 10 M NaOH), 100 mL HEPES buffer (250 mM HEPES; adjusted to pH 7.6 with NaOH), 150 mL amino acid solution (3.0 mM L-alanine, 1.0 mM L-aspartic acid, 3.0 mM L-asparagine, 1.5 mM L-citrulline, 0.8 mM L-cysteine, 6.4 mM L-histidine, 6.8 mM L-glutamic acid, 13.3 mM L-glycin, 3.0 mM L-isoleucine, 6.1 mM L-leucine, 7.1 mM L-lysine, 3.7 mM L-methionine, 3.8 mM L-ornithine, 3.3 mM L-phenylalanine, 4.8 mM L-proline, 6.2 mM L-serine, 11.3 mM L-threonine, 3.2 mM L-tryptophan, 3.0 mM L-tyrosine, 6.8 mM L-valine; amino acids that could not be dissolved at neutral pH were dissolved by addition of 10N NaOH at pH 11.0 and thereafter adjusted to pH 7.6 by 37% HCl), 10 mL glutamine solution (48 mM L-glutamine; freshly prepared), 5 mL; insulin solution (0.35 mM insulin dissolved with 1 N NaOH, adjusted to pH 7.6 by 1 M HCl; freshly prepared), 8 mL $CaCl_2$ solution (129 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 4 ml $MgSO_4$ solution (100 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) and 2 g/L bovine serum albumin that were dissolved in the mixture of the above mentioned solutions. These suspensions were then incubated with 2C-B (United Nations, Scientific Section, PDAB/DOA/UNDCP, Vienna, Austria) at a concentration of either 100 μM or 1000 μM for 3 h in a water bath kept at 37 °C with moderate shaking. All concentrations were calculated for the salt forms. Freshly isolated hepatocytes from human donors 2 and 3 were incubated with 100 μM and 1000 μM 2C-B. Cryopreserved hepatocytes from human donors 1 and 2 were incubated with 1000 μM 2C-B. Cryopreserved hepatocytes of monkeys 1 and 3 were incubated with 100 μM and 1000 μM 2C-B, whereas hepatocytes of monkey 2 were incubated with 1000 μM 2C-B. Cryopreseved hepatocytes of the single dog examined were incubated with 1000 μM 2C-B. Cryopreserved hepatocytes from the rabbit were incubated in three independent experiments with 100 μM and 1000 μM 2C-B. Cryopreserved hepatocytes from the three rats and mice hepatocyte pools were incubated with 100 μM and 1000 μM 2C-B. Solvent controls were also assayed by incubating 100 μM and 1000 μM 2C-B with only suspension buffer. After 3 h of incubation aliquots were taken from the hepatocytes suspensions for subsequent GC/MS analysis and/or ATP content determination. These samples were stored at −20 °C until ATP content determination or at −80 °C until GC/MS analysis.

2.3. *Isolation of compounds of interest for GC/MS analysis*

2.3.1. *Basic fraction*

Aliquots of 500 μL of hepatocyte suspensions spiked with 20 μg of phenylpropanolamine (internal standard) were transferred to a 25 mL tube and 500 μL of water were added. The pH value was adjusted to values smaller than pH 3.4 by addition of 37% HCl. The acidic compounds were extracted by adding 4 mL of mixture of *n*-hexane and ethyl acetate (10:1; v/v). The tube was vortex mixed for a few seconds, shaken for 10 min and centrifuged for 5 min at 1500 × *g*. The organic phase was discarded and the water phase was kept. This washing process was repeated and the organic solvent removed from the water phase under nitrogen stream.

To the remaining water phase containing the basic compounds 100 μL of 10 M KOH solution were added in order to obtain a pH > 13. The basic compounds were extracted by adding 4 mL of mixture of chloroform and 2-propanol (10:1; v/v). The tube was

vortex mixed for a few seconds, shaken for 30 min and centrifuged for 10 min at 1500 × *g*. The organic phase was transferred to a clean tube and the water phase was kept. This basic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed partially under a gentle nitrogen stream. An aliquot of 10 μL of *N*-methylbis(trifluoroacetamide) (MBTFA; Macherey-Nagel, Düren, Germany) was added to prevent the loss of volatile compounds, after which the evaporation process was completed. The obtained residue was dried under reduced pressure over P_2O_5 and KOH for at least 1 h.

2.3.2. Acidic fraction

Aliquots of 500 μL of hepatocyte suspensions spiked with 10 μg of ketoprofen (internal standard) were transferred to a 25 mL tube and 500 μL of water and 50 μL of 10 M KOH solution were added in order to obtain a pH > 13. The basic compounds were extracted by adding 4 mL of mixture of *n*-hexane and ethyl acetate (10:1; v/v). The tube was vortex mixed for a few seconds, shaken for 10 min and centrifuged for 5 min at 1500 × *g*. The organic phase was discarded and the water phase was kept. This washing process was repeated and the organic solvent removed from the water phase under nitrogen stream. The pH of the remaining aqueous phase containing the acidic compounds was adjusted to values smaller than 3.4 by addition of 37% HCl. The acidic compounds were extracted by adding 4 mL of mixture of chloroform and 2-propanol (10:1; v/v). The tube was vortex mixed for a few seconds, shaken for 30 min and centrifuged for 10 min at 1500 × *g*. The organic phase was transferred to a clean tube and the water phase was kept. This acidic extraction process was repeated twice and the organic phases were combined. The organic solvents were removed in a rotating evaporator. The obtained residue was dried under reduced pressure over P_2O_5 and KOH for at least 1 h.

2.4. Derivatizations for GC/MS analysis

2.4.1. N,O-TFA derivatization of the basic fraction

To the respective dry residue 50 μL of ethyl acetate and 50 μL of trifluoroacetic anhydride (TFAA; Janssen Chimica, Beerse, Belgium) were added. The mixture was heated for 30 min at 65 °C. After cooling to room temperature the excess of reagents was evaporated under a gentle stream of nitrogen. The obtained residue was dissolved in 100 μL of ethyl acetate and analysed by GC/MS. The reference spectrum and retention time of 2C-B were obtained after *N,O*-TFA derivatization of 2C-B standard.

2.4.2. N,O-TMS derivatization of the acidic fraction

To the respective dry residue 50 μL of a mixture of *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA; Macherey-Nagel, Düren, Germany) and trimethylsilylchloride (TMSCl; Macherey-Nagel, Düren, Germany) (95:5 v/v) were added. The mixture was heated at 80 °C for 30 min. After cooling to room temperature, the mixture was analysed by GC/MS. The reference spectrum of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid (BDMPAA) and retention time were obtained after *N,O*-TMS derivatization of BDMPAA standard (The Netherlands Institute of Drugs and Doping Research, Utrecht, The Netherlands).

2.5. GC/MS analysis

GC/MS analysis was performed on a Hewlett Packard 6890 Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) coupled to a Hewlett Packard 5971 Mass Selective Detector (Agilent Technologies). The gas chromatograph was equipped with a Hewlett Packard capillary column HP-1 (Agilent Technologies), 18 m long, 0.20 mm i.d. and 0.33 μm film thickness. A two level oven program was applied: the temperature was maintained at 100 °C for 1 min, programmed up to 300 °C at 15°/min and maintained at 300 °C for 20 min. The temperatures of the injection port and the transfer line were 250 and 310 °C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min. A sample volume of 2 μL was injected at a split ratio of 1:10. The Mass Selective Detector was operated in the Electron Ionization mode according the manufacturer's recommendations in the full scan range of *m/z* 50–600.

2.6. Determination of the ATP content

ATP content of the hepatocytes was determined as described previously (Fritz et al., 1997; Hengstler et

al., 1999b) using a commercially available kit (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Germany). Briefly, 150 μL of cell suspension containing 20,000 hepatocytes were lysed and extracted by gently mixing with 50 μL of extraction reagent (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Germany), into each well. The ATP concentration was measured 20–60 min later in a Berthold LB-953 luminometer using 50 μL of the hepatocyte suspension extract injected with 50 μL of the Luciferin-Luciferase reagent (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Germany). An ATP standard curve was performed using 50 μL aliquots of a 250 ng/mL ATP standard serially diluted 1:3 in dilution buffer. All samples were analysed in duplicate and mean values were used for further calculation. For each incubation period with 2C-B a control sample with hepatocytes was assayed. ATP content of these control samples were set to 100% to calculate the percentage of viability for the hepatocytes incubated with the test substance. For human, monkey and rabbit, hepatocytes from three independent experiments were analysed after incubation with 1000 μM 2C-B and mean values as well as standard deviations of the different individuals were calculated. For mouse, rat and dog only one batch of hepatocytes was analysed for ATP content.

3. Results

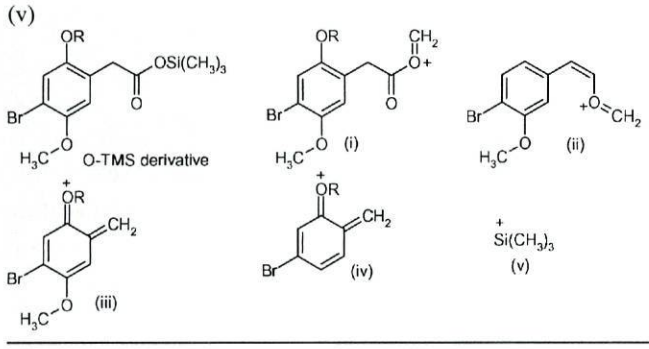
3.1. Identification of 2C-B metabolites in hepatocytes

The GC/MS spectra of the parent compound and metabolites identified in the present study are presented in Fig. 1A–F. Both the parent compound 2C-B and its main acidic metabolite BDMPAA were identified based on the retention time and mass spectrum relative to the analysis of the respective standards. The other metabolites were searched taking into account that bromine containing compounds show a characteristic pattern of their mass spectrum isotope peaks (2 ions with a very similar abundance and with a difference of 2 Da) and identified based on the characteristic fragmentations shown in their mass spectra.

The fragmentation pattern of the mass spectrum corresponding to the 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenylacetic acid (B-2-HMPAA) metabolite was compared with that of BDMPAA (Table 1). The same fragmentation pattern was found for both compounds and the fragments of the demethylated metabolite showed a shift of 58 Da corresponding to the difference between the mass of the *O*-TMS derivatized

Table 1
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivatives of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid (BDMPAA) and 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenylacetic acid (B-2-HMPAA) and general structure of the *O*-TMS derivatives and proposed relevant ions

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)			
	BDMPAA (R = CH_3)		B-2-HMPAA (R = $Si(CH_3)_3$)	
$M^{\bullet+}$	346 (21)	348 (21)	404 (12)	406 (13)
$[M\text{-}CH_3^{\bullet}]^+$	331 (6)	333 (6)	389 (2)	391 (2)
$[M\text{-}CH_2O^{\bullet}]^+$	316 (5)	318 (5)	374 (1)	376 (1)
(i)	287 (9)	289 (9)	345 (2)	347 (1)
(ii)	241 (5)	243 (5)	241 (1)	243 (1)
(iii)	229 (4)	231 (4)	287 (3)	289 (2)
(iv)	199 (4)	201 (4)	257 (5)	259 (5)
(v)	73 (100)		73 (100)	



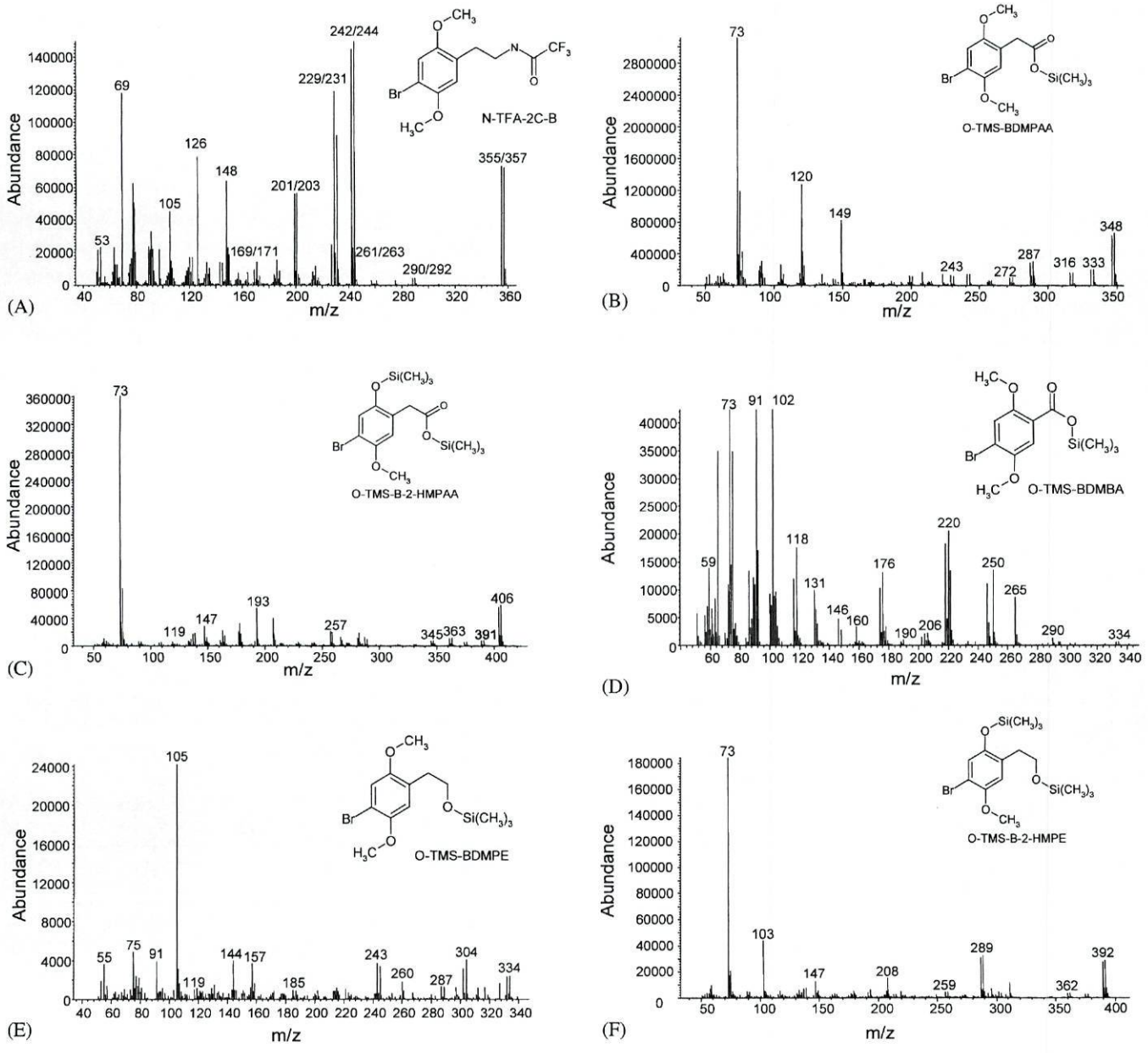


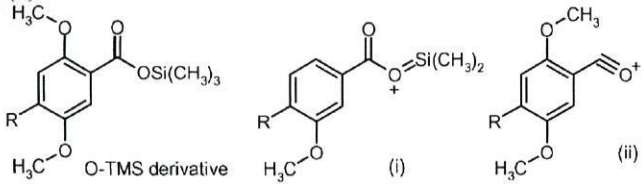
Fig. 1. Mass spectra of the metabolites identified in the present study: (A) *N*-TFA derivative of 2C-B; (B) *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylacetic acid (BDMPAA); (C) *O*-TMS derivative of 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenylacetic acid (B-2-HMPAA); (D) *O*-TMS derivative of 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid (BDMBA); (E) *O*-TMS derivative of 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol (BDMPE) and (F) *O*-TMS derivative of 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol (B-2-HMPE).

hydroxyl group and that of a methoxyl group. Theoretically it can be predicted that the 2-hydroxy-5-methoxy metabolite was observed rather than the 5-hydroxy-2-methoxy metabolite. This is based on the assumption that fragment (iii) presented in Table 1 can be explained by the formation of a stable quinonoid-like ion, which can only be formed in the case of the 2-hydroxy-5-methoxy metabolite (Pelah et al., 1963).

A peak showing a molecular ion at *m/z* 332/334 indicated the presence of BDMBA. A comparison of the fragmentation pattern of this metabolite with that of the 2,5-dimethoxybenzoic acid is presented in Table 2. The matching fragmentation pattern of both compounds and the shift of 78/80 Da corresponding to the difference between the mass of the bromine atom and that of a hydrogen atom, confirmed

Table 2
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivatives of 4-bromo-2,5-dimethoxybenzoic acid (BDMBA) and 2,5-dimethoxybenzoic acid (DMBA) and general structure of the *O*-TMS derivatives and proposed relevant ions

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)		
	BDMBA (R = Br)		DMBA (R = H)
$M^{\bullet+}$	332 (66)	334 (51)	254 (47)
$[M-CH_3^{\bullet}]^+$	317 (46)	319 (43)	239 (19)
$[M-CH_2O^{\bullet}]^+$	302 (100)	304 (100)	224 (100)
(i)	287 (29)	289 (32)	209 (30)
(ii)	243 (102)	245 (97)	165 (49)



that this brominated metabolite corresponded to the BDMBA.

Another two peaks showing the typical bromine isotope pattern were observed showing the molecular ion at *m/z* 332/334 and 390/392 and the presence of an ion at *m/z* 103, which is characteristic of *O*-TMS derivatives of primary alcohols (Halket, 1993). This suggested that these compounds could correspond to the neutral ethanol derivatives of 2C-B (BDMPE) and demethylated 2C-B (2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol; B-2-HMPE), respectively. A comparison of the fragmentation pattern of these two metabolites is presented in Table 3. The characteristic β-cleavage resulting in ions at *m/z* 229/231 and 287/289 has already been reported (Kanamori et al., 2002). Similarly to what was previously discussed for the B-2-HMPAA metabolite, it is theoretically predictable that the demethylated metabolite corresponds to the 2-hydroxy-5-methoxy metabolite (B-2-HMPE) rather than to the 5-hydroxy-2-methoxy metabolite since fragment (i) in Table 3 can only be formed in this case (Pelah et al., 1963).

A small peak was identified as the 4-bromo-2,5-dimethoxy-phenol (BDMP) metabolite. Its spectrum

Table 3
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivatives of 2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethanol (B-2-HMPE) and 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethanol (BDMPE) and general structure of the *O*-TMS derivatives and proposed relevant ions

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)			
	B-2-HMPE (R = $Si(CH_3)_3$)		BDMPE (R = CH_3)	
$M^{\bullet+}$	390 (11)	392 (12)	332 (23)	334 (22)
$[M-CH_3^{\bullet}]^+$	375 (1)	377 (1)	317 (6)	319 (5)
$[M-CH_2O^{\bullet}]^+$	360 (1)	362 (2)	302 (13)	304 (9)
(i)	287 (13)	289 (13)	229 (15)	231 (13)
(ii)	103 (21)		103 (34)	
(iii)	73 (100)		73 (100)	

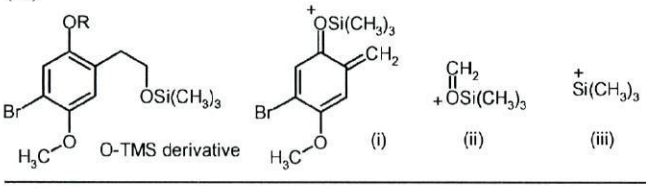
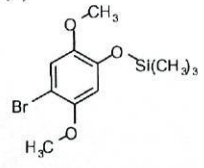
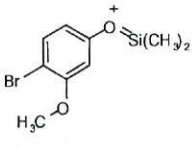
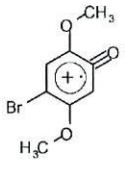
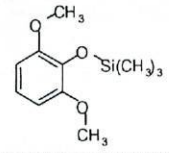
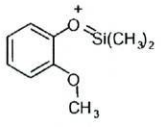
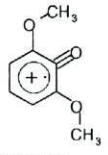


Table 4
Partial mass spectrometric characteristics of the *O*-TMS derivatives of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenol (BDMP) and 2,6-dimethoxyphenol (DMP) and general structure of the *O*-TMS derivatives and proposed relevant ions

Ion structure	Mass-to-charge ratios of molecular ions and fragments (relative intensity)		
	BDMP		2,6-DMP
$M^{\bullet+}$	304 (71)	306 (71)	226 (23)
$[M-CH_2O^{\bullet}]^+$	274 (100)	276 (100)	196 (100)
(i)	259 (33)	261 (33)	181 (11)
(ii)	231 (22)	233 (22)	153 (12)
 O-TMS derivative (BDMP)	 (i) (BDMP)	 (ii) (BDMP)	
 O-TMS derivative (DMP)	 (i) (DMP)	 (ii) (DMP)	

showed a matching fragmentation pattern with those of the isomers 2,6- and 3,5-dimethoxyphenol (Table 4) and was observed only in the chromatograms obtained with the mouse hepatocytes.

In addition to the metabolites discussed above, which were specifically formed by the hepatocytes we also observed two metabolites that were already spontaneously formed in the suspension buffer, namely the acetylated forms of 2C-B and B-2-HMPEA: 1-acetoamino-2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-ethane and 1-acetoamino-2-(4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-ethane, respectively. The results obtained so far about the individual metabolites can be used to construct the main metabolic pathways of 2C-B as demonstrated in Fig. 2.

3.2. Interspecies differences in metabolism of 2C-B

The metabolites BDMPAA, B-2-HMPAA, BDMBA and BDMPE were formed by hepatocytes of all species (Table 5). For some metabolites, for instance BDMBA in rat hepatocytes, discrepancies between individual animals were observed (Table 5). Most likely these inconsistent results are due to the very low formation of these metabolites close to the detection limit of our GC/MS method. For other metabolites interspecies differences were observed. B-2-HMPE was formed by human, monkey and rabbit hepatocytes but not by the dog, rat, and mouse (Table 5). BDMP was formed exclusively by mouse hepatocytes but not by hepatocytes of all other species examined (Table 5).

3.3. Toxic effects of 2C-B

3.3.1. Remarkable interindividual differences in human susceptibility to 2C-B toxicity

Hepatocytes of human, monkey, dog, rabbit, rat and mouse were incubated with 100 and 1000 μM 2C-B and toxicity was evaluated after 0, 1, 2 and 3 h of incubation by determination of the ATP content. A reduction in ATP content after incubation with 1000 μM 2C-B was observed for all species, whereas 100 μM 2C-B represents a non-toxic concentration (Fig. 3). Remarkable interindividual differences in susceptibility were observed between the three human donors as expressed by hepatocyte ATP content (Fig. 4). Clearly, donor 3 was much more susceptible compared to donors 1 and 2. There is no evidence that the higher toxicity observed for donor 3 is due to a bad quality of this batch of hepatocytes, since ATP content in the controls of donor 3 were similar when compared to the other donors.

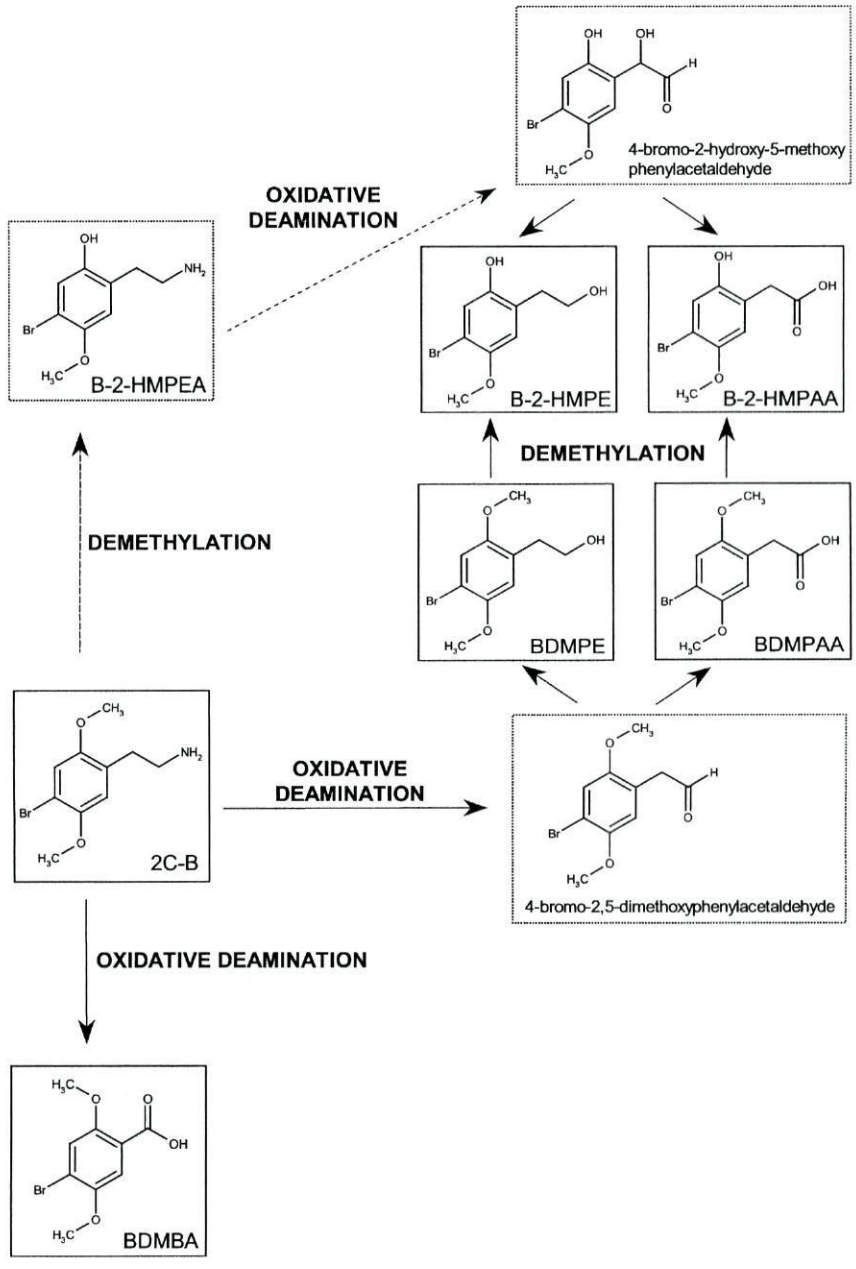


Fig. 2. Main metabolic pathways of 2C-B observed with the hepatocytes in the present study. Structures outlined with full-line rectangles correspond to metabolites identified in the present study; structures outlined with discontinuous-line rectangles correspond to possible intermediate metabolites not identified in the present study.

No major difference was observed between freshly and cryopreseved hepatocytes from donor 2.

3.3.2. Moderate interspecies differences in susceptibility to 2C-B toxicity

Only moderate interspecies differences were observed for 2C-B-induced toxicity to hepatocytes (Fig. 4). The most obvious difference was obtained with rabbit hepatocytes that after 3 h of incubation seemed to be more resistant than the other species examined. Data shown for dog, rat and mouse should be interpreted with caution because only one batch of hepatocytes has been studied for toxicity, in contrast to the experiments with human, monkey and rabbit hepatocytes where three batches of hepatocytes were analysed for ATP content.

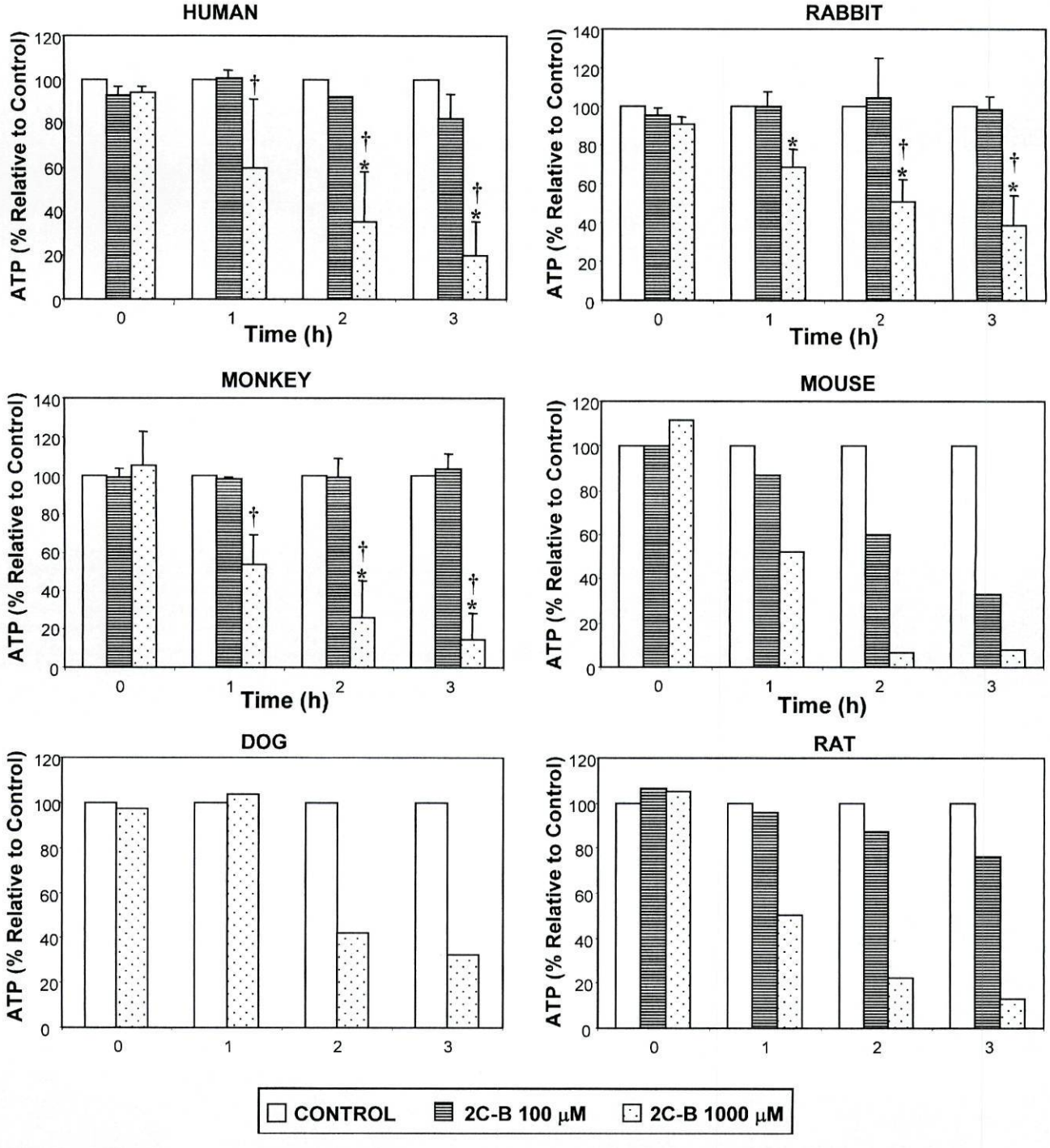


Fig. 3. Toxicity of 100 μM and 1000 μM 2C-B in hepatocytes of the six tested species after 0, 1, 2 and 3 h of incubation. Reduction in ATP content was used as a measure of toxicity to the hepatocytes. Data with human, monkey and rabbit are presented as mean ± S.D. from three independent experiments. Data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures, followed by the Scheffé test. *$P < 0.05$, compared to control and †$P<0.05$, compared to 1000 μM 2C-B at time 0 h. Hepatocytes from mouse, rat and dog were examined only once, since no major interspecies differences were obvious.

Table 5
Formation of 2C-B metabolites by human, monkey, rabbit, mouse, and dog hepatocytes after incubation with 100 μM and 1000 μM 2C-B

	Experiment*	2C-B (μM)											
		BDMPAA		B-2-HMPAA		BDMBA		BDMP		BDMPE		B-2-HMPE	
		100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
Human	Donor 3 (fresh)	+	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	–
	Donor 2 (fresh)	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	–
	Donor 2 (cryo)	nd	+	nd	+	nd	+	nd	–	nd	+	nd	–
	Donor 1 (cryo)	nd	+	nd	+	nd	+	nd	–	nd	+	nd	+
Monkey	1	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	–
	2	nd	+	nd	+	nd	–	nd	–	nd	+	nd	–
	3	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–	+	–
Rabbit	1	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+
	3	+	+	+	+	–	+	–	–	–	+	+	+
Rat	1	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–
	2	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–
	3	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
Mouse	1	+	+	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–
	2	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	–	–
	3	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	–	–
Dog		nd	+	nd	–	nd	+	nd	–	nd	+	nd	–
sb only		–	–	–	–	–	–						

nd: not determined; fresh: human freshly isolated hepatocytes; cryo: human cryopreserved hepatocytes.
* Hepatocytes from all species were cryopreserved except for human donors 2 and 3; sb: suspension buffer.

4. Discussion

2C-B is a designer drug of abuse structurally related to amphetamine and mescaline. Concern has been raised because 2C-B has been sold under the general name "Ecstasy", which may be critical because only little is known about its toxicity and metabolism in humans (Giroud et al., 1998).

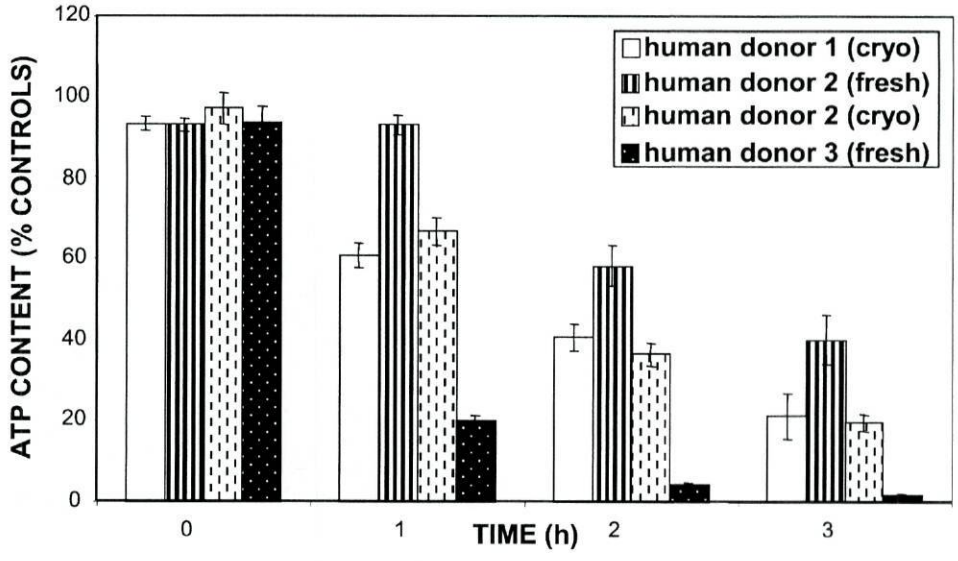


Fig. 4. Variability in ATP content observed with the human hepatocytes after 0, 1, 2 and 3 h of incubation with 1000 μM 2C-B. Data are presented as mean ± range of duplicate measurements for each sample.

In the present study we incubated human, monkey, dog, rabbit, rat and mouse hepatocytes with 2C-B to predict its in vivo metabolism. Recently, we have shown that in vitro systems with hepatocytes correctly predict in vivo metabolism of several substances (Hengstler et al., 1998; Hengstler et al., 1999a; Li et al., 1999; Steinberg et al., 1999; Hengstler et al., 2000a; Hengstler et al., 2000b; Ringel et al., 2002; Hengstler et al., 2003). After incubation of 2C-B with hepatocytes, six metabolites could be identified, namely BDMPAA, B-2 HMPAA, BDMBA, BDMPE, B-2-HMPE and BDMP. Two of these metabolites have already been observed in urine of a male individual who abused 2C-B namely, BDMPAA and BDMBA. The other metabolites, B-2-HMPAA, BDMPE and B-2-HMPE, were described as human metabolites for the first time in this study. Our analysis allows construction of the main metabolic pathways for 2C-B in humans (Fig. 2). A first step occurs as oxidative deamination resulting in the BDMPE and BDMPAA. It can be expected that this sequential reaction is catalysed by monoamine oxidase (MAO) producing an aldehyde intermediate that can be further oxidized to the phenylacetic acid metabolite (BDMPAA) or reduced to the ethanol metabolite (BDMPE). Although the aldehyde intermediate and the enzymes responsible for its formation have not been identified in our study, this mechanism is likely to occur because a similar pathway has already been described for the related compound mescaline (Kapadia and Fayez, 1970; Watanabe et al., 1995). Further metabolism of the BDMPE and BDMPAA may occur by demethylation, which is probably catalysed by a cytochrome P450 dependent reaction, although the involved isoforms were not identified. This metabolic pathway has been previously observed for other methoxylated amphetamine derivatives, in vitro (Zwieg and Castagnoli, 1975; Wu et al., 1997; Bach et al., 1999), and in vivo (Foster et al., 1993; Foster et al., 1995). Alternatively, these demethylated ethanol and phenylacetic acid metabolites, B-2-HMPE and B-2-HMPAA, may be generated by demethylation of 2C-B to B-2-HMPEA that can subsequently undergo oxidative deamination to the respective demethylated phenylacetic acid metabolite or ethanol metabolite. Although the intermediate B-2-HMPEA has not been identified in the present in vitro study, this metabolite has been previously observed in the urine of a human subject abusing 2C-B (de Boer et al., 1999b). Another metabolic pathway observed in this study is the oxidative deamination of 2C-B to the respective benzoic acid metabolite, BDMBA. It can be expected that this reaction is catalysed by a cytochrome P450 dependent reaction because a similar pathway has been observed with other amphetamines (Dring et al., 1970; Shiiyama et al., 1997; Yamada et al., 1997; Musshoff, 2000) and also with mescaline (Demisch and Seiler, 1975). Two remarkable interspecies differences in metabolism of 2C-B could be observed (Table 5): a hitherto unknown metabolite, namely BDMP, has been identified after incubation with mouse hepatocytes. This metabolite represents a major interspecies difference because it has not been identified after incubation of 2C-B with hepatocytes from all other species. Furthermore, B-2-HMPE has been produced by hepatocytes from human, monkey and rabbit but not by dog, rat and mouse.

In a previous study we investigated the metabolism of 2C-B in mice in vivo (Carmo et al., unpublished data). Since in the present in vitro study we included mouse hepatocytes of the same strain used in the in vivo study, this gave us the opportunity to determine how well our in vitro system correlates with the in vivo situation. Most metabolites that had been identified in vivo were also present in our in vitro study with hepatocytes namely, BDMPAA, B-2-HMPAA, BDMBA and BDMPE. However, discrepancies were observed with some metabolites. The conjugate of BDMPAA with glycine, 4-bromo-2,5-dimethoxyphenaceturic acid was not detected in vitro. However, it should be considered that metabolism in vivo was determined 24 h after administration of 2C-B, whereas the incubation period in vitro was only 3 h. Already in a previous study we observed that some conjugates that are formed with only low rates may be missed in short term incubations with hepatocytes (Hengstler et al., 2003). Also, the B-2-HMPE was not present in the mouse hepatocyte suspensions. It is likely that the amounts formed by the hepatocytes over the 3 h of incubation were not sufficient to allow detection with our GC/MS method. In addition, the in vitro incubations did not produce some hydroxylated metabolites found in vivo. However, it should be considered that at least one of these hydroxylated metabolites namely, the β-hydroxylated derivative of 2C-B is formed cell type specifically in sympathetic neurons (Baldessarini, 1972 and references therein; Caldwell, 1980). The other hydroxylated metabolite not found in vitro was B-2-HMPEA. However, B-2-HMPEA is an

intermediate of the metabolic pathway finally leading to B-2-HMPAA, whereby the later was detectable in all three experiments with mouse hepatocytes. The most probable explanation of this scenario is that mouse hepatocytes formed B-2-HMPEA by an only relatively low rate, whereas further metabolism to B-2-HMPAA was relatively efficient thus, leading to steady state levels of B-2-HMPEA that were below the detection limit of our GC/MS method. In contrast to the study in mice a much more complete pattern of metabolites was obtained by human hepatocytes in vitro compared to a recently published in vivo study (de Boer et al., 1999b). For instance, B-2-HMPAA, BDMPE and B-2-HMPE were detected after incubation with human hepatocytes but could not be found in the urine of a male subject abusing 2C-B (de Boer et al., 1999b). However, human in vivo studies with intoxicated individuals have the limitation that an ideal sampling after optimal exposure periods cannot be established. This demonstrates the high value of studies with human hepatocytes when systematic in vivo metabolism studies cannot be performed in humans, which is the case for drugs of abuse.

A result of possible high relevance was obtained when we studied the susceptibility of human hepatocytes to toxic effects of 2C-B. Interestingly, one of the three human donors was found to be much more susceptible. After 2 h of incubation with 1000 μM 2C-B the ATP content of hepatocytes from human donors 1, 2 and 3 were reduced to 41%, 58% and 5% of the controls, respectively. Further studies with hepatocytes of larger numbers of individuals must be performed to corroborate these preliminary findings. Nevertheless, our data suggest that human subpopulation(s) may exist that has a higher risk for 2C-B-induced toxicity. This is a similar constellation to that recently observed with another designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA) (Carmo et al., 2004). In this later study we also observed a strongly increased sensitivity in hepatocytes of a human donor. A high degree of variation in susceptibility to the toxicity of other amphetamine-like designer drugs has already been reported (Tucker et al., 1994; Colado et al., 1995; Jones and Simpson, 1999 and references therein; Malpass et al., 1999).

In contrast to the observed relatively large inter-individual differences in humans, interspecies differences in 2C-B-induced toxicity were relatively small. The toxicity results observed with the animal species tested were very homogeneous. It seems therefore reasonable to assume that such large variations in susceptibility occur mostly in the human situation where a genetic variability is more likely to be noticed. The rabbit seems to be slightly more resistant than the other species examined. This is also in agreement with the toxicity studies performed with another designer drug 4-MTA (Carmo et al., 2004) which was also less toxic to rabbit hepatocytes than to human and monkey hepatocytes.

In conclusion, we have elucidated the human metabolism of 2C-B. 2C-B is metabolised by oxidative deamination and demethylation resulting in the major metabolites BDMPAA, B-2-HMPAA, BDMBA, BDMPE, B-2-HMPE and BDMP. Identification of one batch of human hepatocytes with relatively high susceptibility to 2C-B-induced toxicity suggests the possible existence of human subpopulation(s) having an increased risk when exposed to this drug.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação Para a Ciência e a Tecnologia (Praxis XXI/BD/20088/99), by a project of FCT/POCTI/FEDER European Community funding (POCTI/36099/FCB/2000) and by the BMBF. The authors wish to thank the United Nations, Scientific Section, PDAB/DOA/UNDCP for generously providing 2C-B hydrochloride and The Netherlands Institute of Drugs and Doping Research, Utrecht, for generously providing 2,5-dimethoxyphenylacetic acid and the reference spectrum of the *O*-TMS derivative of the 2,5-dimethoxybenzoic acid. The authors wish to thank Renate Santos for excellent technical assistance and helpful discussion.

References

Bach, M.V., Coutts, R.T., Baker, G.B., 1999. Involvement of CYP2D6 in the in vitro metabolism of amphetamine, two N-alkylamphetamines and their 4-methoxylated derivatives. Xenobiotica 29, 719–732.

Baldessarini, R.J., 1972. Symposium: Behavior modification by drugs I. Pharmacology of the amphetamines. Pediatrics 49, 694–701.

Caldwell, J., 1980. The metabolism of amphetamines and related stimulants in animals and man. In: Caldwell, J. (Ed.), Amphetamines and Related Stimulants: Chemical, Biological, Clinical, and Sociological Aspects. CRC Press, Boca Raton, pp. 29–46.

Carmo, H., Hengstler, J.G., de Boer, D., Ringel, M., Carvalho, F., Fernandes, E., Remião, F., Reys, L.A., Oesch, F., Bastos, M.L., 2004. Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 369, 198–205.

Colado, M.I., Williams, J.L., Green, A.R., 1995. The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. Br. J. Pharmacol. 115, 1281–1289.

de Boer, D., Bosman, I., 2004. A new trend in drugs-of-abuse; the 2C-series of phenethylamine designer drugs. Pharm. World Sci. 26, 110–113.

de Boer, D., Gijzels, M.J., Bosman, I.J., Maes, R.A.A., 1999a. More data about the new psychoactive drug 2C-B. J. Anal. Toxicol. 23, 227–228.

de Boer, D., Reys, L.A., Pylon, N., Gijzels, M., Bosman, I.J., Maes, R.A.A., 1999b. Preliminary results on the urinary excretion of 2C-B (4-bromo-2 5-dimethoxyphenethylamine) and its metabolites in humans. Br. J. Pharmacol. 127, 41.

Demisch, L., Seiler, N., 1975. Oxidative metabolism of mescaline in the central nervous system—V. In vitro deamination of mescaline to 3,4,5-trimethoxy-benzoic acid. Biochem. Pharmacol. 24, 575–580.

Dring, L.G., Smith, R.L., Williams, R.T., 1970. The metabolic fate of amphetamine in man and other species. Biochem. J. 116, 425–435.

Foster, B.C., Litster, D.L., Buttar, H.S., Dawson, B., Zamecnik, J., 1993. Biotransformation and urinary excretion of 4-substituted amphetamines in pregnant mice. Biopharm. Drug Dispos. 14, 709–719.

Foster, B.C., Wilson, D.L., Cyr, T.D., Moffatt, J., Buttar, H.S., 1995. The influence of pregnancy on the biotransformation and urinary excretion of methoxyphenamine in mice. Biopharm. Drug Dispos. 16, 1–11.

Fritz, G., Hengstler, J.G., Kaina, B., 1997. High-dose selection with mafosfamide results in sensitivity to DNA cross-linking agents: characterization of hypersensitive cell lines. Cancer Res. 57, 454–460.

Giroud, C., Augsburger, M., Rivier, L., Mangin, P., Sadeghipour, F., Varesio, E., Veuthey, J.L., Kamalaprija, P., 1998. 2C-B: a new psychoactive phenylethylamine recently discovered in ecstasy tablets sold on the Swiss black market. J. Anal. Toxicol. 22, 345–354.

Giroud, C., Augsburger, M., Sadeghipour, F., Varesio, E., Veuthey, J.L., Rivier, L., 1997. Ecstasy-the situation in the French part of Switzerland: composition of the seized drugs, analysis of biological specimens and short review of its pharmacology and toxicology. Praxis 86, 510–523.

Glennon, R.A., Titeler, M., Lyon, R.A., 1988. A preliminary investigation of the psychoactive agent 4-bromo-2 5-dimethoxyphenethylamine: a potential drug of abuse. Pharmacol. Biochem. Behav. 30, 597–601.

Halket, J.M., 1993. Derivatives for gas chromatography-mass spectrometry. In: Blau, K., Halket, J.M. (Eds.), Handbook of Derivatives for Chromatography. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 297–325.

Hengstler, J.G., Arand, M., Herrero, M.E., Oesch, F., 1998. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results Cancer Res. 154, 47–85.

Hengstler, J.G., Bogdanffy, M.S., Bolt, H.M., Oesch, F., 2003. Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43, 485–520.

Hengstler, J.G., Burg, B.V.d., Steinberg, P., Oesch, F., 1999a. Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. Drug Metab. Rev. 31, 917–970.

Hengstler, J.G., Lange, J., Kett, A., Dornhöfer, N., Meinert, R., Arand, M., Knapstein, P.G., Becker, R., Oesch, F., Tanner, B., 1999b. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIa to chemoresistance in ovarian cancer. Cancer Res. 59, 3206–3214.

Hengstler, J.G., Ringel, M., Biefang, K., Hammel, S., Milbert, U., Gerl, M., Klebach, M., Diener, B., Platt, K.L., Böttger, T., Steinberg, P., Oesch, F., 2000a. Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. Chem. Biol. Interact. 125, 51–73.

Hengstler, J.G., Utesch, D., Steinberg, P., Ringel, M., Swales, N., Biefang, K., Platt, K.L., Diener, B., Böttger, T., Fischer, T., Oesch, F., 2000b. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. Drug Metab. Rev. 32, 81–118.

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.

Kanamori, T., Inoue, H., Iwata, Y., Ohmae, Y., Kishi, T., 2002. In vivo metabolism of 4-bromo-2 5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in the rat: identification of urinary metabolites. J. Anal. Toxicol. 26, 61–66.

Kapadia, G.J., Fayez, M.B., 1970. Peyote constituents: chemistry, biogenesis, and biological effects. J. Pharm. Sci. 59, 1699–1727.

Katagi, M., Tsuchihashi, H., 2002. Update on clandestine amphetamines and their analogues recently seen in Japan. J. Health Sci. 48, 14–21.

Li, A.P., Gorycki, P.D., Hengstler, J.G., Kedderis, G.L., Koebe, H.G., Rahmani, R., Sousas, G., Silva, J.M., Skett, P., 1999. Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. Chem. Biol. Interact. 121, 117–123.

Lobos, M., Borges, Y., Gonzalez, E., Cassels, B., 1992. The action of the psychoactive drug 2C-B on isolated rat thoracic aorta. Gen. Pharmacol. 23, 1139–1142.

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.

Musshoff, F., 2000. Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. Drug Metab. Rev. 32, 15–44.

Pelah, Z., Wilson, J.M., Ohashi, M., Budzikiewicz, H., Djerassi, C., 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical prob-

lems - XXXIV. Aromatic methyl and ethyl ethers. Tetrahedron 19, 2233–2240.

Ragan, J.F.A., Hite, S.A., Samuels, M.S., Garey, R.E., 1985. 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine: Identification of a New Street Drug. J. Anal. Toxicol. 9, 91–93.

Ringel, M., Oesch, F., Bader, A., Gerl, M., Klebach, M., Quint, M., Tanner, B., Dillenburg, W., Böttger, T., Hengstler, J.G., 2002. Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte cultures. Xenobiotica 32, 653–666.

Shiiyama, 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.

Steinberg, P., Fischer, T., Kiulies, S., Biefang, K., Platt, K.-L., Oesch, F., Böttger, T., Bulitta, C., Kempf, P., Hengstler, J.G., 1999. Drug metabolizing capacity of cryopreserved human, rat and mouse liver parenchymal cells in suspension. Drug Metab. Dispos. 27, 1415–1422.

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., 1994. The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). Biochem. Pharmacol. 47, 1151–1156.

Velea, D., Hautefeuille, M., Vazeille, G., Lantran-Davoux, C., 1999. Nouvelles drogues synthétiques empathogènes. L'Encéphale XXV, 508–514.

Watanabe, K., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Yoshimura, H., 1995. 3,4,5-Trimethoxyphenylacetaldehyde, an intermediate metabolite of mescaline, is a substrate for microsomal aldehyde oxygenase in the mouse liver. Biol. Pharm. Bull. 18, 696–699.

World Health Organization (WHO), 2001. WHO Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-second report. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 903, 1–26.

Wu, D., Otton, S.V., Inaba, T., Kalow, W., Sellers, E.M., 1997. Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. Biochem. Pharmacol. 53, 1605–1612.

Yamada, H., Shiiyama, S., Soejima-Ohkuma, T., Honda, S., Kumagai, Y., Cho, A.K., Oguri, K., Yoshimura, H., 1997. Deamination of amphetamines by cytochromes P450: studies on substrate specificity and regioselectivity with microsomes and purified CYP2C subfamily isozymes. J. Toxicol. Sci. 22, 65–73.

Zwieg, J.S., Castagnoli, J.N., 1975. Metabolic O-demethylation of the psychotomimetic amine 1-(2 5-dimetroxy-4-methylphenyl)-2-aminopropane. Psychopharmacol. Commun. 1, 359–371.

5.5. Trabalho V

Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity

Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity

Helena Carmo[a], Marc Brulport[c], Matthias Hermes[c], Franz Oesch[g], Renata Silva[a], Luísa M. Ferreira[b], Paula S. Branco[b], Douwe de Boer[h], Fernando Remião[a], Félix Carvalho[a], Michael R. Schön[d], Niels Krebsfaenger[e], Johannes Doehmer[f], Maria de Lourdes Bastos[a] and Jan G. Hengstler[c]

Objectives **Remarkable interindividual differences in 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-mediated toxicity have been reported in humans. Therefore, we tested whether CYP2D6 or its variant alleles as well as CYP3A4 influence the susceptibility to 3,4-methylenedioxymethamphetamine.**

Methods **3,4-Methylenedioxymethamphetamine cytotoxicity was determined in V79 cells expressing human wild-type CYP2D6 (CYP2D6*1), the low-activity alleles CYP2D6*2, *9, *10, and *17, as well as human CYP3A4. Metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine formed by the different cell lines were quantified by high-performance liquid chromatography/electrochemical detector.**

Results **Toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine was clearly increased in cells expressing CYP2D6*1 compared with the parental cells devoid of CYP-dependent enzymatic activity. Toxicity in V79 CYP2D6*1 cells was also higher than in V79 cell lines expressing the low-activity alleles CYP2D6*2, *9, *10, or *17. In contrast to CYP2D6, the CYP3A4 isoenzyme did not enhance 3,4-methylenedioxymethamphetamine toxicity. Formation of the oxidative 3,4-methylenedioxymethamphetamine metabolite *N*-methyl-α-methyldopamine was greatly enhanced in V79 cell line transfected with CYP2D6*1 compared to all other cell lines. The increase in the cytotoxic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine observed in this cell line was therefore suspected to be a consequence of the production of this metabolite. This was further investigated by testing the cytotoxicity of *N*-methyl-α-methyldopamine to the control cell line. The results confirmed our hypothesis as the metabolite proved to be more than 100-fold more toxic than the parent compound 3,4-methylenedioxymethamphetamine.**

Conclusions **CYP2D6*1 mediates 3,4-methylenedioxymethamphetamine toxicity via formation of *N*-methyl-α-methyldopamine. Therefore, it will be important to investigate whether CYP2D6 ultrarapid metabolizers are overrepresented in the cases of 3,4-methylenedioxymethamphetamine intoxications.** *Pharmacogenetics and Genomics* **16:789–799 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins.**

Pharmacogenetics and Genomics 2006, 16:789–799

Keywords: CYP2D6, Ecstasy toxicity, metabolism, polymorphism, 3,4-methylenedioxymethamphetamine

[a]REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, [b]REQUIMTE/CQFB, Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, University Nova of Lisboa, Monte de Caparica, Portugal, [c]Centre for Toxicology, [d]Department of Surgery, University of Leipzig, Leipzig, [e]Schwarz Biosciences GmbH, Department of Pharmacology and Toxicology, Monheim, [f]GenPharmTox BioTech AG, D-Planegg/Martinsried, [g]Institute of Toxicology, University of Mainz, Mainz, Germany and [h]Department of Clinical Chemistry, University Hospital Maastricht, Maastricht, The Netherlands.

Correspondence and requests for reprints to Helena Carmo, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal.
Tel: +351222078979; fax: +351222003977; e-mail: helenacarmo@ff.up.pt

Sponsorship: This work was supported by Fundação Para a Ciência e a Tecnologia (POCI/SAU-FCF/57187/2004), by REQUIMTE Associated Laboratory, by a CRUP/DAAD grant (reference A-5/04) and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF), funding priority HepatoSys, Systems Biology of the Hepatocyte.

Received 18 April 2006 **Accepted** 22 June 2006

Introduction

The recreational use of the psychoactive drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'), specially among youth, has been recognized as one of the most significant trends in drug abuse over the past decades. MDMA is a ring-substituted amphetamine derivative and is a potent releaser and/or reuptake inhibitor of presynaptic serotonin, dopamine, and norepinephrine. [1–3]. MDMA abuse is due to the intense feelings of euphoria, friendliness, comfort, intimacy, pleasure, empathy, and hyperactivity induced by the drug [4]. Misuse of MDMA can induce severe acute toxic effects that are in part related to its pharmacological actions and include, severe hepatotoxicity, multiorganic failure, tachycardia, hypertension, hyperthermia, myocardial ischaemia, psychosis, cerebral haemorrhage, and

1744-6872 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins

the serotonin syndrome (increased muscle rigidity, hyperreflexia, and hyperthermia), which can ultimately lead to death [3,5–9]. Long-term toxicity is also worrisome because chronic abuse has been linked to neurotoxicity with impairment of the serotonergic function [2,4,10–15].

The rates of 'Ecstasy'-related deaths and emergency department visits for overdose and unexpected reactions seem to have peaked in recent years [16]. Despite its widespread use however, the number of MDMA-related deaths and severe intoxications is relatively low [17] and therefore, MDMA is commonly misrepresented among its users as being safe. It is known that there is an interindividual variation in the propensity to the adverse effects of MDMA. Some individuals have died after ingestion of a single tablet, whereas others have survived after high doses of MDMA, suffering only mild sympathetic symptoms such as tachychardia and hypertension [5,18,19].

It has been increasingly acknowledged that the toxic effects of MDMA are not only related to high plasma levels of the drug [7] but also to the metabolism. MDMA oxidative metabolism (Fig. 1) consists mainly of demethylenation to the highly reactive catechol metabolites *N*-methyl-α-methyldopamine (*N*-Me-α-MeDA) and α-methyldopamine (α-MeDA) that are *O*-methylated by catechol-*O*-methyltransferease (COMT) and/or conjugated with glucoronide or sulphate prior to excretion [2,20–22]. *N*-dealkylation of MDMA leads to the formation of the corresponding primary amine 3,4-methylenedioxyamphetamine that retains pharmacological action [23]. Parallel side-chain degradation pathway leads to the formation of oxidatively deaminated metabolites [21] that are excreted as their benzoic derivatives (hippuric acids) [20,24]. *In vivo* studies in the rat have revealed a third metabolic route via aromatic hydroxylation leading to the production of potentially neurotoxic trihydroxyamphetamines [25,26]. CYP2D6 is the main enzyme involved in the demethylation of MDMA [27–29], although other CYP isoenzymes may contribute to the total oxidative metabolism, namely CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 [20,29]. Increasing evidence exists that the oxidative metabolites may play a significant role in the mechanisms underlying the toxic effects of MDMA [12,30–39].

CYP2D6 activity shows a very high degree of interindividual variability, which is primarily due to genetic polymorphism that influences both enzyme expression and function [40]. The *CYP2D6* gene is highly polymorphic, with 58 alleles and more than 100 distinct variants listed so far at the CYPallele nomenclature homepage http://www.imm.ki.se/CYPalleles/. A marked interethnic variability exists in the allele frequencies among populations and some of the variants are 'population-specific', such as *CYP2D6*10* in Orientals and *CYP2D6*17* in Black Africans [41]. CYP2D6 protein and enzymatic activity is completely absent in less than 1% of Asians and up to 10% of Caucasians as a result of the expression of null alleles that encode a nonfunctional protein product. These individuals are termed poor metabolizers [40]. Among the extensive metabolizers, the enzyme activity is highly variable and can be markedly reduced in intermediate metabolizers (heterozygous for a normal and a deficient allele). The frequency of the intermediate metabolizer phenotype was estimated to be around 10–15% of the European population [40]. At the other extreme, the ultrarapid metabolizers phenotype can be caused by alleles carrying multiple gene copies [42]. The frequency of these alleles is markedly high in Ethiopian and Saudi Arabian populations and up to 5% of the Caucasians present this phenotype [40].

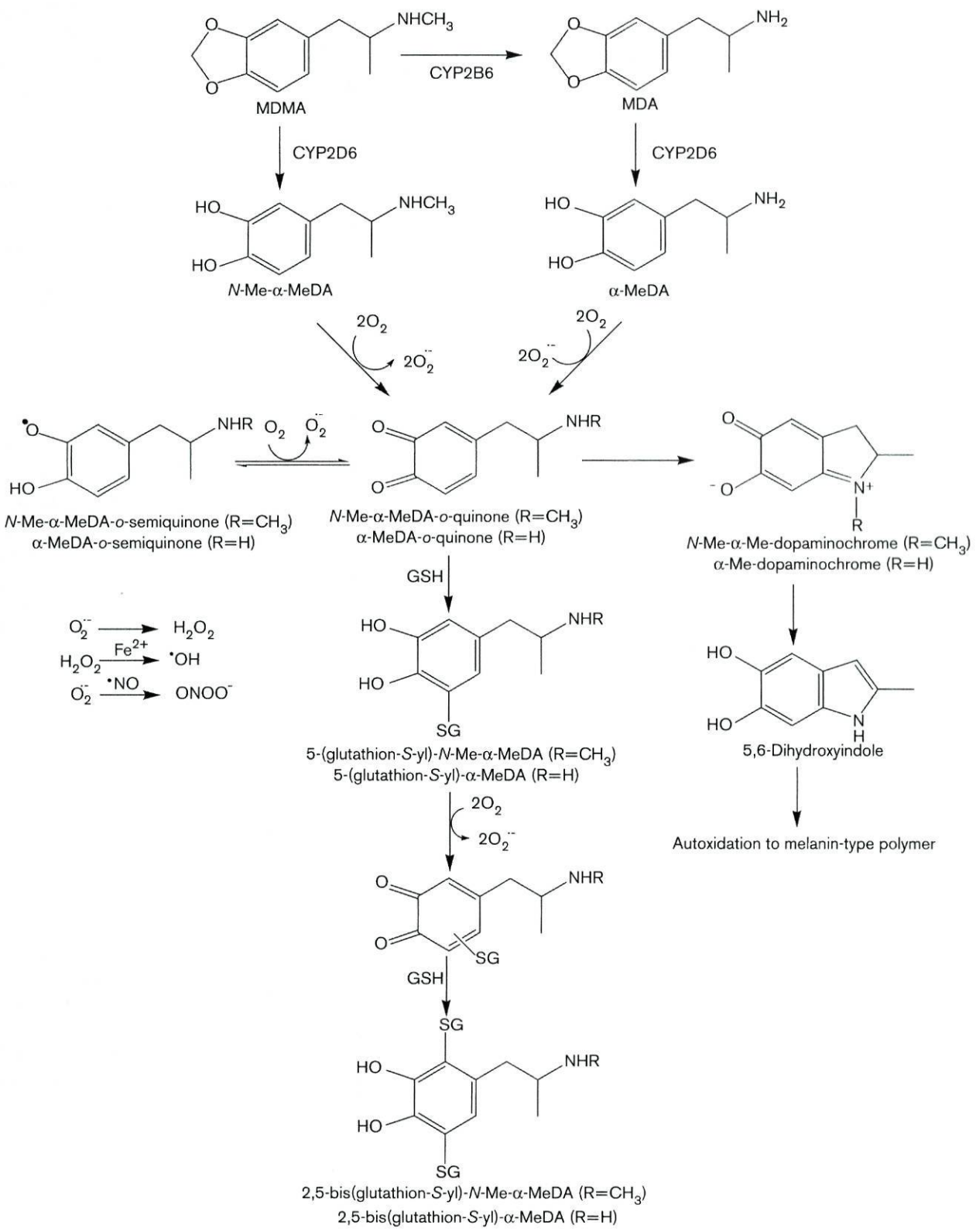
Evidence of pharmacokinetic changes in MDMA and its oxidative metabolites owing to pharmacogenetic-related deficiency in CYP2D6 has been given both by *in vitro* [27,28] and very recently by *in vivo* studies in humans [43]. The consequences of these pharmacokinetic changes on the toxicity induced by MDMA are, however, still to be determined. Therefore, we tested MDMA cytotoxicity in a battery of genetically engineered Chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines expressing the human CYP2D6 allelic variants *1 (wild-type), *2, *9, *10, and *17 (reduced activity alleles) and in a V79 cell line expressing human CYP3A4. The aim of the present study was to determine whether the CYP2D6 genotype influences MDMA cytotoxicity and, if so, to identify the responsible metabolites.

Materials and methods

Materials

Reagents for cell culture were obtained from Cambrex Bio Science (Walkersville, Maryland, USA): Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 g/l glucose, with L-glutamine, without sodium pyruvate; DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), trypsin (2.5%), penicillin (10 000 U/ml)–streptomycin (10 mg/ml) mixture; fetal bovine serum. MDMA (HCl salt) was extracted and purified from high-purity MDMA tablets that were provided by the Portuguese Criminal Police Department. The obtained salt was pure and fully characterized by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry methodologies. *N*-methyl-α-methyldopamine (HBr salt) was synthesized by REQUIMTE/CQFB, Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Universidade Nova de Lisboa as previously described [30]. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA) and were of the highest grade commercially available.

Fig. 1



Oxidative metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). MDMA is demethylated to 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in a reaction primarily catalysed by CYP2B6 and to a minor extent by CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4. Demethylation to the highly reactive catechol metabolites *N*-methyl-α-methyldopamine (*N*-Me-α-MeDA) and α-MeDA is the major metabolic route for MDMA. CYP2D6 is the main enzyme involved in the demethylation of MDMA, although CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 may also contribute substantially to this reaction. The catechols are readily oxidized into the corresponding *O*-quinones that can enter redox cycles with their semiquinone radicals originating reactive oxygen species and reactive nitrogen species, conjugate with glutathione (GSH), or further oxidize into aminochromes through cyclization and polymerize leading to melanin type polymers.

Cell culture

Chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines were obtained from Professor Johannes Doehmer and Dr Niels Krebsfaenger, GenPharmTox BioTech AG, Martinsried, and were previously characterized for stable expression, activity, and CYP content [44]. A total number of eight cell lines were tested. Two of these cell lines served as controls. The parental cell line consisted of nontransfected cells. An additional control was made by using a mock-transfected cell line that carries the selective marker for neomycin resistance (mockneo). Both control cell lines have no CYP-dependent enzymatic activity. The transfected cell lines were designated according to the corresponding cDNA: CYP2D6*1, CYP2D6*2, CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*17, and CYP3A4.

The cells were cultured in 75 cm^2 flasks and the cell cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2/95% air. The cell culture medium was DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (100 U/100 μg/ml). The cell cultures were routinely passaged every 48 h before reaching confluence. All the assays were performed on at least three separate occasions, during different culture passages, and each test substance concentration was tested in triplicate in each experiment.

Cloning efficiency assay

All cell lines were assayed before the cultures reached 100% confluence. A cellular suspension was obtained by adding a 0.25% trypsin/1 mmol/l ethylene diaminetetraacetic acid solution to the cell culture flasks followed by a 2-min incubation at 37°C and suspension of the cells in cell culture medium. The cells were then counted and cultured in cell culture dishes at a density of 200 cells/dish/9 ml DMEM and left for 4 h at 37°C. The solutions of the test drugs were freshly prepared in PBS and were sterile filtered. For each concentration a 10 × concentrated solution was prepared and 1 ml of this solution was added to the cell culture dishes. For the control incubations, 1 ml of PBS was added (solvent control). After 24 h of exposure to the test substance, the cell culture medium was removed and replaced with 10 ml of fresh DMEM and the cells were kept in culture for another 7 days. Finally, the cell colonies were fixed with an ice-cold mixture of ethanol/acetone (1:1), stained with a 10% aqueous solution of Giemsa blue dye, and the number of colonies was counted. The number of colonies, expressed as a percent of the corresponding value of the solvent control incubations, was used as a measure of cytotoxicity.

Metabolism experiments

Cultures over 80% confluence were incubated with 1 mmol/l MDMA during 24 h at 37°C. Before adding the test substance, the cell culture medium was removed. Nine milliliters of fresh medium were added and 1 ml of a freshly prepared 10 mmol/l stock solution of MDMA (HCl salt; dissolved in PBS and sterile filtered). Solvent control cultures were incubated with the same volume of PBS. After the incubation period, the cell culture medium was removed and kept at −20°C until analysis.

High-performance liquid chromatography-ultraviolet/electrochemical detector analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and metabolites

The quantification of MDMA and its metabolite 3,4-methylenedioxyamphetamine in the cell culture media was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), with ultraviolet detection as previously described [45]. The screening of potential MDMA metabolites was performed using a gas chromatography with mass detection methodology previously developed and reported [46,47].

The identification and/or quantification of the oxidative metabolites were performed in an HPLC equipped with an electrochemical detector (ECD). The samples were extracted by alumina according to the following protocol. Aliquots of 1 ml of the cell culture media were added to clean tubes containing 50 mg of alumina and pH was adjusted to 8.6 with 1.5 mol/l Tris/15 mmol/l ethylene diaminetetraacetic acid buffer (pH 8.6). The tubes were vigorously shaken during 15 min. After that time, the supernatant was removed with vacuum and the remaining alumina was washed twice with ice-cold water. The last fraction was transferred into microtubes packed with a 0.2-μm filtrating membrane and centrifuged at 2000*g* for 3 min. The alumina was extracted with 300 μl of 0.2 mol/l perchloric acid and the microtubes were centrifuged at 2000*g* for 3 min. Aliquots of 100 μl were then injected into the HPLC–ECD. HPLC analysis was performed using a Waters 2690 separations module (Waters, Milford, Massachusetts, USA) and a Waters Spherisorb RP-18 (5 μm) column. A Colouchem II (ESA, Chelmsford, Nebraska, USA) equipped with a guard cell (ESA 5020) and analytical cell (ESA 5011A) electrochemical detector was used. The electrochemical potential settings of the Colouchem II multidetector were: guard cell + 0.50 V, detector 1 –0.075 V, and detector 2 + 0.4 V. A current of 1–5 μA full-scale was used. A Compaq computer fitted with Millenium software (Waters) processed the chromatographic data. The mobile phase (50 mmol/l citric acid, 0.46 mmol/l 1-octanesulphonic acid, and 15% methanol, adjusted to pH 3.0) was filtered through a 0.45-μm membrane (Millipore, Madrid, Spain) and degassed under a helium stream. An isocratic elution was performed at a flow rate of 1.0 ml/min, at room temperature. Standard curves were obtained with appropriate standards. The method validation showed that precision, accuracy, and recovery were all within the accepted values for these parameters.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± SEM. For all the experiments, data were obtained from at least three representative experiments performed independently. The means were compared by one-way analysis of variance followed by the Bonferroni's multiple comparison post-hoc test, using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). Significance was accepted at a *P*-value of less than 0.05. Details of the statistical analyses are described in each figure legend.

Results

CYP2D6*1 and CYP2D6*10 increase 3,4-methylenedioxymethamphetamine cytotoxicity in V79 cells

In a first step, we compared the cytotoxicity of MDMA in V79 cells transfected with CYP2D6*1, CYP2D6*2, CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*17, and CYP3A4 to the parental cell line (V79 parental) and to V79 cells transfected with a neomycin resistance gene (V79 mock-neo). Notably, cytotoxicity was increased in V79 cell lines expressing the wild-type CYP2D6*1 enzyme (Fig. 2a). CYP2D6*1 caused a 75% decrease in colony formation, which was significantly higher than the control cell lines (36% for parental cells and 25% for mockneo cells) after incubation with 2 mmol/l MDMA. Besides V79 CYP2D6*1, only the cell line transfected with the variant CYP2D6*10 enzyme showed a significant decrease in viability (64%) compared with the control cells (Fig. 2d). CYP2D6*2, CYP2D6*9, and CYP2D6*17 did not increase susceptibility to MDMA (Fig. 2b,c and e). Similarly, CYP3A4 did not influence MDMA toxicity (Fig. 2f). In conclusion, the highest MDMA toxicity was observed in cells expressing CYP2D6 wild-type (CYP2D6*1).

CYP2D6*1 catalyses formation of the oxidative 3,4-methylenedioxymethamphetamine metabolite *N*-methyl-α-methyldopamine

Given the highest susceptibility of the most metabolically active cell line V79 CYP2D6*1 we studied the hypothesis that cytotoxic metabolites may be formed by CYP2D6*1. A pilot study was conducted in which all V79 cell lines were tested concerning formation of MDMA metabolites. After a 24-h incubation period with a nontoxic concentration of 1 mmol/l MDMA, the cell culture media were analysed by HPLC/ultraviolet and gas chromatography with mass detection to identify potential metabolites. Only the *N*-Me-α-MeDA oxidative metabolite could be identified. Interestingly, its production was highest in the CYP2D6*1 cell line. Low levels of *N*-Me-α-MeDA formation could also be observed in all other cell lines tested, including the parental and mockneo control cell lines that is in accordance with the previous reports of its spontaneous formation also in absence of enzymatic catalysis [20,48]. The CYP3A4 transfected V79 cell line produced an amount of *N*-Me-α-MeDA similar to that found in the control cell lines and was not further tested.

In order to quantify *N*-Me-α-MeDA, the V79 control cell lines and all V79 cell lines transfected with the different CYP2D6 variants were incubated with MDMA in three independent experiments and the metabolite was quantified by HPLC/ECD. Besides *N*-Me-α-MeDA no further oxidative metabolites were identified, including the glutathione and *N*-acetylcystein conjugates that can be detected by the applied HPLC/ECD technique. *N*-Me-α-MeDA formation was greatly enhanced in the CYP2D6*1 cell line (Fig. 3). Although the V79 cell lines transfected with the less active variants CYP2D6*9, CYP2D6*10, and CYP2D6*17 produced more metabolite than the control cell lines, the corresponding amounts were significantly lower than that of the wild-type variant. The amount of *N*-Me-α-MeDA produced by the V79 cell lines transfected with CYP2D6*2 was similar to that observed in the control cell lines.

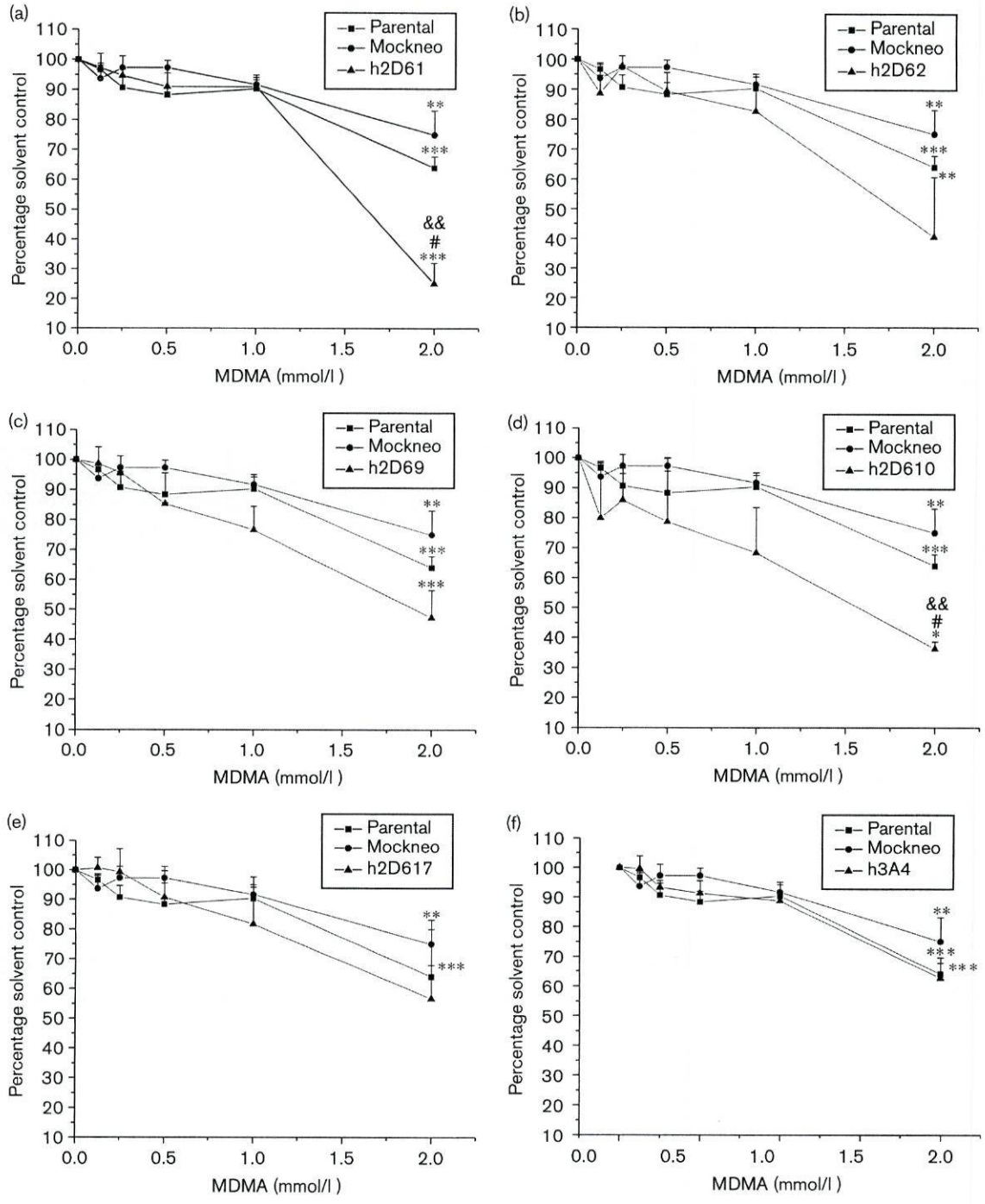
N-methyl-α-methyldopamine is at least 100-fold more cytotoxic than 3,4-methylenedioxymethamphetamine

Given the enhanced production of *N*-Me-α-MeDA in the wild-type CYP2D6*1 cell line, we then tested the cytotoxicity of this metabolite under our experimental conditions in order to determine whether this metabolite was in fact responsible for the cytotoxic effects observed with the parent compound MDMA. For this purpose, we performed a cloning efficiency assay using the V79 mockneo control cell line and incubated this cell line with different concentrations of *N*-Me-α-MeDA (0–100 µmol/l) for 24 h. Furthermore, a control incubation with 1 mmol/l MDMA was included into the experiment. Our data showed that the metabolite was at least 100-fold more toxic than MDMA, with 100% lethality induced by the extremely low concentration of 20 µmol/l *N*-Me-α-MeDA (Fig. 4). At the 100 µmol/l of *N*-Me-α-MeDA concentration, the formation of the characteristic melanin-type polymers with a dark brown/black colour resulting from the further oxidation of the catechols and their respective *O*-quinones was observed. At 10 µmol/l *N*-Me-α-MeDA, a toxic effect could already be observed in contrast to the 100-fold higher nontoxic concentration of MDMA. It therefore seems likely that the increased cytotoxicity towards the V79 CYP2D6*1 cells is due to the enhanced production of this highly reactive metabolite.

Discussion

Remarkable interindividual differences in amphetamine-like drugs, including MDMA, mediated toxicity have been reported [5,18,19,49,50]. Therefore, we tested whether CYP2D6 or its variant alleles as well as CYP3A4 may explain differences in MDMA susceptibility by using V79 Chinese hamster cell lines genetically engineered for the expression of human CYP enzymes. This in-vitro system is known to have a high predictive value for humans in the testing of CYP2D6 polymorphisms

Fig. 2

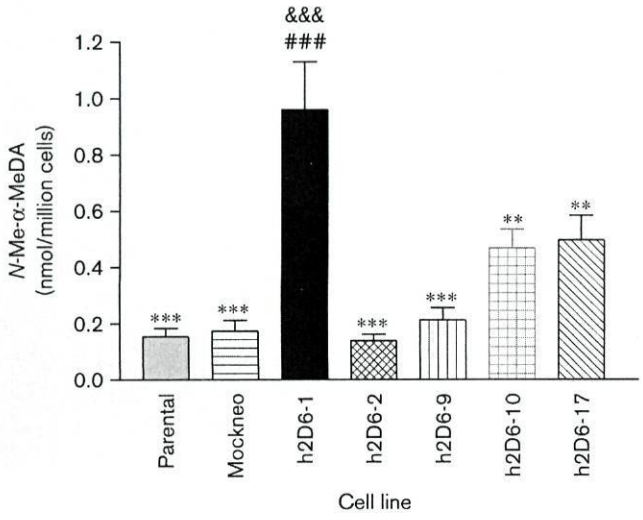


3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cytotoxicity towards the V79 cell lines as evaluated by the cloning efficiency assay. The number of colonies expressed as percent of the corresponding value of the solvent control incubations was used as a measure of cytotoxicity (% Solvent control). Each of the V79 cell lines transfected with the variant CYP enzymes [CYP2D6*1 (h2D61); CYP2D6*2 (h2D62); CYP2D6*9 (h2D69); CYP2D6*10 (h2D610); CYP2D6*17 (h2D617); and CYP3A4 (h3A4)] were compared with the parental and mockneo control cell lines (a–f). Data are means ± SEM and were obtained from three independent experiments. The means were compared by one-way analysis of variance followed by the Bonferroni's multiple comparison post-hoc test. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$ compared with solvent control. $^{\#}P<0.05$ compared with parental control cell line. $^{\&\&}P<0.05$ compared with mockneo control cell line.

[44,51–53]. Currently, there are no reliable *in vivo* models available that would accurately reflect the human CYP2D6 situation [44,54].

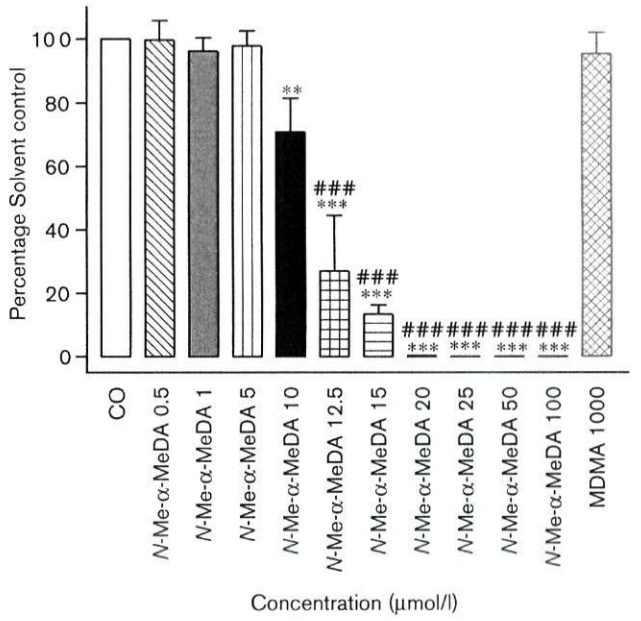
We compared the cytotoxicity of MDMA in V79 cells expressing human wild-type CYP2D6 (CYP2D6*1) or the low-activity alleles CYP2D6*2, *9, *10, or *17. Interest-

Fig. 3



Quantification of the metabolite *N*-methyl-α-methyldopamine (*N*-Me-α-MeDA) formed by the V79 cell lines transfected with the CYP2D6 variant enzymes and by the parental and mockneo control cell lines in cell culture medium by high-performance liquid chromatography/electrochemical detector. Data are means ± SEM and were obtained from three independent experiments. The means were compared by one-way analysis of variance followed by the Bonferroni's multiple comparison post-hoc test. $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$ compared with V79 CYP2D6*1 cell line (h2D6-1). $^{\#\#\#}P<0.001$ compared with parental control cell line. $^{\&\&\&}P<0.001$ compared with mockneo control cell line.

Fig. 4



N-methyl-α-methyldopamine (*N*-Me-α-MeDA) cytotoxicity towards the V79 mockneo control cell line as evaluated by the cloning efficiency assay. The number of colonies expressed as percentage of the corresponding value of the solvent controls was used as a measure of cytotoxicity (% solvent control). Data are means ± SEM and were obtained from at least three independent experiments. The means were compared by one-way analysis of variance followed by the Bonferroni's multiple comparison post-hoc test. $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$ compared with solvent control. $^{\#\#\#}P< 0.001$ compared with 1 mmol/l MDMA.

ingly, toxicity of MDMA was clearly increased in cells expressing CYP2D6*1 compared with the parental cells devoid of CYP-dependent enzymatic activity. Toxicity in V79 CYP2D6*1 cells was also higher than V79 cell lines expressing the low-activity alleles CYP2D6*2, *9, *10, or *17. In contrast to CYP2D6, the CYP3A4 isoenzyme did not enhance MDMA toxicity. Formation of the oxidative MDMA metabolite *N*-Me-α-MeDA was greatly enhanced in the wild-type CYP2D6*1-transfected cell line compared with all other cells. The increase in the cytotoxic effects of MDMA observed in this cell line was therefore suspected to be a consequence of the production of this metabolite. This was further investigated by testing the cytotoxicity of *N*-Me-α-MeDA to the control cell line that does not express cytochrome P450 enzymes. The results confirmed our hypothesis as the metabolite proved to be more than 100-fold more toxic than the parent compound MDMA under the same experimental conditions.

The role of CYP2D6 in MDMA toxicity has been discussed controversially. The hypothesis that poor metabolizers may be at increased risk of acute intoxication came from the assumption that the severity of the toxic effects induced by MDMA correlates with the serum concentrations of the parent drug [7]. These data were obtained from patients admitted to emergency departments with mild-to-severe and even fatal intoxications. In such cases, it is difficult to determine both the amount ingested and the time after ingestion at which the blood sample is collected for analysis. Therefore, the significance of the MDMA blood concentration becomes difficult to interpret and to compare between different individuals. Results from a controlled clinical trial do not support this correlation as the cardiovascular parameters measured after the administration of two different MDMA doses did not differ [55]. Accordingly, in a clinical trial in which MDMA was administered twice with a 24-h interval between doses, the increase in MDMA concentrations in the blood observed after the second dose did not produce an increase in the physiological effects of the expected magnitude [56], indicating that other factors beyond plasma concentration of the parent drug play a role in the induction of acute effects.

Three patients admitted in emergency rooms owing to MDMA-related hepatotoxicity and diagnosed for toxic hepatitis were genotyped for CYP2D6 alleles. They were all identified as extensive metabolizers. The development of hepatotoxicity was attributed only to MDMA intoxication as other possible causes were ruled out, including MDMA-induced hyperthermia [9]. The

authors concluded that CYP2D6 deficiency was not related to MDMA-induced hepatotoxicity. In the light of our findings and as we have previously shown that the MDMA metabolites induce toxicity to freshly isolated rat hepatocytes [33,34], it can be postulated that CYP2D6 is producing the hepatotoxic species rather than contributing to detoxification through MDMA plasmatic clearance. In fact, the *in vitro* studies in freshly isolated rat hepatocytes have shown that the toxicity of the metabolites was much higher than MDMA under the same experimental settings [33,34]. Similarly, the oxidative metabolites of MDMA were much more potent inducers of cardiotoxicity to freshly isolated rat cardiomyocytes when compared with the parent drug [35]. When comparing the nephrotoxicity induced by MDMA, α-Me-DA and its glutathione (GSH) mono and bis-conjugate in human renal cells, the same potentiation of toxicity was observed for the metabolites [36]. This suggests that the acute effects of MDMA intoxications may also be produced by the metabolites and do not depend entirely upon MDMA high plasma concentrations.

According to our study, the key metabolite of CYP2D6-mediated MDMA toxicity seems to be *N*-Me-α-MeDA. *N*-Me-α-MeDA has been previously observed *in vitro* in rat hepatocytes and rat cardiomyocytes [34,35]. The mechanism underlying *N*-Me-α-MeDA toxicity involves the reactivity of the catechol moiety of the molecule that can be easily oxidized to the corresponding *O*-quinone (Fig. 1). Further REDOX cycling occurs generating reactive oxygen species and reactive nitrogen species (RNS). Therefore, adding to the direct deleterious actions of the quinones that can react with cellular nucleophiles such as sulphhydryl groups, including free cysteine, GSH and cysteinyl residues on proteins, toxicity may arise from the generation of reactive oxygen species and RNS that cause oxidative stress through the formation of oxidized cellular macromolecules, including lipids, proteins, and DNA [57,58]. *N*-Me-α-MeDA also depletes intracellular GSH [34,35], a major endogenous antioxidant, and therefore renders the cells more susceptible to the effects of the reactive compounds generated by these metabolic reactions. *O*-quinones can conjugate with GSH to form a glutathionyl adduct that remains redox-active and is subsequently oxidized to a quinone thioether that after the reductive addition of a second molecule of GSH yields a bis-glutathionyl conjugate [59,60]. Further oxidation of the *O*-quinones also results in the formation of aminochromes [61] that are in turn oxidized and lead to melanin-type polymers with a dark brown/black colour [62]. A similar turbidity in the cell culture media of the cells incubated with *N*-Me-α-MeDA occurred in our study. The formation of such polymers is believed to occur only when the antioxidant defence system of the cell is significantly compromised. Additionally, *N*-Me-α-MeDA, *O*-quinones, and the aminochromes subsequently formed can inhibit the activity of important enzymes involved in the cellular antioxidant defence, namely, glutathione reductase, glutathione peroxidase, and glutathione-*S*-transferase [34,63,64]. *N*-Me-α-MeDA also depletes ATP [34], which combined with the disturbance in the thiol homeostasis may contribute to mitochondrial dysfunction and disruption of cellular energetics.

The *in vivo* relevance of the cytotoxicity exerted by these oxidative metabolites has been previously demonstrated. Increasing evidence exists that the oxidative metabolism of MDMA catalysed by CYP2D6 is determinant for its neurotoxicity [12,30–32]. CYP2D6 occurs in the human brain [40] and MDMA demethylenation has been shown in rat brain microsomes [65]. Furthermore, *N*-Me-α-MeDA can cross the blood–brain barrier as it was detected in the brain of mice after peripheral administration [39]. *In vitro* studies in rat cortical neurons have shown that α-MeDA and *N*-Me-α-MeDA cause neurotoxicity [30]. Furthermore, MDMA-induced reactive species (ROS, RNS) formation in the brain may also play a significant role in the mechanisms underlying the neurotoxic effects of the drug [10,11,60]. Additionally, the metabolite *N*-Me-α-MeDA has been shown to induce hyperthermia in mice [39], another serious and potentially fatal acute effect of MDMA intoxications.

MDMA metabolic clearance has been studied using reconstituted microsomes expressing the variant CYP2D6 alleles *1, *2, *10, and *17 [28,66]. The authors observed that the wild-type CYP2D6*1 allele displayed the highest intrinsic clearance for MDMA. This observation fits well to our study, demonstrating that CYP2D6*1 has a higher capacity to form the oxidative MDMA metabolite *N*-Me-α-MeDA compared with CYP2D6*2, *9, *10, and *17.

To our knowledge, this is the first study addressing the consequences of the polymorphic expression of human CYP2D6 on MDMA-induced toxicity *in vitro*. In the light of our findings, we hypothesize that individuals with higher metabolic capacity for CYP2D6 may in fact be at a higher risk of intoxication when compared with the poor metabolizers. It would be of great interest to investigate whether the ultrarapid metabolizers phenotype (up to 5% of the Caucasians) characterized by multiple CYP2D6 gene copies is overrepresented in the cases of MDMA intoxications. According to our results, this may be more relevant than genotyping of the most common deficient alleles that has already been performed in previous studies [9,19,67].

The concentrations of MDMA used in the present study are in the range of concentrations used in several mechanistic in-vitro studies [30,34,35,68,69]. They are

Table 1 Blood and tissue concentrations found at autopsy in methylenedioxymethamphetamine-related intoxications

	Blood		Liver		Kidney		Brain
References	mg/l (μmol/l)	μg/g	Ratio liver/blood	μg/g	Ratio kidney/blood	μg/g	Ratio brain/blood
[70,72]	3.10 (16.0)	26.20	8.5	13.9	4.5	17.4	5.6
[70]	1.13 (5.8)	6.66	5.9	4.06	3.6		
[18,70]	0.27 (1.4)	4.87	18.0	1.85	6.9	0.86	3.2
[18,70]	13.51 (69.9)	103.5	7.7	155.29	11.5		
[73]	7.2[a] (37.3)	29.7	4.1			29.1	4.0
[71]	3.18 (16.5)	4.86	1.5				
[71]	0.28 (1.45)	5.13	18.3			8.42	30.1

[a]mg/kg.

higher than concentrations commonly found in human abusers. It should be noted that high interindividual variations of MDMA blood levels in cases of severe and even fatal intoxications have been observed. Blood concentrations can be as high as 13.5 mg/l (approximately 70 μmol/l) [18,70]. In such cases, the autopsy findings have shown that the tissue levels of the drug in the liver can be up to 18 times higher than blood concentrations [70] and 30 times higher in the brain [71]. Table 1 [18,70–73] shows some examples of reported blood and tissue concentrations of MDMA found in victims of MDMA-related fatal intoxications. Moreover, these concentrations found at autopsy are probably lower than the peak concentrations that are expected to occur after drug intake, especially in the cases where the victims are submitted to emergency-care treatments to control the intoxications.

Several studies provide evidence that *N*-Me-α-MeDA is a major metabolite *in vivo*. Levels of *N*-Me-α-MeDA in humans may reach similar concentrations as the parent compound MDMA [43,74]. Moreover, there are other CYP enzymes that may contribute to the formation of this metabolite *in vivo* namely, CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 [20,29]. It should also be noted that acute MDMA administration leads to a massive release of catecholic neurotransmitters. Under these conditions, catecholic metabolites originating from the oxidative metabolism of MDMA may not be efficiently detoxified by COMT or sulphotransferases. This is perhaps of even greater importance for individuals who have a genetically based deficiency in these enzymes. A single nucleotide polymorphism in the *COMT* gene encodes for high-activity and low-activity forms. Approximately 25% of the Caucasian population presents lower COMT activity because of the homozygous expression of the alleles encoding a 50–60% lower catalytically active enzyme [75]. The same consideration can be made in relation to human sulphotransferases that conjugate the catechol metabolites of MDMA [20] and are also polymorphically expressed [76,77]. Therefore, a rare combination of genotypes for different metabolic enzymes must not be overlooked as a possible explanation for the rare but dramatic acute MDMA intoxications.

In conclusion, we have shown that CYP2D6*1 mediates higher levels of MDMA toxicity than CYP2D6*2, *9, *10, and *17 as well as CYP3A4. The key metabolite for CYP2D6*1-mediated MDMA toxicity seems to be the highly toxic *N*-Me-α-MeDA that is formed at higher levels by wild-type CYP2D6 compared with the studied allelic variants.

References

1 Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy'). *Pharmacol Rev* 2003; **55**:463–508.

2 de la Torre R, Farre M, Navarro M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S. Clinical pharmacokinetics of amfetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**:157–185.

3 de la Torre R, Farre M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, *et al.* Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. *Ther Drug Monit* 2004; **26**:137–144.

4 Parrott AC. Human psychopharmacology of Ecstasy (MDMA): a review of 15 years of empirical research. *Hum Psychopharmacol* 2001; **16**:557–577.

5 Henry JA, Jeffreys KJ, Dawling S. Toxicity and deaths from 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). *Lancet* 1992; **340**:384–387.

6 Brauer RB, Heidecke CD, Nathrath W, Beckurts KT, Vorwald P, Zilker TR, *et al.* Liver transplantation for the treatment of fulminant hepatic failure induced by the ingestion of ecstasy. *Transpl Int* 1997; **10**:229–233.

7 Greene SL, Dargan PI, O'connor N, Jones AL, Kerins M. Multiple toxicity from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). *Am J Emerg Med* 2003; **21**:121–124.

8 Jones AL, Simpson KJ. Review article: mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; **13**:129–133.

9 Schwab M, Seyringer E, Brauer RB, Hellinger A, Griese EU. Fatal MDMA intoxication. *Lancet* 1999; **353**:593–594.

10 Colado MI, O'Shea E, Granados R, Murray TK, Green AR. 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* 1997; **121**:889–900.

11 Colado MI, Williams JL, Green AR. The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br J Pharmacol* 1995; **115**:1281–1289.

12 Gollamudi R, Ali SF, Lipe G, Newport G, Webb P, Lopez M, *et al.* Influence of inducers and inhibitors on the metabolism in vitro and neurochemical effects in vivo of MDMA. *Neurotoxicology* 1989; **10**:455–466.

13 McCann UD, Szabo Z, Scheffel U, Dannals RF, Ricaurte GA. Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ('Ecstasy') on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* 1998; **352**:1433–1437.

14 McCann UD, Eligulashvili V, Ricaurte GA. (±)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies. *Neuropsychobiology* 2000; **42**:11–16.

15 Morgan MJ. Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology* 2000; **152**:230–248.

16 Schifano F. A bitter pill. Overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities. *Psychopharmacology* 2004; **173**:242–248.

17 Green AR. MDMA: fact and fallacy, and the need to increase knowledge in both the scientific and popular press. *Psychopharmacology* 2004; **173**:231–233.

18 de Letter EA, Bouche MP, Bocxlaer JFV, Lambert WE, Piette MH. Interpretation of a 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities. *Forensic Sci Int* 2004; **141**:85–90.

19 O'Donohoe A, O'Flynn K, Shields K, Hawi Z, Gill M. MDMA toxicity: no evidence for a major influence of metabolic genotype at CYP2D6. *Addict Biol* 1998; **3**:309–314.

20 Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T, Peters FT. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'). *Toxicol Lett* 2000; **112–113**:133–142.

21 Lim HK, Foltz RL. Identification of metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in human urine. *Chem Res Toxicol* 1989; **2**:142–143.

22 de la Torre R, Farre M, Ortuno J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, *et al.* Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2000; **49**:104–109.

23 Johnson M, Letter AA, Merchant K, Hanson GR, Gibb JW. 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* 1988; **244**:977–982.

24 Maurer HH. On the metabolism and the toxicological analysis of methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs by gas chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 1996; **18**:465–470.

25 Zhao ZY, Castagnoli NJ, Ricaurte GA, Steele T, Martello M. Synthesis and neurotoxicological evaluation of putative metabolites of the serotonergic neurotoxin 2-(methylamino)-1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl] propane [(methylenedioxy)methamphetamine]. *Chem Res Toxicol* 1992; **5**:89–94.

26 Lim HK, Foltz RL. In vivo formation of aromatic hydroxylated metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification by ion trap tandem mass spectrometric (MS/MS and MS/MS/MS) techniques. *Biol Mass Spectrom* 1991; **20**:677–686.

27 Tucker GT, Lennard MS, Ellis SW, Woods HF, Cho AK, Lin LY, *et al.* The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem Pharmacol* 1994; **47**: 1151–1156.

28 Ramamoorthy Y, Yu A, Suh N, Haining RL, Tyndale RF, Sellers EM. Reduced (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') metabolism with cytochrome P450 2D6 inhibitors and pharmacogenetic variants in vitro. *Biochem Pharmacol* 2002; **63**:2111–2119.

29 Kreth K, Kovar K, Schwab M, Zanger UM. Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of 'Ecstasy'-related designer drugs. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**:1563–1571.

30 Capela JP, Meisel A, Abreu AR, Branco PS, Ferreira LM, Lobo AM, *et al.* Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **316**:53–61.

31 Easton N, Fry J, O'Shea E, Watkins A, Kingston S, Marsden CA. Synthesis, in vitro formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy). *Brain Res* 2003; **987**:144–154.

32 Jones DC, Duvauchelle C, Ikegami A, Olsen CM, Lau SS, de la Torre R, *et al.* Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **313**:422–431.

33 Carvalho M, Milhazes N, Remiao F, Borges F, Fernandes E, Amado F, *et al.* Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch Toxicol* 2004; **78**:16–24.

34 Carvalho M, Remiao F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Carvalho F, *et al.* The toxicity of *N*-methyl-alpha-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and *N*-acetylcysteine. *Toxicology* 2004; **200**:193–203.

35 Carvalho M, Remiao F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Monteiro M, *et al.* Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chem Res Toxicol* 2004; **17**:623–632.

36 Carvalho M, Hawksworth G, Milhazes N, Borges F, Monks TJ, Fernandes E, *et al.* Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol* 2002; **76**:581–588.

37 Hartung TK, Schofield E, Short AI, Parr MJ, Henry JA. Hyponatraemic states following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') ingestion. *Q J Med* 2002; **95**:431–437.

38 Forsling ML, Fallon JK, Shah D, Tilbrook GS, Cowan DA, Kicman AT, *et al.* The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus. *Br J Pharmacol* 2002; **135**:649–656.

39 Escobedo I, O'Shea E, Orio L, Sanchez V, Segura M, de la Torre R, *et al.* A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol* 2005; **144**:231–241.

40 Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; **369**:23–37.

41 Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2002; **53**:111–122.

42 Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005; **5**:6–13.

43 de la Torre R, Farre M, Mathuna BO, Roset PN, Pizarro N, Segura M, *et al.* MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; **61**:551–554.

44 Krebsfaenger N, Murdter TE, Zanger UM, Eichelbaum MF, Doehmer J. V79 Chinese hamster cells genetically engineered for polymorphic cytochrome P450 2D6 and their predictive value for humans. *ALTEX* 2003; **20**:143–154.

45 Soares ME, Carvalho M, Carmo H, Remiao F, Carvalho F, Bastos ML. Simultaneous determination of amphetamine derivatives in human urine after SPE extraction and HPLC-UV analysis. *Biomed Chromatogr* 2004; **18**:125–131.

46 Carmo H, de Boer D, Remiao F, Carvalho F, Reys LA, Bastos ML. Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2004; **811**:143–152.

47 Carmo H, de Boer D, Remião F, Carvalho F, Reys LA, Bastos ML. Identification of 4-methylthioamphetamine and some of its metabolites in mouse urine by GC-MS after acute administration. *J Anal Toxicol* 2002; **26**:228–232.

48 Kumagai Y, Lin LY, Schmitz DA, Cho AK. Hydroxyl radical mediated demethylenation of (methylenedioxy)phenyl compounds. *Chem Res Toxicol* 1991; **4**:330–334.

49 Carmo H, Hengstler JG, de Boer D, Ringel M, Carvalho F, Fernandes E, *et al.* Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; **369**:198–205.

50 Carmo H, Hengstler JG, de Boer D, Ringel M, Remiao F, Carvalho F, *et al.* Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human. *Toxicology* 2005; **206**:75–89.

51 Coecke S, Bogni A, Langezaal I, Worth A, Hartung T, Monshouwer M. The use of genetically engineered cells for assessing CYP2D6-related polymorphic effects. *Toxicol In Vitro* 2001; **15**:553–556.

52 Doehmer J, Buters JT, Luch A, Soballa V, Baird WM, Morisson H, *et al.* Molecular studies on the toxifying effects by genetically engineered cytochromes P450. *Drug Metab Rev* 1999; **31**:423–435.

53 Philip PA, Ali-Sadat S, Doehmer J, Kocarek T, Akhtar A, Lu H, *et al.* Use of V79 cells with stably transfected cytochrome P450 cDNAs in studying the metabolism and effects of cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; **43**:59–67.

54 Bogni A, Monshouwer M, Moscone A, Hidestrand M, Ingelman-Sundberg M, Hartung T, *et al.* Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. *Toxicol In Vitro* 2005; **19**:621–629.

55 Mas M, Farre M, de la Torre R, Roset PN, Ortuno J, Segura J, *et al.* Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **290**:136–145.

56 Farré M, de la Torre R, Mathuna BO, Roset PN, Peiró AM, Torrens M, *et al.* Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology* 2004; **173**:364–375.

57 Bindoli A, Rigobello MP, Deeble DJ. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med* 1992; **13**:391–405.

58 Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 2000; **13**:135–160.

59 Hiramatsu M, Kumagai Y, Unger SE, Cho AK. Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **254**:521–527.

60 Monks TJ, Jones DC, Bai F, Lau SS. The role of metabolism in 3,4-(+)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(+)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) toxicity. *Ther Drug Monit* 2004; **26**:132–136.

61 Bindoli A, Rigobello MP, Galzigna L. Toxicity of aminochromes. *Toxicol Lett* 1989; **48**:3–20.

62 Zhang F, Dryhurst G. Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *J Med Chem* 1994; **37**:1084–1098.

63 Remiao F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. Cu2+-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol* 2002; **15**:861–869.

64 Remiao F, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML. Inhibition of Glutathione Reductase by Isoproterenol Oxidation Products. *J Enzyme Inhib* 1999; **15**:47–61.

65 Lin LY, Kumagai Y, Cho AK. Enzymatic and chemical demethylenation of (methylenedioxy)amphetamine and (methylenedioxy)methamphetamine by rat brain microsomes. *Chem Res Toxicol* 1992; **5**:401–406.

66 Ramamoorthy Y, Tyndale RF, Sellers EM. Cytochrome P450 2D6.1 and cytochrome P450 2D6.10 differ in catalytic activity for multiple substrates. *Pharmacogenetics* 2001; **11**:477–487.

67 Gilhooly TC, Daly AK. CYP2D6 deficiency, a factor in ecstasy related deaths? *Br J Clin Pharmacol* 2002; **54**:69–70.

68 Simantov R, Tauber M. The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *FASEB J* 1997; **11**: 141–146.

69 Stumm G, Schlegel J, Schafer T, Wurz C, Mennel HD, Krieg JC, *et al.* Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *FASEB J* 1999; **13**:1065–1072.

70 de Letter EA, Piette MH, Lambert WE, Cordonnier JA. Amphetamines as potential inducers of fatalities:a review in the district of Ghent from 1976–2004. *Med Sci Law* 2006; **46**:37–65.

71 Garcia-Repetto R, Moreno E, Soriano T, Jurado C, Gimenez MP, Menendez M. Tissue concentrations of MDMA and its metabolite MDA in three fatal cases of overdose. *Forensic Sci Int* 2003; **135**:110–114.

72 de Letter EA, Clauwaert KM, Lambert WE, Bocxlaer JFV, DeLeenheer AP, Piette MH. Distribution study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. *J Anal Toxicol* 2002; **26**:113–118.

73 Sticht G, Pluisch F, Bierhoff E, Kaferstein H. Fatal outcome of Ecstasy overdose. *Arch Kriminol* 2003; **211**:73–80.

74 Segura M, Ortuno J, Farre M, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, *et al.* 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol* 2001; **14**:1203–1208.

75 Zhu BT. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab* 2002; **3**:321–349.

76 Nagata K, Yamazoe Y. Pharmacogenetics of sulfotransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; **40**:159–176.

77 Freimuth RR, Eckloff B, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human sulfotransferase SULT1C1 pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomic studies. *Pharmacogenetics* 2001; **11**:747–756.

5.6. Trabalho VI

CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA)

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
ELSEVIER
Toxicology xxx (2006) xxx–xxx
TOXICOLOGY
www.elsevier.com/locate/toxicol

CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA)

Helena Carmo [a,*], Marc Brulport [b], Matthias Hermes [b], Franz Oesch [c], Douwe de Boer [d], Fernando Remião [a], Félix Carvalho [a], Michael R. Schön [e], Niels Krebsfaenger [f], Johannes Doehmer [g], Maria de Lourdes Bastos [a], Jan G. Hengstler [b]

[a] *REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal*
[b] *Centre for Toxicology, University of Leipzig, Hartelstrasse, 16-18, 04107 Leipzig, Germany*
[c] *Institute of Toxicology, University of Mainz, Germany*
[d] *Department of Clinical Chemistry, University Hospital Maastricht, The Netherlands*
[e] *Department of Surgery, University of Leipzig, Germany*
[f] *Schwarz Biosciences GmbH, Department of Pharmacology and Toxicology, Monheim, Germany*
[g] *GenPharmTox BioTech AG, D-Planegg/Martinsried, Germany*

Received 1 September 2006; received in revised form 25 October 2006; accepted 27 October 2006

Abstract

4-Methylthioamphetamine (4-MTA) belongs to a group of new amphetamine derivatives that is usually sold as "ecstasy" or "flatliners" on the illicit drug market. Large interindividual differences in 4-MTA mediated toxicity have been reported in humans. Therefore, we tested whether CYP2D6 or its variant alleles as well as CYP3A4 influence the susceptibility to 4-MTA. For this purpose, we used the colony formation assay with Chinese hamster lung fibroblast V79 cells expressing human wild-type CYP2D6 (CYP2D6*1), the low activity alleles CYP2D6*2, CYP2D6*9, as well as human CYP3A4. The obtained results showed that the expression of wild type CYP2D6*1 clearly enhanced the susceptibility to the cytotoxic effects of 4-MTA compared with the parental cells devoid of CYP-dependent enzymatic activity. Toxicity in V79 CYP2D6*1 was also higher compared to the V79 cell lines expressing the low activity alleles CYP2D6*2 and CYP2D6*9. In contrast to CYP2D6, the CYP3A4 isoenzyme did not enhance 4-MTA toxicity. In conclusion, our results suggest that CYP2D6 rapid metabolizers may be more susceptible to 4-MTA toxicity than CYP2D6 poor metabolizers.
© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: 4-Methylthioamphetamine; Designer drugs; Metabolism; Hepatotoxicity; CYP2D6; Polymorphism

1. Introduction

4-Methylthioamphetamine (4-MTA) belongs to a group of new amphetamine derivatives that have emerged on the illicit drug market for recreational drugs where it is usually sold as tablets marketed as "ecstasy" or "flatliners". Since its first identification in 1997 there have been at least six cases of death associated with 4-MTA in the UK and in the Netherlands (EMCDDA, 1999). In addition, one fatal and seven nonfatal intoxications in Belgium have been reported (de Letter et al., 2001). Therefore, 4-MTA was placed in Schedule I

* Corresponding author. Tel.: +351 222078979; fax: +351 222003977.
E-mail address: helenacarmo@ff.up.pt (H. Carmo).

0300-483X/$ – see front matter © 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

of the 1971 Convention (WHO, 2001) and is submitted to control measures and criminal penalties within the member States of the European Union (European Communities, 1999; EMCDDA, 1999).

4-MTA acts in a similar way to other amphetamine derivatives, such as p-methoxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") (Dukat et al., 2002; Khorana et al., 2004). It is a very selective serotonergic agent, increasing the release of serotonin, inhibiting serotonin uptake from nerve endings (Huang et al., 1992), with low affinity for noradrenaline and dopamine uptake sites and monoamine receptors (Huang et al., 1992; Li et al., 1996), and also inhibiting monoamine oxidase-A activity (Li et al., 1996; Scorza et al., 1997).

Particular concern regarding the toxicity of 4-MTA has been raised since its slow onset of action has encouraged abusers to administer further doses assuming that the first dose was inadequate (EMCDDA, 1999; Kavanagh et al., 1999). In the reported 4-MTA-related intoxications in humans, symptoms typical for the sympathomimetic effects of amphetamine-like compounds were observed, such as tachycardia, tremors, stomach cramps, headache, and sweating (de Boer et al., 1999; de Letter et al., 2001; Elliott, 2000). Information on the toxicity of 4-MTA is still scarce. The ability of 4-MTA to induce a hyperserotonergic state known as the serotonin syndrome (which is characterized by confusion, fever, shivering, diaphoresis, ataxia, hyperreflexia, myoclonus, or diarrhea) (Sporer, 1995) was observed in neurotoxicity studies performed with rats (Huang et al., 1992). Although initially considered as a nonneurotoxic drug, *in vitro* studies showed that 4-MTA induced neurotoxicity in rat hypothalamic cultured cells (Hurtado-Guzman et al., 2002). Additionally, *in vivo* studies in mice have shown that 4-MTA induces hyperthermia, another potentially lethal consequence of amphetamine intoxications (Carmo et al., 2003).

The interindividual variation in the propensity to the adverse effects of amphetamine designer drugs has been increasingly noticed (de Letter et al., 2004; Henry et al., 1992; O'Donohoe et al., 1998). Several studies suggest that interindividual differences in metabolism may be responsible for these differences (Capela et al., 2006; Carvalho et al., 2002; Carvalho et al., 2004a,b,c; Easton et al., 2003; Escobedo et al., 2005; Forsling et al., 2002; Gollamudi et al., 1989; Hartung et al., 2002; Jones et al., 2005).

The metabolic pathways proposed for 4-MTA in humans are represented in Fig. 1 and include: (i) oxidative deamination into a ketone metabolite (deamino-oxo 4-MTA; 1-[4-(methylthio)-phenyl]propan-2-one) that can be further reduced to the corresponding alcohol (deamino-hydroxy 4-MTA; 1-[4-(methylthio)-phenyl] propan-2-ol) or suffer degradation of the side chain into the 4-methylthiobenzoic acid metabolite; (ii) ring hydroxylation to a phenolic structure [(2-aminopropyl)-(methylthio)phenol]; (iii) β-hydroxylation of the side chain to 4-methylthionorephedrine (2-amino-1-[4-(methylthio)-phenyl]propan-1-ol) (Ewald et al., 2005). The same metabolic pathways were observed *in vivo* in mice (Carmo et al., 2002) and *in vitro* in primary hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat, and mouse (Carmo et al., 2004).

The enzymes involved in the metabolism of 4-MTA are not yet known but it is anticipated that the cytochrome P450 isoenzymes (CYP) play a critical role in these metabolic reactions. Of major importance is CYP2D6 that catalyses the ring hydroxylation, demethylenation, and demethoxylation of amphetamines and derivatives (Bach et al., 1999).

CYP2D6 activity shows a very high degree of interindividual variability, which is primarily due to genetic polymorphism that influences both enzyme expression and function (Zanger et al., 2004). The *CYP2D6* gene is highly polymorphic, with 58 alleles and more than 100 distinct variants listed so far at the CYPallele nomenclature homepage http://www.imm.ki.se/CYPalleles/. There is a marked interethnic variability in the alleles frequencies among populations (Bertilsson et al., 2002). CYP2D6 protein and enzymatic activity is completely absent in less than 1% of Asians and up to 10% of Caucasians as a result of the expression of null alleles that encode a nonfunctional protein product. These individuals are termed poor metabolizers (Zanger et al., 2004). Among the extensive metabolizers (EM) the enzyme activity is highly variable and can be markedly reduced in intermediate metabolizers (IM; heterozygous for a normal and a deficient allele). The frequency of the IM phenotype was estimated to be around 10–15% of the European population (Zanger et al., 2004). At the other extreme, the ultrarapid metabolizers (UM) phenotype can be caused by alleles carrying multiple gene copies (Ingelman-Sundberg, 2005). The frequencies of these alleles are markedly high in Ethiopian and Saudi Arabians populations, and up to 5% of the Caucasians present this phenotype (Zanger et al., 2004).

The aim of the present study was to determine if the CYP2D6 genotype influences 4-MTA cytotoxicity. We therefore tested 4-MTA cytotoxicity in a battery of genetically engineered V79 cell lines expressing the CYP2D6 allelic variants *1 (wild type), *2, *9 (reduced

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

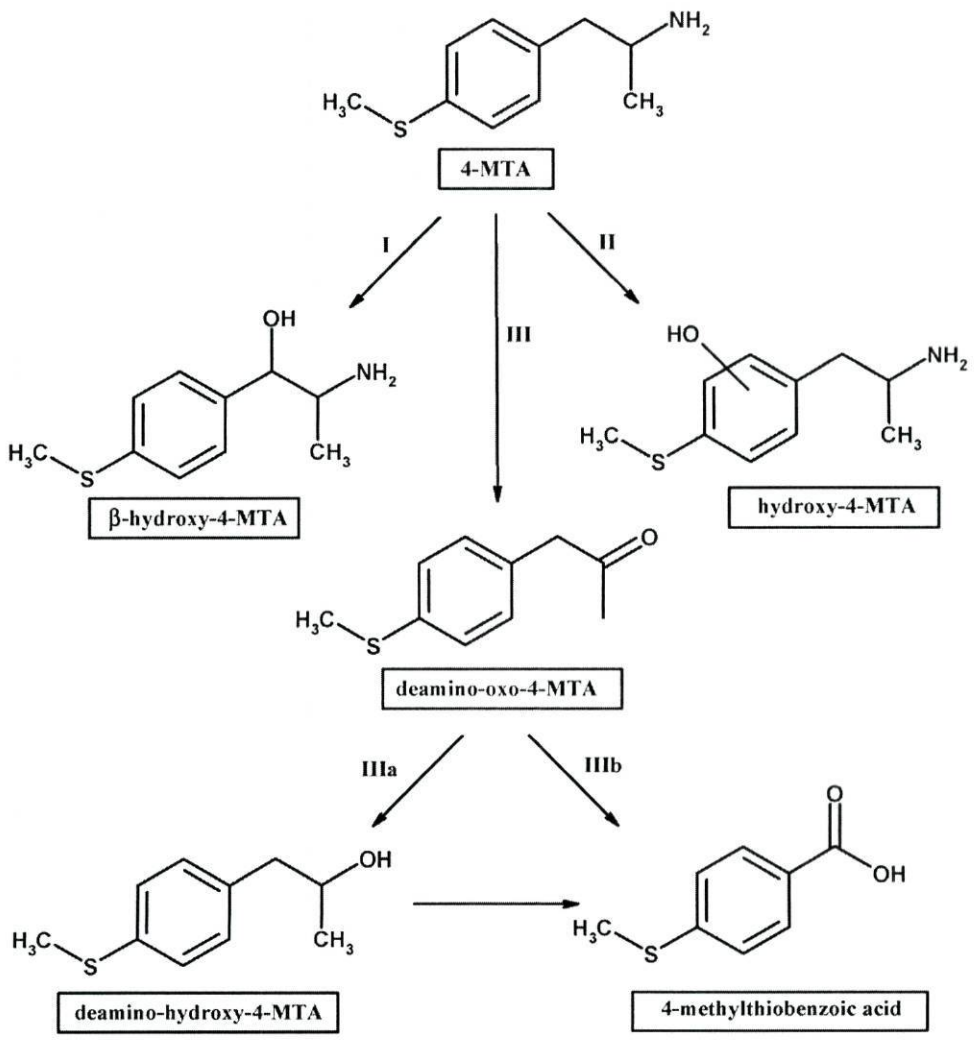


Fig. 1. Proposed metabolic pathways for the phase I metabolism of 4-MTA in humans. These metabolic pathways include β-hydroxylation of the side chain into 4-methylthionorephedrine (I), ring hydroxylation into a phenolic metabolite (2-aminopropyl)-(methylthio)phenol (II), oxidative deamination into a ketone metabolite 1-[4-(methylthio)phenyl]propan-2-one (III) followed by reduction into the corresponding alcohol 1-[4-(methylthio)-phenyl]propan-2-ol (IIIa), or degradation of the side chain into 4-methylthiobenzoic acid (IIIb).

activity alleles), and in a V79 cell line expressing CYP3A4.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Reagents for cell culture were obtained from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA): Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 g/L glucose, with L-glutamine, without sodium pyruvate; DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), trypsin (2.5%), penicillin (10,000 U/mL)-streptomycin (10 mg/mL) mixture, and foetal bovine serum (FBS). 4-MTA (HCl salt) was synthesised by REQUIMTE/Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA) and were of the highest grade commercially available.

2.2. Cell culture

Chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines were obtained from Prof. Johannes Doehmer and Dr. Niels Krebsfaenger, GenPharmTox BioTech AG, Martinsried, and were previously characterised for stable expression, activity, and CYP content (Krebsfaenger et al., 2003). A total number of six cell lines were tested. Two of these cell lines served as controls. The parental cell line consisted of nontransfected cells. An additional control was made by using a mock-transfected cell line that carries the selective marker for neomycin resistance (mockneo). Both control cell lines have no CYP-dependent enzymatic activity. The transfected cell lines were designated according to the corresponding cDNA: CYP2D6*1, CYP2D6*2, CYP2D6*9, and CYP3A4.

The cells were cultured in 75 cm^2 flasks and the cell cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2/95% air. The cell culture medium was DMEM

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (100 U/100 μg/mL). The cell cultures were routinely passaged every 48 h before reaching confluence. All the assays were performed on at least three separate occasions, during different culture passages, and each test substance concentration was tested in triplicate in each experiment.

2.3. Colony formation assay

All cell lines were assayed before the cultures reached 100% confluence. A cellular suspension was obtained by adding a 0.25% trypsin/1 mM EDTA solution to the cell culture flasks followed by 2 min incubation at 37 °C and suspension of the cells in cell culture medium. The cells were counted, given onto culture dishes at a density of 200 cells/dish/9 mL DMEM and allowed to attach for 4 h at 37 °C. The solutions of 4-MTA were freshly prepared in PBS and were sterile filtered. For each concentration tested (125–1000 μM), a 10 × concentrated solution was prepared and 1 mL of this solution was added to the cell culture dishes 4 h after plating the V79 cells. For the control incubations, 1 mL of PBS was added (solvent control). After 24 h of exposure to the test substance, the cell culture medium was removed and replaced with 10 mL of fresh DMEM and the cells were kept in culture for another 7 days. Finally, the cell colonies were fixed with an ice-cold mixture of ethanol/acetone (1:1), stained with a 10% aqueous solution of Giemsa blue, and the number of colonies was counted. The number of colonies expressed as a percent of the corresponding value of the solvent control incubations was used as a measure of cytotoxicity.

2.4. Statistical analysis

Results are presented as mean ± S.E.M. Data were obtained from at least three representative experiments performed independently. The means were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison post hoc test, using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Significance was accepted at a p-value of less than 0.05. Details of the statistical analyses are described in each figure legend.

3. Results

Toxicity of 4-MTA was tested in V79 cells transfected with CYP2D6*1, CYP2D6*2, CYP2D6*9, and CYP3A4 at concentrations of 125–1000 μM. Interestingly, clear differences in susceptibility were observed between these cell lines. Cytotoxicity was increased in the V79 cell line transfected with the human wild type CYP2D6*1 enzyme (Fig 2C) compared to the parental cell line (V79 parental; Fig. 2A) and to V79 cells transfected with a neomycin resistance gene (V79 mockneo; Fig. 2B). In V79 cells expressing CYP2D6*1, a significant decrease in viability compared to the solvent control incubation was already observed at the lowest tested concentration of 125 μM 4-MTA with a 17% reduction of the number of colonies formed when compared to the solvent control incubations without 4-MTA. After incubation with 250 μM 4-MTA CYP2D6*1 caused a 21% decrease in colony formation and at 500 μM 4-MTA the decrease was of 80% (Fig. 2C). In contrast, 250 μM 4-MTA did not cause a significant decrease in V79 parental and V79 mockneo colony formation.

When comparing the cytotoxicity of MTA in V79 cells transfected with CYP2D6*1, CYP2D6*2, CYP2D6*9, and CYP3A4 to the parental cell line (V79 parental) and to V79 cells transfected with a neomycin resistance gene (V79 mockneo) after incubation with 500 μM 4-MTA, only the V79 cell line transfected with CYP2D6*1 caused a decrease in colony formation that was significantly higher compared to the control cell lines (47% for parental cells and 38% for mockneo cells versus 80% for CYP2D6*1) (Fig. 3). CYP2D6*2 and CYP2D6*9 increased susceptibility to 4-MTA with a decrease in colony formation of 60% and 70%, respectively, but this increase was not statistically different from the control cell lines (Fig. 3). In contrast to CYP2D6, CYP3A4 did not significantly alter 4-MTA toxicity compared to V79 parental and V79 mockneo (Fig. 3). Generally, the highest 4-MTA toxicity was observed in V79 cells expressing CYP2D6 wild type (CYP2D6*1).

4. Discussion

Evidence of pharmacokinetic changes in amphetamine derivatives due to pharmacogenetic-related deficiency in CYP2D6 has been given both by *in vitro* (Ramamoorthy et al., 2001; Ramamoorthy et al., 2002; Tucker et al., 1994) and very recently by *in vivo* studies in humans (de la Torre et al., 2005). However, the consequences of these pharmacokinetic changes on the toxicity induced by these drugs are still to be determined.

In the present study we compared the cytotoxicity of 4-MTA in V79 cells expressing wild-type CYP2D6 (CYP2D6*1) or the low activity alleles CYP2D6*2 and CYP2D6*9. Our results show that the expression of wild type CYP2D6*1 greatly enhances the susceptibility to the cytotoxic effects of 4-MTA compared to the parental cells devoid of CYP-dependent enzymatic activity. Toxicity in V79 CYP2D6*1 was also higher compared to the V79 cell lines expressing the low activity alleles CYP2D6*2 and CYP2D6*9. In contrast to CYP2D6, the CYP3A4 isoenzyme did not enhance 4-MTA toxicity.

The V79-derived cell lines provide an *in vitro* system with a high predictive value for humans in the testing of

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

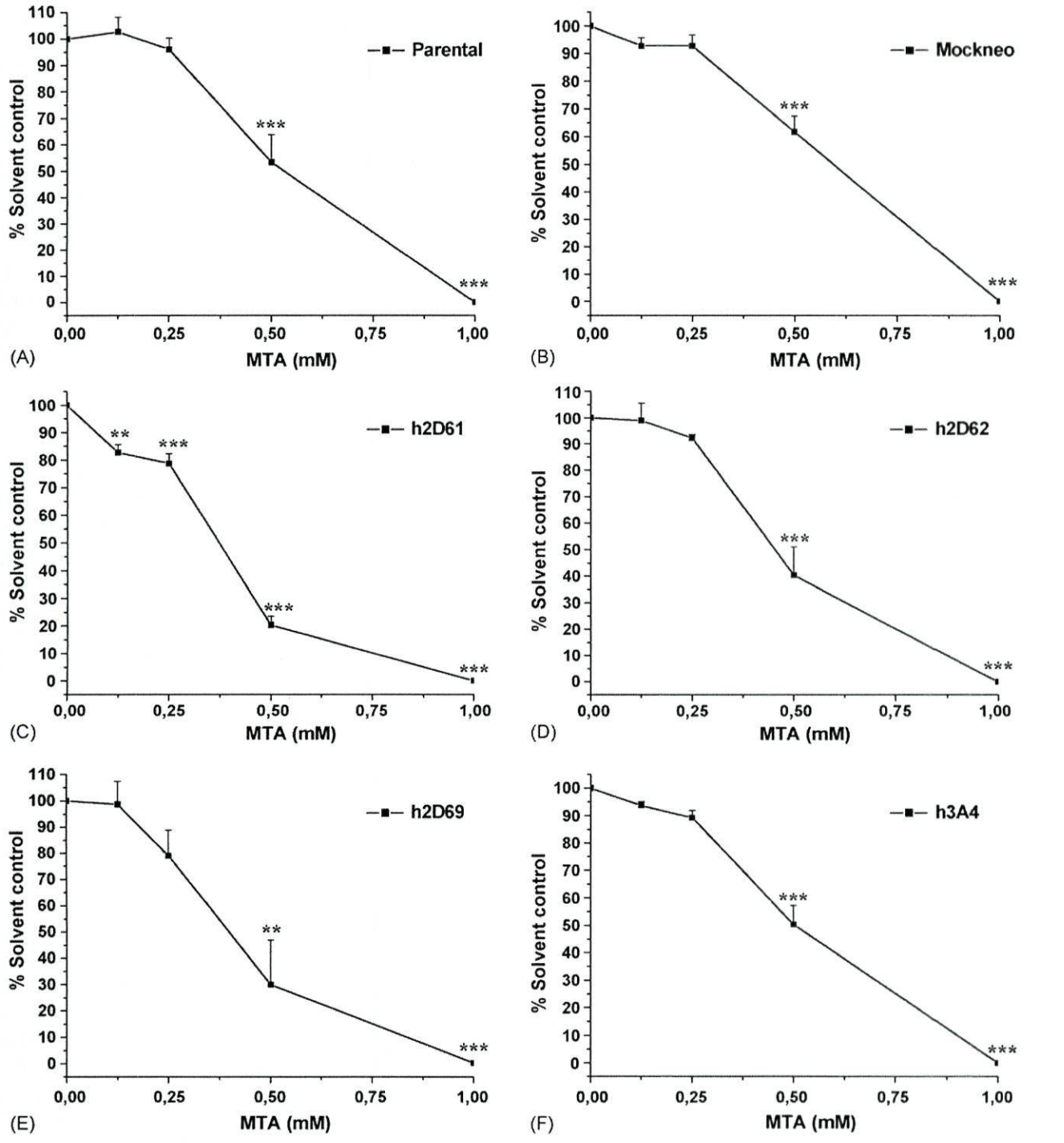


Fig. 2. 4-MTA cytotoxicity towards the V79 cell lines expressing different variants of CYP2D6 [parental; mockneo; CYP2D6*1 (h2D61); CYP2D6*2 (h2D62); CYP2D6*9 (h2D69); and CYP3A4 (h3A4)]. Toxicity was determined by the colony formation assay (A–F). All cell lines were exposed to 0.125, 0.25, 0.5, and 1 mM 4-MTA for 24 h under standard cell culture conditions. The number of colonies expressed as percent of the corresponding value of the solvent control incubations was used as a measure of cytotoxicity (% solvent control). Data are mean ± S.E.M. and were obtained from three independent experiments. The means were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison post hoc test. $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$ compared to solvent control.

CYP2D6 polymorphisms. These cells have been extensively characterised for stable expression of mRNA, for enzyme activity using the model substrate bufuralol, and for their CYP content (Krebsfaenger et al., 2003). They were found to express activities close to those observed in native tissue. The measurement of the CYP content showed some variation which could also account for the enzyme kinetic differences between the cell lines. However, this cell model was fully validated with the hydroxylation of the CYP2D6 model substrate bufuralol

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

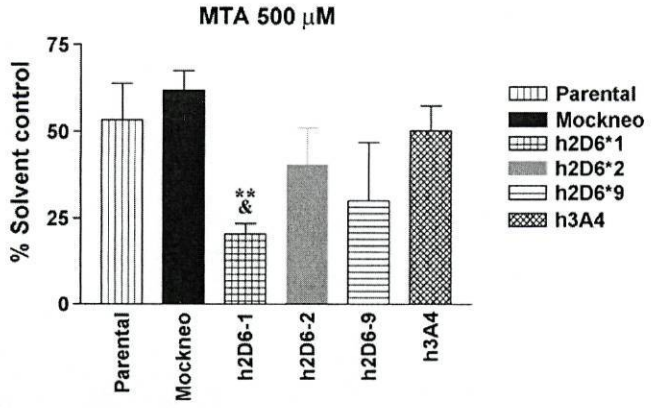


Fig. 3. Each of the V79 cell lines transfected with the variant CYP enzymes [CYP2D6*1 (h2D61); CYP2D6*2 (h2D62); CYP2D6*9 (h2D69); and CYP3A4 (h3A4)] were compared to the parental and mockneo control cell lines after incubation with 500 μM 4-MTA. The number of colonies expressed as percent of the corresponding value of the solvent control incubations was used as a measure of cytotoxicity (% solvent control). Data are mean ± S.E.M. and were obtained from three independent experiments. The means were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison post hoc test. $^{**}p < 0.01$ compared to mockneo control cell line. $^{\&}p < 0.05$ compared to parental control cell line.

and also with the selective estrogen receptor tamoxifen (Krebsfaenger et al., 2003).

Interindividual differences in susceptibility to amphetamine-related designer drugs toxicity have been noticed (Carmo et al., 2005; Colado et al., 1995; de Letter et al., 2004; Henry et al., 1992; Jones and Simpson, 1999; Malpass et al., 1999; O'Donohoe et al., 1998; Tucker et al., 1994). In a previous *in vitro* study large differences in susceptibility to 4-MTA cytotoxicity were found using hepatocytes from three human donors (Carmo et al., 2004). This raised the hypothesis that the interindividual differences in metabolic capacity of these hepatocytes might be responsible for the observed differences in 4-MTA cytotoxicity. It has been increasingly acknowledged that the toxic effects of the amphetamine designer drugs are not only related to high plasma levels of the drug (Greene et al., 2003) but also to metabolism. In fact, several studies have implicated the oxidative metabolism catalysed by CYP2D6 on the neurotoxic (Capela et al., 2006; Easton et al., 2003; Gollamudi et al., 1989; Jones et al., 2005), hepatotoxic (Carvalho et al., 2004a,b), cardiotoxic (Carvalho et al., 2004c), nephrotoxic (Carvalho et al., 2002), hyponatraemia (Forsling et al., 2002; Hartung et al., 2002), and hyperthermic (Escobedo et al., 2005) effects associated with these drugs.

CYP2D6 shows a very high degree of interindividual variability, which is primarily due to the extensive genetic polymorphism that influences both enzyme expression and function (Zanger et al., 2004). Concern has been raised that individuals who lack functional CYP2D6 alleles may be at risk of acute amphetamine intoxications, such as increased heart rate and hypertension due to the higher plasma levels of the drugs. Additionally, the combination of these drugs with CYP2D6 inhibitors may give rise to pharmacokinetic interactions of toxicological relevance. Such is the case of dextromethorphan which is sometimes found in "ecstasy" pills (Baggott et al., 2000), selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) such as fluoxetine and paroxetine (Segura et al., 2005), MAO inhibitors such as moclobemide (Smilkstein et al., 1987; Vuori et al., 2003), and ritonavir that was implicated in a fatal intoxication with MDMA (Henry and Hill, 1998).

The hypothesis that poor metabolizers may be at increased risk of acute intoxication comes from the assumption that the severity of the toxic effects correlates with the serum concentrations of the drugs (Greene et al., 2003). However, this is not corroborated by several studies that have shown that there is a lack of dose-response relationship after amphetamine administration (Asghar et al., 2003; Farré et al., 2004; Mas et al., 1999). This could explain why, at least in some individuals, toxic reactions may be unrelated to the amount taken, indicating that other factors beyond plasma concentration play a role in the induction of acute toxic effects.

The concern regarding the influence of the different CYP2D6 genotypes on the susceptibility to the toxic effects of the amphetamines prompted the investigation of a possible association between the poor metabolizer genotype for CYP2D6 and the occurrence of acute intoxication. Such an association was not found in any of the studies reported so far thus indicating that the metabolic impairment is not responsible for higher susceptibility to toxicity (Gilhooly and Daly, 2002; O'Donohoe et al., 1998; Schwab et al., 1999). In the light of our findings we hypothesise that individuals with higher metabolic capacity for CYP2D6 may in fact be at a higher risk of intoxication when compared to the poor metabolizers. It would be of great interest to investigate whether the UM phenotype (up to 5% of the Caucasians) characterized by multiple *CYP2D6* gene copies is over represented in the cases of 4-MTA and other amphetamine designer drug-related intoxications. According to our results this may be more relevant than the genotyping of the most common deficient alleles that has already been performed in previous studies (Gilhooly and Daly, 2002; O'Donohoe et al., 1998; Schwab et al., 1999).

Recently, we have shown that toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) was clearly increased in cells expressing CYP2D6*1 compared to the parental cells devoid of CYP-dependent enzymatic

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

activity (Carmo et al., 2006). Formation of the highly toxic MDMA metabolite *N*-methyl-α-methyldopamine (*N*-Me-α-MeDA) by CYP2D6*1 was responsible for increased toxicity. Whether a similar CYP2D6 dependent metabolic pathway also contributes to 4-MTA toxicity still has to be determined.

The concentrations of 4-MTA used in the present study are in the range of concentrations used in several *in vitro* studies (Capela et al., 2006; Carvalho et al., 2004b,c; Simantov and Tauber, 1997; Stumm et al., 1999). They are higher than blood concentrations found in human abusers. In the reported fatal intoxications with 4-MTA interindividual variations in blood levels could be observed (between 7.7 and 29.6 μM) (Decaestecker et al., 2001; Elliott, 2000; EMCDDA, 1999; Poortman and Lock, 1999). However, the tissue concentrations can be substantially higher. Post-mortem liver and brain concentrations of 170 and 201.6 μM, respectively, were reported in a fatal intoxication with 4-MTA (Decaestecker et al., 2001). Moreover, autopsy findings in other amphetamine-related intoxications have shown that the tissue levels of the drug in the liver can be up to 18 times higher than blood concentrations (de Letter et al., 2006) and 30 times higher in the brain (Garcia-Repetto et al., 2003). It should also be noted that these concentrations found at autopsy are probably lower than the peak concentrations that are expected to occur after drug intake, especially in the cases where the victims are submitted to emergency-care treatments to control the intoxications.

In conclusion, we have shown that CYP2D6*1 mediates higher levels of 4-MTA toxicity than CYP2D6*2 and CYP2D6*9 as well as CYP3A4. The data presented in this study provide evidence that the pharmacokinetic differences in amphetamine metabolism due to the genetic polymorphism of CYP2D6 are of major importance for the expression of the cytotoxic effects of these drugs.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação Para a Ciência e a Tecnologia (POCI/SAU-FCF/57187/2004), by REQUIMTE Associated Laboratory, by a CRUP/DAAD grant (reference A-5/04) and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF), funding priority HepatoSys, Systems Biology of the Hepatocyte.

References

Asghar, S.J., Tanay, V.A., Baker, G.B., Greenshaw, A., Silverstone, P.H., 2003. Relationship of plasma amphetamine levels to physiological, subjective, cognitive and biochemical measures in healthy volunteers. Hum. Psychopharmacol. 18, 291–299.

Bach, M.V., Coutts, R.T., Baker, G.B., 1999. Involvement of CYP2D6 in the *in vitro* metabolism of amphetamine, two *N*-alkylamphetamines and their 4-methoxylated derivatives. Xenobiotica 29, 719–732.

Baggott, M., Heifets, B., Jones, R.T., Mendelson, J., Sferios, E., Zehnder, J., 2000. Chemical analysis of ecstasy pills. JAMA 284, 2190.

Bertilsson, L., Dahl, M.L., Dalen, P., Al-Shurbaji, A., 2002. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. Br. J. Clin. Pharmacol. 53, 111–122.

Capela, J.P., Meisel, A., Abreu, A.R., Branco, P.S., Ferreira, L.M., Lobo, A.M., Remiao, F., Bastos, M.L., Carvalho, F., 2006. Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. J. Pharmacol. Exp. Ther. 316, 53–61.

Carmo, H., Brulport, M., Hermes, M., Oesch, F., Silva, R., Ferreira, L.M., Branco, P.S., de Boer, D., Remião, F., Carvalho, F., Schön, M.R., Krebsfaenger, N., Doehmer, J., Bastos, M.L., Hengstler, J.G., 2006. Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") cytotoxicity. Pharmacogenet Genomics 16, 789–799.

Carmo, H., de Boer, D., Remião, F., Carvalho, F., Reys, L.A., Bastos, M.L., 2002. Identification of 4-methylthioamphetamine and some of its metabolites in mouse urine by GC–MS after acute administration. J. Anal. Toxicol. 26, 228–232.

Carmo, H., Hengstler, J.G., de Boer, D., Ringel, M., Carvalho, F., Fernandes, E., Remiao, F., Reys, L.A., Oesch, F., Bastos, M.L., 2004. Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 369, 198–205.

Carmo, H., Hengstler, J.G., de Boer, D., Ringel, M., Remiao, F., Carvalho, F., Fernandes, E., Reys, L.A., Oesch, F., Bastos, M.L., 2005. Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human. Toxicology 206, 75–89.

Carmo, H., Remiao, F., Carvalho, F., Fernandes, E., de Boer, D., Reys, L.A., Bastos, M.L., 2003. 4-Methylthioamphetamine-induced hyperthermia in mice: influence of serotonergic and catecholaminergic pathways. Toxicol. Appl. Pharmacol. 190, 262–271.

Carvalho, M., Hawksworth, G., Milhazes, N., Borges, F., Monks, T.J., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2002. Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an *in vitro* study using rat and human renal proximal tubular cells. Arch. Toxicol. 76, 581–588.

Carvalho, M., Milhazes, N., Remiao, F., Borges, F., Fernandes, E., Amado, F., Monks, T.J., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2004a. Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. Arch. Toxicol. 78, 16–24.

Carvalho, M., Remiao, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2004b. The toxicity of *N*-methyl-alpha-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and *N*-acetylcysteine. Toxicology 200, 193–203.

Carvalho, M., Remiao, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Monteiro, M., Goncalves, M.J., Seabra, V., Amado, F., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2004c. Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity *in vitro*. Chem. Res. Toxicol. 17, 623–632.

Colado, M.I., Williams, J.L., Green, A.R., 1995. The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the dark agouti (DA) rat, a model of

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. Br. J. Pharmacol. 115, 1281–1289.

de Boer, D., Egberts, T., Maes, R.A.A., 1999. Para-methylthioamphetamine, a new amphetamine designer drug of abuse. Pharm. World Sci. 21, 47–48.

Decaestecker, T., de Letter, E.A., Clauwaert, K., Bouche, M.P., Lambert, W., Bocxlaer, J.V., Piette, M., Eeckhout, E.V.D., Peteghem, C.V., de Leenheer, A., 2001. Fatal 4-MTA intoxication: development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for multiple matrices. J. Anal. Toxicol. 25, 705–710.

de la Torre, R., Farre, M., Mathuna, B.O., Roset, P.N., Pizarro, N., Segura, M., Torrens, M., Ortuno, J., Pujadas, M., Cami, J., 2005. MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. Eur. J. Clin. Pharmacol. 61, 551–554.

de Letter, E.A., Bouche, M.P., Bocxlaer, J.F.V., Lambert, W.E., Piette, M.H., 2004. Interpretation of a 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities. Forensic Sci. Int. 141, 85–90.

de Letter, E.A., Coopman, V.A.E., Cordonnier, J.A.C.M., Piette, M.H.A., 2001. One fatal and seven non-fatal cases of 4-methylthioamphetamine (4-MTA) intoxication: clinico-pathological findings. Int. J. Legal Med. 114, 352–356.

de Letter, E.A., Piette, M.H., Lambert, W.E., Cordonnier, J.A., 2006. Amphetamines as potential inducers of fatalities: a review in the district of Ghent from 1976–2004. Med. Sci. Law 46, 37–65.

Dukat, M., Young, R., Glennon, R.A., 2002. Effect of PMA optical isomers and 4-MTA in PMMA-trained rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 72, 299–305.

Easton, N., Fry, J., O'Shea, E., Watkins, A., Kingston, S., Marsden, C.A., 2003. Synthesis, *in vitro* formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy). Brain Res. 987, 144–154.

Elliott, S.P., 2000. Fatal poisoning with a new phenethylamine: 4-methylthioamphetamine (4-MTA). J. Anal. Toxicol. 24, 85–89.

Escobedo, I., O'Shea, E., Orio, L., Sanchez, V., Segura, M., de la Torre, R., Farre, M., Green, A.R., Colado, M.I., 2005. A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. Br. J. Pharmacol. 144, 231–241.

European Communities, 1999. Council decision of 13 September 1999 defining 4-MTA as a new synthetic drug which is to be made subject to control measures and criminal penalties. Official Journal of the European Communities, p. 1.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 1999. Report on the Risk Assessment of 4-MTA in the Framework of the Joint Action on New Synthetic Drugs. Office for official publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 3–114.

Ewald, A.H., Peters, F.T., Weise, M., Maurer, H.H., 2005. Studies on the metabolism and toxicological detection of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA) in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 824, 123–131.

Farré, M., de la Torre, R., Mathuna, B.O., Roset, P.N., Peiró, A.M., Torrens, M., Ortuno, J., Pujadas, M., Camí, J., 2004. Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. Psychopharmacol. 173, 364–375.

Forsling, M.L., Fallon, J.K., Shah, D., Tilbrook, G.S., Cowan, D.A., Kicman, A.T., Hutt, A.J., 2002. The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus. Br. J. Pharmacol. 135, 649–656.

Garcia-Repetto, R., Moreno, E., Soriano, T., Jurado, C., Gimenez, M.P., Menendez, M., 2003. Tissue concentrations of MDMA and its metabolite MDA in three fatal cases of overdose. Forensic Sci. Int. 135, 110–114.

Gilhooly, T.C., Daly, A.K., 2002. CYP2D6 deficiency, a factor in ecstasy related deaths? Br. J. Clin. Pharmacol. 54, 69–70.

Gollamudi, R., Ali, S.F., Lipe, G., Newport, G., Webb, P., Lopez, M., Leakey, J., Kolta, M., Slikker, W.J., 1989. Influence of inducers and inhibitors on the metabolism *in vitro* and neurochemical effects *in vivo* of MDMA. Neurotoxicology 10, 455–466.

Greene, S.L., Dargan, P.I., O'Connor, N., Jones, A.L., Kerins, M., 2003. Multiple toxicity from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). Am. J. Emerg. Med. 21, 121–124.

Hartung, T.K., Schofield, E., Short, A.I., Parr, M.J., Henry, J.A., 2002. Hyponatraemic states following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') ingestion. Q.J.M. 95, 431–437.

Henry, J.A., Hill, I.R., 1998. Fatal interaction between ritonavir and MDMA. Lancet 352, 1751–1752.

Henry, J.A., Jeffreys, K.J., Dawling, S., 1992. Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). Lancet 340, 384–387.

Huang, X., Marona-Lewicka, D., Nichols, D.E., 1992. *p*-Methylthioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotonin-releasing agent. Eur. J. Pharmacol. 229, 31–38.

Hurtado-Guzman, C., Martinez-Alvarado, P., Dagnino-Subiabre, A., Paris, I., Caviedes, P., Caviedes, R., Cassels, B.K., Segura-Aguilar, J., 2002. Neurotoxicity of some MAO inhibitors in adult rat hypothalamic cell culture. Neurotox. Res. 4, 161–163.

Ingelman-Sundberg, M., 2005. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. Pharmacogenomics J. 5, 6–13.

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.

Jones, D.C., Duvauchelle, C., Ikegami, A., Olsen, C.M., Lau, S.S., de la Torre, R., Monks, T.J., 2005. Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 313, 422–431.

Kavanagh, P.V., Corrigan, D., Maguire, R.T., Meegan, M.J., Keating, J.J., Clancy, J., Burdett, J., 1999. Excretion profile of 4-methylthioamphetamine in dogs. Pharm. Pharmacol. Commun. 5, 653–655.

Khorana, N., Pullagurla, M.R., Dukat, M., Young, R., Glennon, R.A., 2004. Stimulus effects of three sulfur-containing psychoactive agents. Pharmacol. Biochem. Behav. 78, 821–826.

Krebsfaenger, N., Murdter, T.E., Zanger, U.M., Eichelbaum, M.F., Doehmer, J., 2003. V79 Chinese hamster cells genetically engineered for polymorphic cytochrome P450 2D6 and their predictive value for humans. ALTEX 20, 143–154.

Li, Q., Murakami, I., Stall, S., Levy, A.D., Brownfield, M.S., Nichols, D.E., Van de Kar, L.D., 1996. Neuroendocrine pharmacology of three serotonin releasers: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butane (MBDB), 5-methoxy-6-methyl-2-aminoindan (MMAI) and *p*-methylthioamphetamine (MTA). J. Pharmacol. Exp. Ther. 279, 1261–1267.

Malpass, A., White, J.M., Irvine, R.J., Somogyi, A.A., Bochner, F., 1999. Acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

(MDMA) in Sprague–Dawley and dark agouti rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 64, 29–34.

Mas, M., Farre, M., de la Torre, R., Roset, P.N., Ortuno, J., Segura, J., Cami, J., 1999. Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine in humans. J. Pharmacol. Exp. Ther. 290, 136–145.

O'Donohoe, A., O'Flynn, K., Shields, K., Hawi, Z., Gill, M., 1998. MDMA toxicity: no evidence for a major influence of metabolic genotype at CYP2D6. Addict. Biol. 3, 309–314.

Poortman, A.J., Lock, E., 1999. Analytical profile of 4-methylthioamphetamine (4-MTA), a new street drug. Forensic Sci. Int. 100, 221–233.

Ramamoorthy, Y., Tyndale, R.F., Sellers, E.M., 2001. Cytochrome P450 2D6.1 and cytochrome P450 2D6.10 differ in catalytic activity for multiple substrates. Pharmacogenetics 11, 477–487.

Ramamoorthy, Y., Yu, A., Suh, N., Haining, R.L., Tyndale, R.F., Sellers, E.M., 2002. Reduced (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") metabolism with cytochrome P450 2D6 inhibitors and pharmacogenetic variants *in vitro*. Biochem. Pharmacol. 63, 2111–2119.

Schwab, M., Seyringer, E., Brauer, R.B., Hellinger, A., Griese, E.U., 1999. Fatal MDMA intoxication. Lancet 353, 593–594.

Scorza, M.C., Carrau, C., Silveira, R., Zapata-Torres, G., Cassels, B.K., Reyes-Parada, M., 1997. Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives. Biochem. Pharmacol. 54, 1361–1369.

Segura, M., Farre, M., Pichini, S., Peiro, A.M., Roset, P.N., Ramirez, A., Ortuno, J., Pacifici, R., Zuccaro, P., Segura, J., de la Torre, R., 2005. Contribution of cytochrome P450 2D6 to 3,4-methylenedioxymethamphetamine disposition in humans: use of paroxetine as a metabolic inhibitor probe. Clin. Pharmacokinet. 44, 649–660.

Simantov, R., Tauber, M., 1997. The abused drug MDMA (ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. FASEB J. 11, 141–146.

Smilkstein, M.J., Smolinske, S.C., Rumack, B.H., 1987. A case of MAO inhibitor/MDMA interaction: agony after ecstasy. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 25, 149–159.

Sporer, K.A., 1995. The serotonin syndrome. Implicated drugs, pathophysiology and management. Drug Saf. 13, 94–104.

Stumm, G., Schlegel, J., Schafer, T., Wurz, C., Mennel, H.D., Krieg, J.C., Vedder, H., 1999. Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. FASEB J. 13, 1065–1072.

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., 1994. The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). Biochem. Pharmacol. 47, 1151–1156.

Vuori, E., Henry, J.A., Ojanpera, I., Nieminen, R., Savolainen, T., Wahlsten, P., Jantti, M., 2003. Death following ingestion of MDMA (ecstasy) and moclobemide. Addiction 98, 365–368.

World Health Organization (WHO), 2001. WHO Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-second report. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 903, 1–26.

Zanger, U.M., Raimundo, S., Eichelbaum, M., 2004. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 369, 23–37.

Please cite this article in press as: Carmo, H. et al., CYP2D6 increases toxicity of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA), Toxicology (2006), doi:10.1016/j.tox.2006.10.024

PARTE III

Discussão Geral e Referências

6. DISCUSSÃO GERAL

6.1. Interesse da avaliação do perfil metabólico de novos derivados anfetamínicos

Tendo como objectivo a caracterização toxicológica das duas drogas de abuso 4-MTA e 2C-B foi estabelecida como prioritária a avaliação do seu perfil metabólico *in vivo*.

Ao contrário do que acontece com os novos fármacos, que são exaustivamente estudados em ensaios clínicos controlados, nomeadamente no que se refere ao metabolismo, caracterização de enzimas envolvidas na biotransformação e perfil farmacocinético, as drogas ilícitas são consumidas sem qualquer avaliação quanto à sua segurança. Os dados disponíveis relativamente ao seu metabolismo são, na maior parte das vezes, incompletos ou mesmo inexistentes. Contudo, o conhecimento do metabolismo é fundamental para o despiste e análise de risco toxicológico. As variações ao nível da formação de metabolitos farmacologicamente activos, tóxicos, ou a possibilidade de interacções medicamentosas (o consumo deste tipo de estimulantes caracteriza-se pelo uso simultâneo de várias drogas, incluindo fármacos), podem afectar significativamente a avaliação dos resultados analíticos em estudos clínicos e forenses.

A identificação inequívoca da exposição a um determinado xenobiótico depende grandemente da biotransformação que este sofre no organismo. Se o composto em questão for extensamente metabolizado, a exposição pode apenas ser confirmada mediante a identificação da excreção dos seus metabolitos. Pelo contrário, os xenobióticos que são excretados maioritariamente sem biotransformação constituem os melhores biomarcadores de exposição. No caso concreto das anfetaminas, e no domínio forense, o despiste da ingestão destes compostos é muitas vezes feito com base em imunoensaios relativamente pouco específicos. Deste modo, a caracterização inequívoca da exposição necessita de procedimentos analíticos mais específicos que indiquem claramente a identidade da substância. Tal objectivo pode ser atingido, por exemplo, com recurso a técnicas cromatográficas acopladas a diferentes tipos de detecção. O detector de massa, eleito para estes estudos, apresenta a vantagem de permitir uma previsão da estrutura molecular dos compostos detectados a partir da interpretação do

espectro que se obtém para cada um dos compostos que é separado pela eluição cromatográfica. Deste modo, não só é possível avaliar a extensão do metabolismo através da análise do composto não biotransformado, como é também possível identificar qual ou quais os metabolitos que se formaram maioritariamente.

Dadas as restrições de carácter ético que condicionam a experimentação das anfetaminas em humanos, a escolha do modelo animal para a avaliação da sua toxicidade é crucial. De uma forma geral, a extrapolação dos dados obtidos dos estudos em animais para a situação em humanos é muito provavelmente o tema mais importante em toxicologia. Uma das questões mais pertinentes que se levantam neste domínio é a aproximação do modelo animal ao humano em termos farmacocinéticos. Assim se justifica a necessidade de avaliar inicialmente o perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B no ratinho, que foi a espécie animal seleccionada nesta dissertação.

6.2. Caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B in vivo usando o ratinho como modelo animal

Os estudos realizados para a avaliação do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B *in vivo* (Trabalho I e Trabalho II) permitiram identificar vários metabolitos que foram excretados na urina de ratinho. A urina de ratinho foi colhida durante as primeiras 24 h após a administração dos compostos por via intraperitoneal. As urinas foram sujeitas a extracção alcalina e ácida e separação cromatográfica por GC com um detector de massa acoplado. A maior parte dos metabolitos foi identificada através da interpretação dos espectros de massa obtidos. Os esquemas com as vias metabólicas propostas para a 4-MTA e para a 2C-B no ratinho, obtidos com base nos resultados destes estudos, encontram-se respectivamente representados na Figura 16 e na Figura 17.

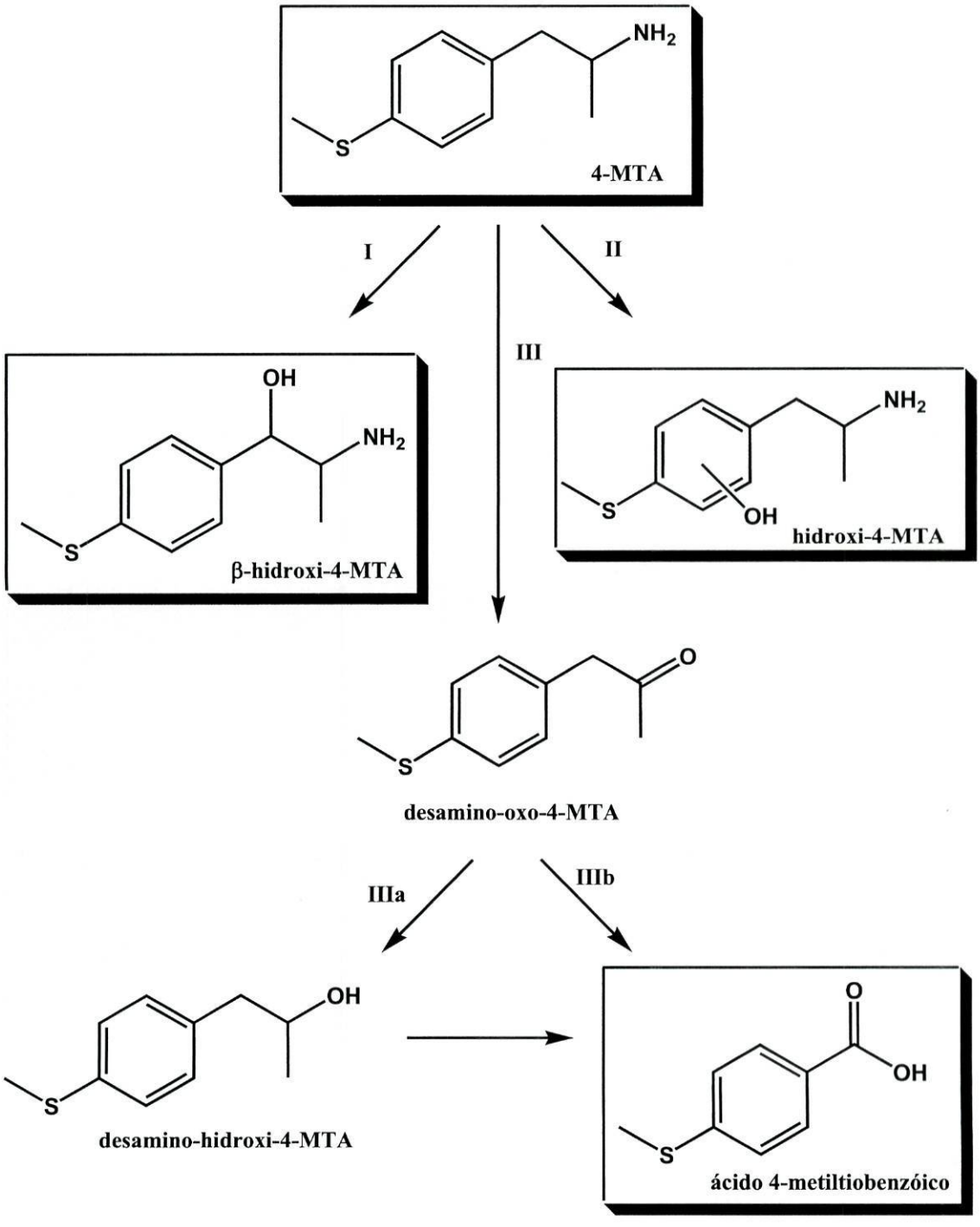


Figura 16. Vias metabólicas identificadas *in vivo* no ratinho (Trabalho I) para a 4-MTA e comparação com os estudos efectuados no Homem (Ewald *et al.* 2005). Os metabolitos delineados a traço cheio e com sombra correspondem aos identificados também na urina de ratinho. I, β-hidroxilação; II, hidroxilação aromática ou da cadeia lateral do grupo tiol; III, desaminação oxidativa com formação do composto cetónico que por redução origina um álcool secundário (IIIa) e/ou por oxidação um ácido carboxílico (IIIb).

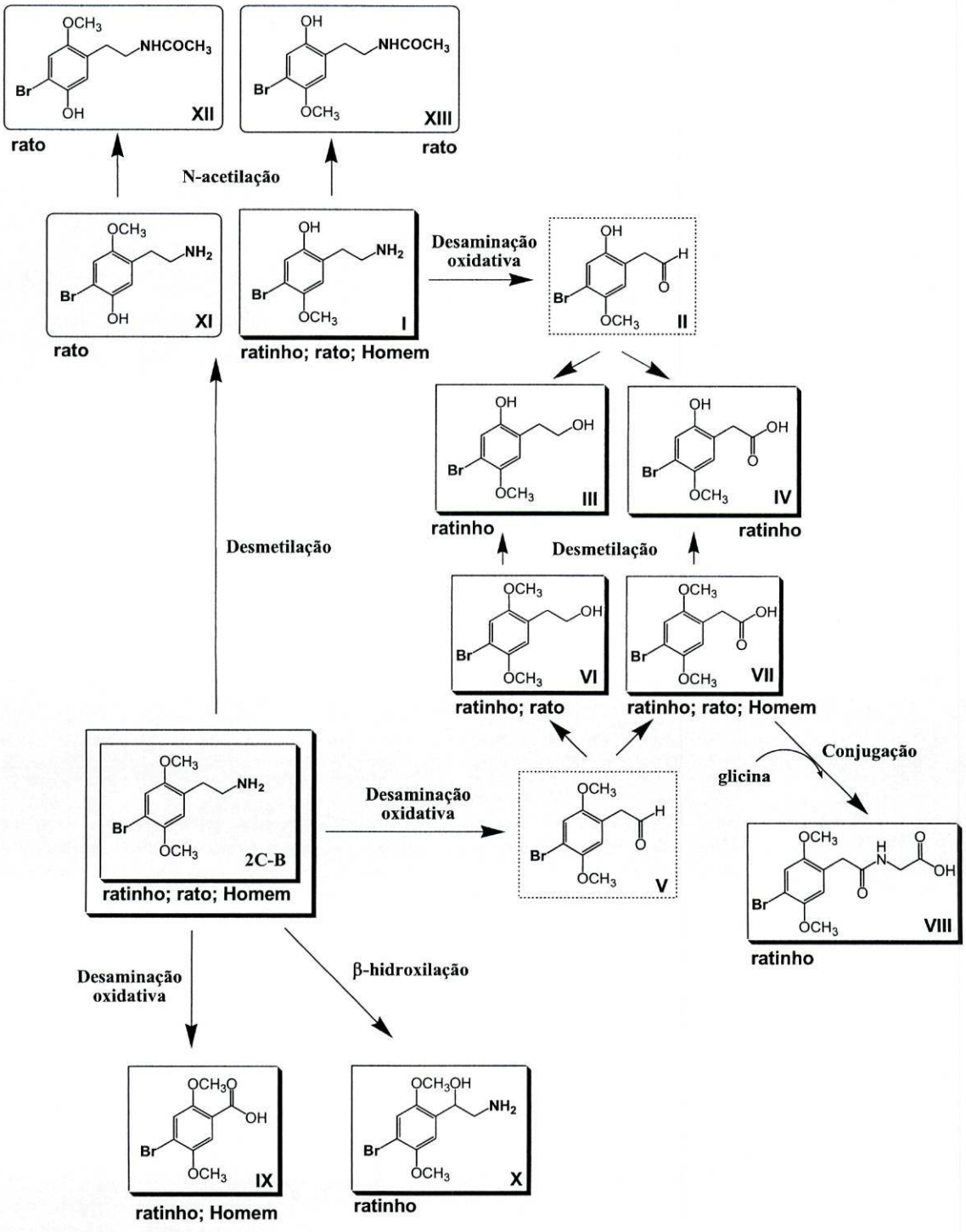


Figura 17. Vias metabólicas propostas para a 2C-B *in vivo* no ratinho (Trabalho II) e comparação com os estudos efectuados no rato e no Homem (de Boer *et al.* 1999c; Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003). As estruturas delineadas por tracejado correspondem a prováveis intermediários que não foram identificados nos estudos. Indicam-se para os diferentes metabolitos as espécies onde foi identificada a sua presença. I, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina; II, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacetaldeído; III, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletanol; IV, ácido 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacético; V, 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacetaldeído; VI, 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-etanol; VII, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético; VIII, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenacetúrico; IX, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico; X, β-hidroxi-2C-B; XI, 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxi-feniletilamina; XII, 1-acetoamino-2-(2-metoxi-4-bromo-5-hidroxifenil)-etano ou 5-O-desmetil-N-acetil-2C-B; XIII, 1-acetoamino-2-(2-hidroxi-4-bromo-5-metoxifenil)-etano ou 2-O-desmetil-N-acetil-2C-B.

Uma das principais diferenças observadas para estes dois compostos foi a extensão da metabolização que ambos sofrem *in vivo* no modelo animal testado. De facto, apesar da análise conduzida em ambos os estudos ser de natureza qualitativa, foi possível observar que, enquanto a 4-MTA foi excretada maioritariamente na forma não biotransformada, a 2C-B foi extensamente metabolizada, sendo o ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético o metabolito maioritariamente excretado. O diferente grau de biotransformação sofrido por ambos os compostos pode ser de extraordinária importância ao nível da expressão de toxicidade dos compostos. Por outro lado, as implicações ao nível forense são muito significativas. Dada a semelhança estrutural entre os diferentes derivados anfetamínicos, existe a possibilidade de conversão metabólica de um derivado anfetamínico num outro derivado e até mesmo a possibilidade de existirem metabolitos comuns, tal como acontece no caso da metanfetamina que é metabolisada por N-desmetilação em anfetamina e também no caso de fármacos utilizados na terapêutica como, por exemplo, a selegilina que é metabolizada em metanfetamina e anfetamina (Kraemer e Maurer 1998, 2002; Musshoff 2000). Isto pode tornar difícil a identificação inequívoca do composto quando se pretende determinar, por exemplo, o composto causal de uma intoxicação ou um agente dopante. Deste modo, no caso da 4-MTA, considerando os resultados obtidos no ratinho (Trabalho I), a sua excreção na forma não biotransformada permite eleger o próprio composto como o melhor marcador de exposição na urina. Esta conclusão é suportada por (i) dados disponíveis sobre a farmacocinética da 4-MTA em humanos, cuja excreção urinária de 4-MTA não biotransformada corresponde a 90% da excreção total (4-MTA e metabolitos) (Ewald *et al.* 2005), (ii) dados obtidos de intoxicações fatais e não fatais (Decaestecker *et al.* 2001; de Letter *et al.* 2001; de Letter *et al.* 2006; Elliott 2000; Elliott 2001), e (iii) resultados obtidos num estudo do perfil de excreção da 4-MTA no cão, onde foi observado que a 4-MTA foi predominantemente excretada na forma não biotransformada, tendo sido detectada até 23 h após administração de uma dose de 0,8 mg/kg (Kavanagh *et al.* 1999). Para a 2C-B deverá ser levada em linha de conta a sua biotransformação e, sobretudo, o tempo decorrido após a administração em que é colhida a urina para análise. Tal como os resultados obtidos no ratinho indicam (Trabalho II), também nos estudos efectuados até à data no rato (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003; Theobald *et al.* 2006) e no único estudo que reporta dados farmacocinéticos da 2C-B em humanos (de Boer *et al.* 1999c), foi possível observar uma grande extensão de biotransformação da 2C-B, o que torna importante a

identificação dos metabolitos como marcadores de exposição. Contudo, no ratinho (Trabalho II), no rato (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003) e no Homem (Theobald *et al.* 2006), foi também observada a excreção do composto não biotransformado, pelo que a 2C-B pode também servir como marcador de exposição. No entanto, a 2C-B só foi detectada na urina humana até 3 h após a sua ingestão (de Boer *et al.* 1999c).

As vias metabólicas envolvidas na biotransformação destes compostos são essencialmente as mesmas observadas para a *d*-anfetamina e análogos e, no caso da 2C-B, também semelhantes ao seu análogo estrutural mescalina (Caldwell 1980; Demisch e Seiler 1975; Kapadia e Fayez 1970; Seiler e Demisch 1974a; Seiler e Demisch 1974b; Shah e Himwich 1971; Staack e Maurer 2005; Watanabe *et al.* 1995) (ver Figura 18).

A *d*-anfetamina sofre metabolização *in vivo* por quatro vias principais: (i) hidroxilação aromática, (ii) hidroxilação alifática, (iii) desaminação oxidativa, e (iv) conjugação do grupo amina (Caldwell 1980; Carvalho 1998; Musshoff 2000).

A hidroxilação aromática da *d*-anfetamina ocorre na posição 4 do anel aromático originando um metabolito dotado de actividade biológica, a *p*-hidroxianfetamina. O epóxido intermediário precursor da formação deste metabolito está também envolvido no mecanismo de toxicidade da *d*-anfetamina, através da sua capacidade de reagir com locais nucleófilos intracelulares (Carvalho 1998; Carvalho *et al.* 1996). Por outro lado, este intermediário pode reagir com a GSH formando um aducto, o glutanion-S-il-*p*-hidroxianfetamina, contribuindo assim para a depleção deste importante antioxidante intracelular (Carvalho *et al.* 1996). Esta reacção metabólica pode, desta forma, contribuir para o stress oxidativo associado à acção tóxica da *d*-anfetamina, nomeadamente ao nível hepático (Carvalho *et al.* 1996). A formação da *p*-hidroxianfetamina é catalizada pelas enzimas da família CYP2D do citocromo P450 (CYP2D6 no Homem) (Bach *et al.* 1999; Carvalho *et al.* 1996; Kraemer e Maurer 2002). Não obstante a importância toxicológica desta via metabólica, no caso dos dois derivados anfetamínicos alvo da presente dissertação, a posição 4 do anel aromático está substituída na 4-MTA pelo grupo metiltio e por um átomo de bromo na 2C-B, pelo que esta reacção metabólica não será relevante para estas duas drogas. Apenas no caso da 4-MTA foi considerada a possibilidade de hidroxilação no anel aromático ou no grupo metiltio. De facto, embora não tenha sido possível identificar a estrutura do terceiro metabolito hidroxilado encontrado na urina dos ratinhos (para além dos dois metabolitos β-hidroxilados metiltiofenilpropanolamina e metiltiocatina), as características do

espectro de massa parecem indicar uma maior probabilidade de hidroxilação no grupo metiltio em detrimento de uma hidroxilação directa no anel aromático. Para além destas evidências espectrais, o estudo do metabolismo de uma série de derivados alcoxilo da *d*-anfetamina substituídos na posição 4 do anel aromático com cadeias carbonadas de diferentes tamanhos (metoxilo, etoxilo e propoxilo), revelou a ocorrência de hidroxilação do grupo propoxilo no caso da *p*-propoxianfetamina (Foster *et al.* 1993). Dadas as semelhanças estruturais entre estes compostos é de prever essa possibilidade também no caso da 4-MTA. Por outro lado, a hidroxilação aromática parece ser uma via metabólica minoritária em humanos, sendo apenas particularmente importante no rato (Caldwell 1980).

A hidroxilação alifática da *d*-anfetamina pode ocorrer quer no carbono α (o que acontece no processo de desaminação oxidativa), quer no carbono β (originando os metabolitos fenilpropanolamina e catina). Esta reacção metabólica é estereoselectiva para o isómero (+) e é catalizada pela enzima dopamina-β-hidroxilase existente nos terminais nervosos do sistema nervoso simpático ao nível central e periférico (Caldwell 1980; Lefkowitz *et al.* 1996; Musshoff 2000). Esta via metabólica ocorre em humanos, ainda que de forma pouco expressiva (Caldwell 1980). No entanto, os metabolitos β-hidroxilados retêm actividade biológica e são por isso importantes (Carvalho 1998; Musshoff 2000; Taylor e Sulser 1973). Tal como foi demonstrado nos trabalhos experimentais da presente dissertação, quer a 4-MTA, quer a 2C-B sofrem esta reacção metabólica no ratinho (Trabalho I e Trabalho II). Apesar da β-hidroxilação da *d*-anfetamina não estar descrita para o ratinho (Caldwell 1980), foi administrado sulfato de *d*-anfetamina aos ratinhos numa tentativa de confirmar a identidade dos metabolitos β-hidroxilados encontrados para a 4-MTA e para a 2C-B, tendo sido provado que esta espécie animal era capaz de produzir estes metabolitos também a partir da *d*-anfetamina (Trabalho I e Trabalho II). No entanto, ao contrário do que acontece com a *d*-anfetamina que origina preferencialmente a fenilpropanolamina [metabolito com configuração R (-)], observou-se que os dois metabolitos β-hidroxilados da 2C-B e da 4-MTA se formavam em idênticas proporções, o que sugere uma via alternativa para a formação destes metabolitos a partir dos dois análogos anfetamínicos em estudo.

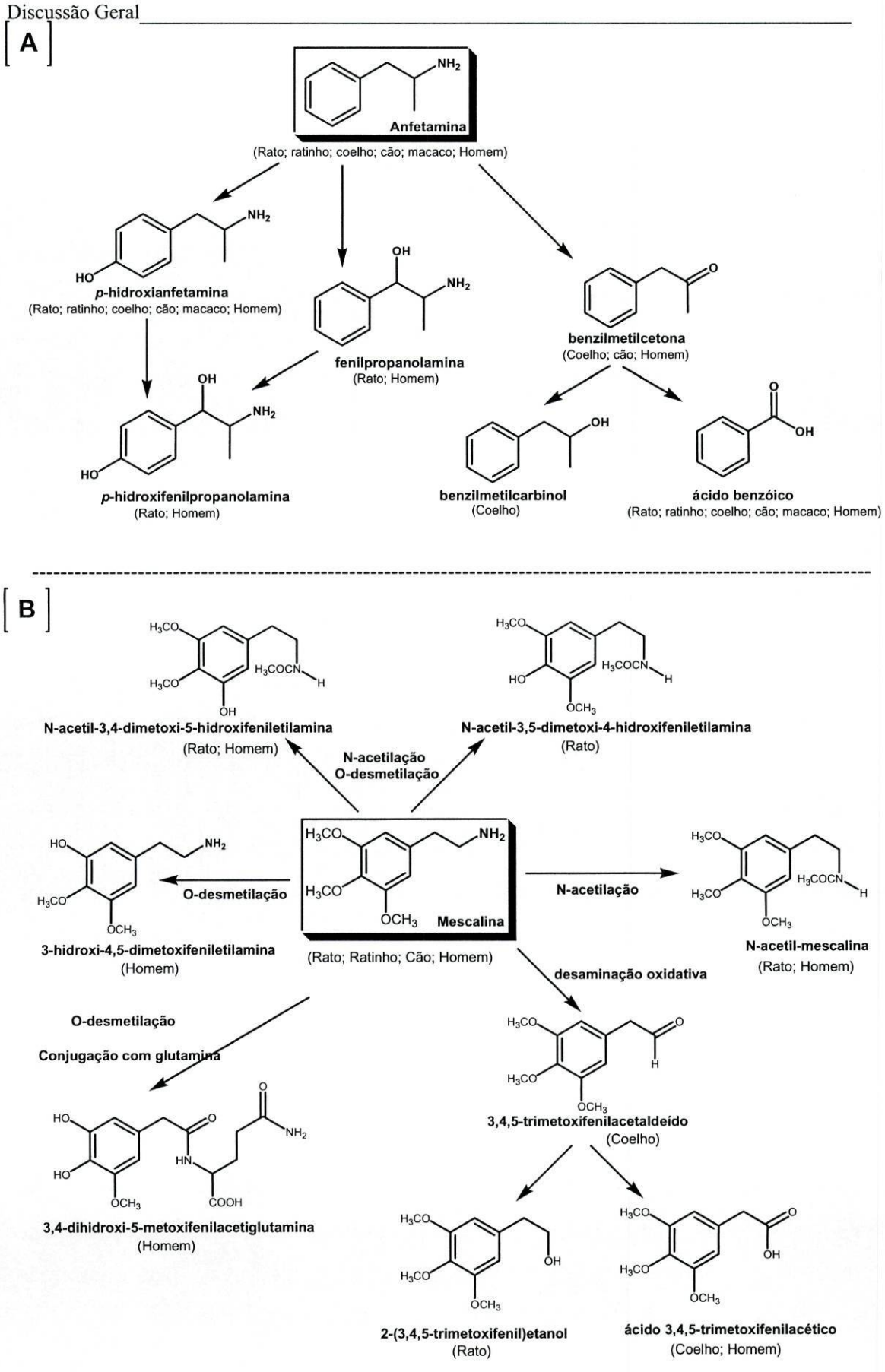


Figura 18. Vias metabólicas documentadas para a *d*-anfetamina (Fase I) [A; adaptado de (Caldwell 1980)] e para a mescalina [B; adaptado de (Kapadia e Fayez 1970)] no Homem e em diferentes espécies animais.

A desaminação oxidativa da *d*-anfetamina envolve a oxidação do carbono α da cadeia lateral ou alternativamente a N-hidroxilação do grupo amina terminal, resultando na excreção da respectiva cetona (benzilmetilcetona), álcool secundário (benzilmetilcarbinol) ou ácido benzóico (Caldwell 1980). Esta reacção é catalizada pelas isoenzimas do citocromo P450 (Parkinson 2001), sendo as enzimas da família CYP2C particularmente importantes nesta reacção metabólica (Kraemer e Maurer 2002; Shiiyama *et al.* 1997; Yamada *et al.* 1997). A eliminação do ácido benzóico é feita por conjugação com a glicina, resultando na excreção, predominantemente renal, do ácido hipúrico. Esta reacção de conjugação é catalizada pela enzima acil-coenzima A sintetase e requer ATP (Parkinson 2001). Esta via metabólica está documentada para a *d*-anfetamina em todas as espécies animais estudadas e é muito significativa no Homem, constituindo, neste caso, a principal via metabólica descrita (Caldwell 1980). Estas vias metabólicas são genericamente associadas a um processo de diminuição da toxicidade das anfetaminas, e foram identificadas no ratinho, nos estudos da presente dissertação, quer para a 4-MTA (com a excreção do ácido 4-metiltiobenzóico; Trabalho I) quer para a 2C-B (com a excreção do ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético e respectivo conjugado com a glicina, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico, bem como dos respectivos ácidos O-desmetilados no grupo metoxilo substituinte na posição 2 do anel aromático; Trabalho II).

No caso das feniletilaminas, como por exemplo a mescalina e a 2C-B, que não apresentam um grupo metilo substituinte no carbono α, a desaminação oxidativa pode ser catalizada pela MAO (resultando na formação do respectivo ácido fenilacético) (Demisch e Seiler 1975; Seiler e Demisch 1974b; Shah e Himwich 1971; Watanabe *et al.* 1995), que é também crucial para a metabolização e consequente desactivação biológica das monoaminas neurotransmissoras. Neste caso ocorre a formação de um intermediário, não de estrutura cetónica, mas sim de um aldeído, cuja formação foi já observada para a mescalina *in vitro* (Watanabe *et al.* 1995). A saturação desta via enzimática devida à presença de outros substratos e/ou inibidores, como por exemplo as drogas de abuso que partilham a estrutura das feniletilaminas, pode contribuir para o prolongamento dos efeitos de estimulação mediados pelos neurotransmissores, cujo tempo de permanência na fenda sináptica pode ser desta forma significativamente aumentado, estando estes disponíveis para a estimulação dos receptores envolvidos na resposta biológica e toxicológica dos derivados anfetamínicos.

No Homem, o perfil metabólico das anfetaminas é também dependente da sua interacção com a enzima CYP2D6. As anfetaminas, enquanto classe de compostos, interactuam com esta enzima como substratos e/ou inibidores (Wu *et al.* 1997). Isto significa que o perfil metabólico pode variar em função da dose ingerida, não só devido ao fenómeno de saturação das vias metabólicas, mas também pela própria inibição da CYP2D6 e de outras enzimas envolvidas nas principais reacções metabólicas, o que pode trazer consequências ao nível toxicológico.

Por fim, a conjugação do grupo amina terminal da cadeia lateral, que parece ser rara e restrita a algumas espécies animais (rato, coelho e cavalo) no caso da *d*-anfetamina, não foi identificada no ratinho, quer para a 4-MTA, quer para a 2C-B, nos estudos da presente dissertação. No entanto, a avaliação do perfil metabólico da 2C-B no rato revelou a produção deste metabolito por esta espécie animal (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003).

Nos presentes trabalhos realizados para a avaliação do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B no ratinho, não foi estudada a possibilidade de excreção de metabolitos conjugados com grupos sulfato e/ou glucuronídeo. Dada a natureza das reacções de biotransformação observadas é de prever que pelo menos parte destes metabolitos sofra estas reacções de conjugação. Para a 4-MTA, no estudo realizado em humanos (Ewald *et al.* 2005), foi detectado o álcool secundário correspondente à redução do derivado cetónico que por oxidação origina também o ácido 4-metiltiobenzóico, em maior abundância na urina após hidrólise enzimática, indicando por isso uma excreção parcial do metabolito na forma de sulfato e/ou de glucuronídeo (Ewald *et al.* 2005). Este metabolito não foi detectado na urina de ratinho, embora os estudos realizados indiquem que a via metabólica de desaminação oxidativa que origina este metabolito seja uma das principais vias de metabolização da 4-MTA nesta espécie animal (Trabalho I). Para a 2C-B, estudos realizados no rato demonstraram que os metabolitos contendo um grupo hidroxilo foram maioritariamente excretados na forma de conjugados, com excepção do metabolito O-desmetilado na posição 2 do anel aromático (Kanamori *et al.* 2003). Apesar da elevada probabilidade de conjugação dos metabolitos hidroxilados excretados pelo ratinho, nas condições experimentais do Trabalho II não foi possível detectar a presença destes conjugados.

Quando comparado o perfil metabólico no ratinho e no Homem (Figura 16) pode ser observado que as mesmas vias metabólicas participam na biotransformação da 4-MTA. Relativamente à 2C-B, dada a escassa informação existente quanto ao seu

metabolismo em humanos, não é possível chegar a esta conclusão. No entanto, dada a sobreposição entre as vias metabólicas da 2C-B e dos seus análogos, anfetamina e mescalina, é legítimo supor que o perfil farmacocinético observado no ratinho nos estudos da presente dissertação, se aproxime ao do Homem. Pelo contrário, os estudos efectuados no rato (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003) apontam para algumas diferenças significativas no perfil metabólico relativamente ao Homem (de Boer *et al.* 1999c; Pilon 1997) (ver Figura 17). Por exemplo, a N-acetilação da 2C-B (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003), que é característica do metabolismo das anfetaminas no rato é rara ou inexistente no Homem e no ratinho (Caldwell 1980). Da mesma forma, nos estudos realizados no rato foi observada a formação de ambos os isómeros O-desmetilados, enquanto que no Homem (Pilon 1997), tal como no ratinho (Trabalho II), a desmetilação parece ocorrer preferencialmente no grupo metoxilo substituinte da posição 2 do anel aromático. Por outro lado, os metabolitos β-hidroxilados e o ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico não parecem ser formados *in vivo* pelo rato (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003).

Dada a semelhança qualitativa no perfil metabólico destes dois derivados anfetamínicos observada no ratinho (Trabalho I e Trabalho II) e no Homem (de Boer *et al.* 1999c; Ewald *et al.* 2005; Pilon 1997), foi proposto que, do ponto de vista farmacocinético, o ratinho seria um bom modelo animal para a prossecução de estudos toxicológicos com estas drogas de abuso. No entanto, na ausência de uma análise quantitativa, esta conclusão não pode ser tomada como definitiva. Um dos exemplos que melhor ilustra a importância das diferenças quantitativas ao nível do perfil metabólico na diferente expressão de efeitos tóxicos é o da neurotoxicidade da MDMA no rato e no ratinho (Easton e Marsden 2006). É bem conhecida a diferente susceptibilidade destas duas espécies de roedores aos efeitos neurotóxicos da MDMA (Easton e Marsden 2006; Green *et al.* 2003). No rato, a neurotoxicidade induzida pela MDMA afecta, tal como no Homem, a neurotransmissão serotonérgica. No ratinho, não só foi observada uma maior resistência aos efeitos neurotóxicos (que para serem observados requerem a administração de doses superiores) como os efeitos observados reflectem essencialmente uma toxicidade para as vias dopaminérgicas, sendo diminuto o efeito ao nível da neurotransmissão serotonérgica (Easton e Marsden 2006; Green *et al.* 2003; Logan *et al.* 1988; Stone *et al.* 1987). Uma das explicações propostas para esta diferente expressão de toxicidade foi as diferenças inter-espécies na farmacocinética da MDMA (Easton e Marsden 2006; Logan *et al.* 1988; Stone *et al.* 1987). Apesar de não

existirem diferenças qualitativas na biotransformação da MDMA no rato e no ratinho, as diferenças quantitativas na excreção da MDMA não biotransformada são substanciais, sendo que o ratinho excreta uma maior percentagem da dose administrada na forma de MDMA não biotransformada (72%) comparativamente ao rato (35%) (Lim *et al.* 1992). Segundo estes autores, esta poderá ser a razão pela qual se observa uma maior resistência do ratinho aos efeitos neurotóxicos da MDMA. Estudos subsequentes conduzidos pelo mesmo grupo de investigadores revelaram que existem também diferenças significativas na estereoselectividade do metabolismo entre estas duas espécies (Lim *et al.* 1993). O ratinho apresenta uma excreção urinária do enantiómero S-(+)-MDMA, que está associado aos efeitos tóxicos da droga (Fantegrossi *et al.* 2003; Johnson *et al.* 1988), duas vezes superior à do rato (Lim *et al.* 1993).

O estudo comparativo do metabolismo da 4-MTA e da 2C-B inter-espécies foi subsequentemente realizado em hepatócitos criopreservados nos Trabalhos III e IV, que tiveram por objectivo estabelecer uma comparação entre o perfil metabólico destas duas drogas de abuso em diferentes espécies animais, incluindo o Homem, recorrendo a um modelo de estudo *in vitro* que permitiu averiguar simultaneamente a citotoxicidade destes compostos.

6.3. Avaliação do perfil metabólico de novos derivados anfetamínicos in vitro em hepatócitos isolados de diferentes espécies animais

A possibilidade de prever o metabolismo *in vivo* no Homem, a partir de modelos *in vitro* reveste-se de particular interesse no caso das drogas de abuso, uma vez que, tal como foi já referido, os estudos farmacocinéticos em humanos são extremamente limitados por motivos de ordem ética. Por outro lado, a comparação do metabolismo inter-espécies é também fundamental no que respeita à selecção e validação dos modelos animais para os estudos toxicológicos. Esta comparação reveste-se de particular importância no caso das anfetaminas, uma vez que a *d*-anfetamina constitui um exemplo paradigmático das diferenças inter-espécies no metabolismo (ver Figura 18 e Tabela 7) (Caldwell 1980).

Tabela 7. Resumo do perfil metabólico da *d*-anfetamina e análogos em diferentes espécies animais e no Homem

	Extensão do metabolismo por via metabólica[a]			
Espécie	**Hidroxilação aromática**	**N-desalquilação**	**Desaminação oxidativa**	**Excreção sem biotransformação**
Rato	Elevada	Variável	Muito baixa	Baixa
Ratinho	Moderada	Não identificada	Elevada	Moderada
Coelho	Baixa	Elevada	Elevada	Baixa
Cão	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
Macaco Rhesus	Baixa	Não identificada	Moderada	Moderada
Homem	Variável	Moderada	Elevada	Moderada

[a] Baixa: entre 1 a 10% da dose administrada; Moderada: entre 10 a 30%; Elevada: superior a 30%
Adaptado de (Caldwell 1980)

Nos Trabalhos III e IV foram utilizados hepatócitos humanos como modelo *in vitro* para a previsão do metabolismo *in vivo* da 4-MTA e da 2C-B. Foram também utilizados hepatócitos de cinco espécies animais: macaco, cão, coelho, rato e ratinho. Foi possível estabelecer uma comparação entre o metabolismo hepático nas diferentes espécies animais e no Homem e, por outro lado, comparar os resultados previamente obtidos no ratinho *in vivo* (Trabalho I e Trabalho II) com os do modelo *in vitro*.

A utilização dos hepatócitos permitiu ainda avaliar a citotoxicidade destas duas drogas.

6.4. Caracterização do perfil metabólico da 4-MTA e da 2C-B *in vitro* usando hepatócitos criopreservados humanos e de cinco diferentes espécies animais.

O modelo *in vitro* com hepatócitos isolados pode ser usado para a previsão do metabolismo *in vivo*. Os hepatócitos isolados (hepatócitos primários) têm sido amplamente usados em estudos farmacológicos e toxicológicos, nomeadamente para estudos de metabolismo e de citotoxicidade, incluindo estudos de mutagenicidade (Hengstler *et al.* 2000a; Hengstler *et al.* 2000b; Li *et al.* 1999a; Steinberg *et al.* 1999). O recurso aos hepatócitos criopreservados deve-se à grande limitação existente no que respeita à disponibilidade de tecido hepático humano para a obtenção de hepatócitos isolados. O uso destas células criopreservadas em suspensão tem sido recomendado para estudos de metabolismo e de toxicidade de curta duração (idealmente entre 2 a 4 h e por um período máximo de 8 h), enquanto que para estudos mais prolongados se

recomenda o uso destas células em cultura (Hengstler *et al.* 2000a; Hengstler *et al.* 2000b; Steinberg *et al.* 1999). A viabilidade dos hepatócitos criopreservados é normalmente igual ou superior a 80% da viabilidade dos hepatócitos pós-isolamento, enquanto que a actividade metabólica das enzimas de fase I e de fase II é cerca de 60% relativamente à dos hepatócitos pós-isolamento (Hengstler *et al.* 2000b). Apesar do decréscimo de actividade enzimática, a sua utilização em estudos metabólicos e toxicológicos é considerada viável e proporciona um bom modelo para o estudo comparativo e previsão do metabolismo e hepatotoxicidade de xenobióticos em humanos (Hengstler *et al.* 2000b; Li *et al.* 1999a; Steinberg *et al.* 1999).

Num estudo conduzido por Green e colaboradores, semelhante ao que foi efectuado nos Trabalhos III e IV com hepatócitos criopreservados para a 4-MTA e 2C-B, em que foi feita a comparação do metabolismo da *d*-anfetamina em hepatócitos frescos de cinco espécies diferentes, incluindo a espécie humana, foi concluído que o metabolismo desta droga *in vitro* era semelhante ao já bem conhecido metabolismo *in vivo* pelas respectivas espécies animais (Green *et al.* 1986). De facto, neste estudo, a principal via de metabolização da *d*-anfetamina no rato foi a hidroxilação aromática, enquanto que no coelho a *d*-anfetamina foi quase exclusivamente metabolizada por desaminação oxidativa. Do mesmo modo, o metabolito maioritariamente excretado na urina do rato é a *p*-hidroxianfetamina, enquanto que o coelho excreta maioritariamente os metabolitos ácido benzóico, benzilmetilcarbinol, e benzilmetilcetona (Caldwell 1980) (ver Figura 18). Neste estudo com a *d*-anfetamina, nos hepatócitos humanos, de macaco e de cão, a via da desaminação oxidativa predominou sobre a hidroxilação aromática, mas ambas as vias metabólicas pareceram ser importantes ao nível hepático. Também neste estudo os hepatócitos que mais extensamente metabolizaram a *d*-anfetamina foram os do coelho. Em termos de perfil metabólico e extensão de metabolização, a espécie animal mais aproximada ao Homem foi o macaco (Green *et al.* 1986).

Também nos estudos realizados no âmbito da presente dissertação, com hepatócitos isolados incubados com a 4-MTA (Trabalho III) e com a 2C-B (Trabalho IV), pôde ser observada uma semelhança entre o metabolismo *in vivo* e *in vitro* (ver Figura 16, Figura 17, Figura 19 e Figura 20). Tal como aconteceu *in vivo* no ratinho (Trabalho I e Trabalho II), a 4-MTA foi pouco metabolizada pelos hepatócitos de todas as espécies (Trabalho III) enquanto que a 2C-B foi extensamente metabolizada (Trabalho IV). Para ambos os compostos, o maior grau de metabolização foi observado nos hepatócitos de coelho. Esta espécie animal parece ser mais competente na

metabolização das anfetaminas pela via da desaminação oxidativa (Caldwell 1980). Pelo contrário, no rato, esta via metabólica é minoritária, sendo a hidroxilação aromática a via preferencial (Caldwell 1980). Desta forma, enquanto a produção de ácido metiltiobenzóico foi maior nos hepatócitos de coelho, os hepatócitos de rato não formaram o metabolito em quantidades detectáveis nas condições experimentais utilizadas no Trabalho III. Também para a 2C-B, o perfil metabólico observado nos hepatócitos de coelho indica uma clara preferência pela desaminação oxidativa. Para além da maior capacidade metabólica dos hepatócitos de coelho, as diferenças inter-espécies observadas no perfil metabólico da 2C-B e da 4-MTA foram moderadas.

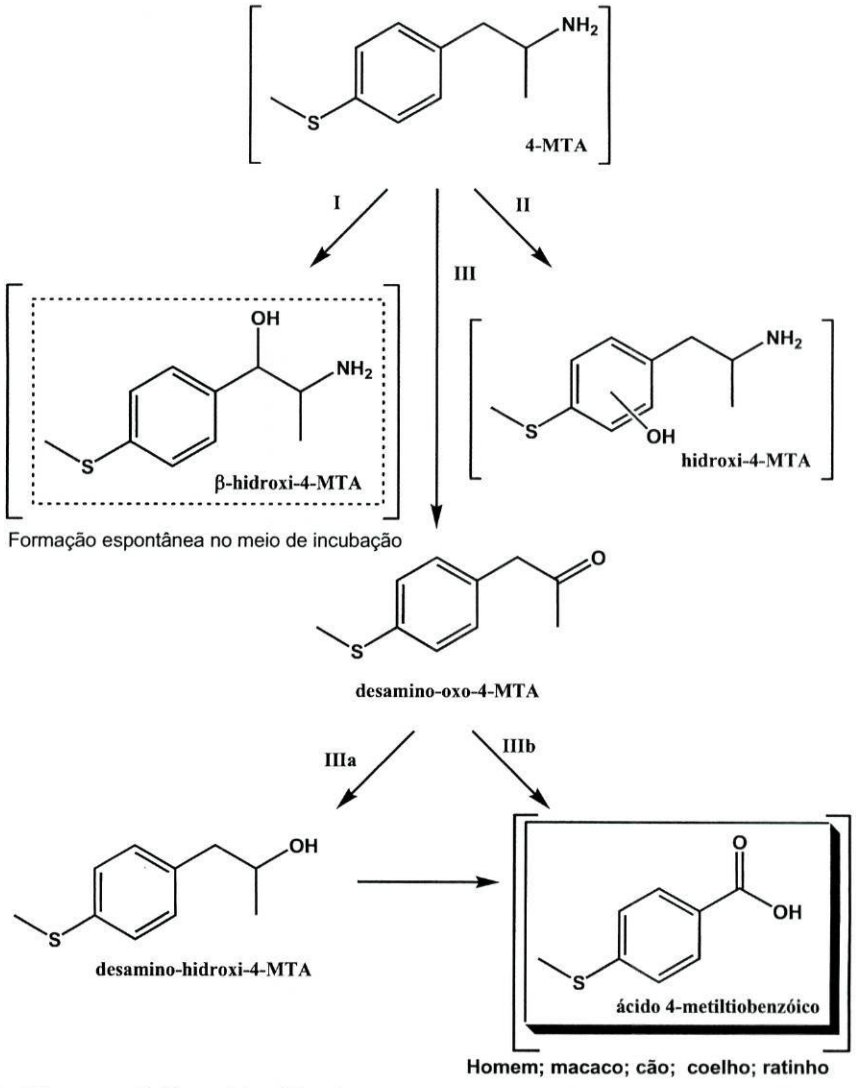


Figura 19. Vias metabólicas identificadas *in vitro* para a 4-MTA nos hepatócitos (Trabalho III) e comparação com os estudos *in vivo* efectuados no Homem (Ewald *et al.* 2005) e no ratinho. Delimitados por parêntesis rectos indicam-se os metabolitos identificados também *in vivo* no ratinho. Indicam-se igualmente as espécies onde foi identificado o ácido 4-metiltiobenzóico, o único metabolito produzido pelos hepatócitos *in vitro*.

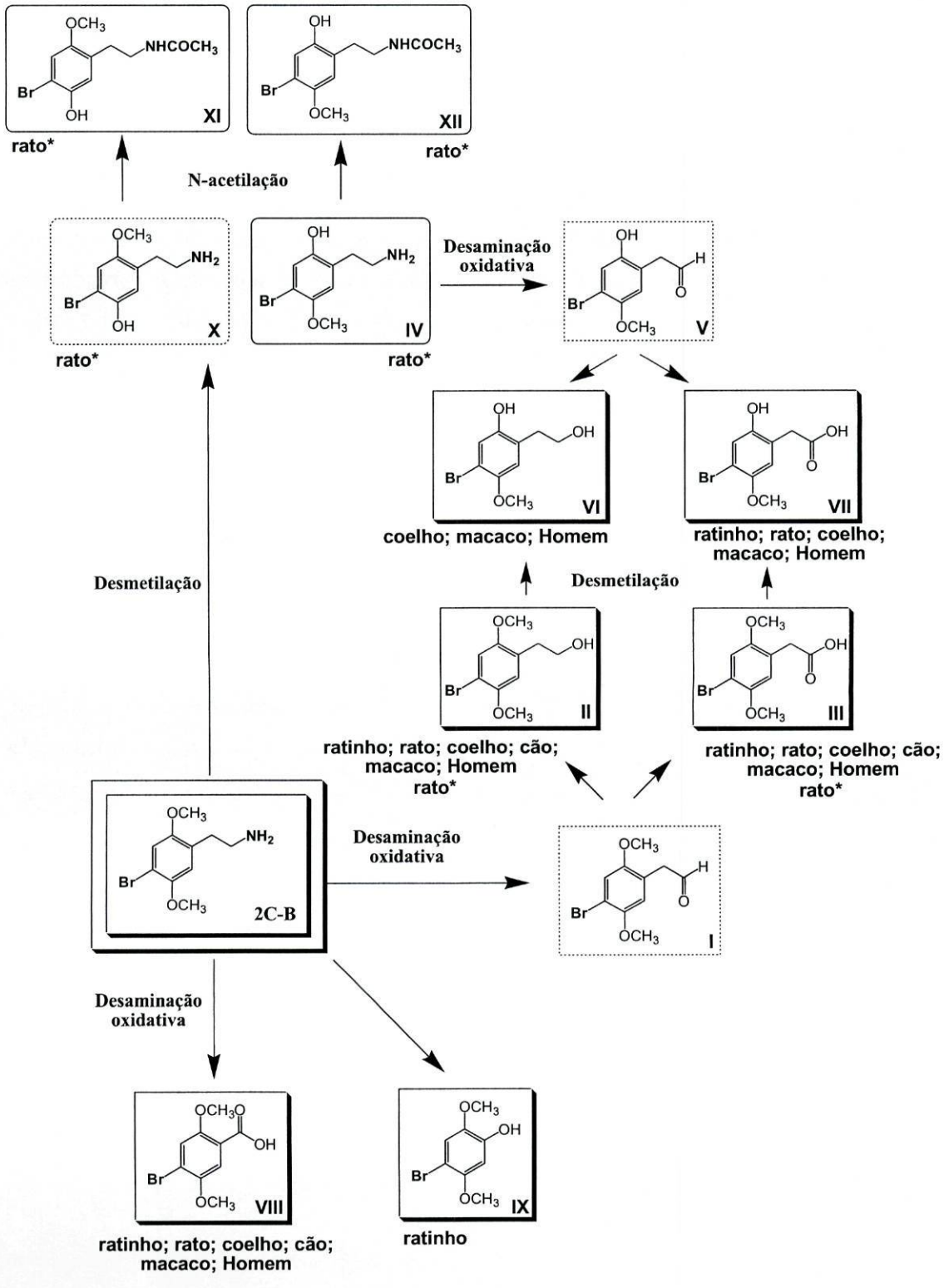


Figura 20. Vias metabólicas propostas para a 2C-B *in vitro* nos hepatócitos (Trabalho IV) e comparação com um estudo em hepatócitos de rato (Kanamori *et al.* 2005). As estruturas delimitadas a tracejado correspondem a intermediários que não foram identificados nos estudos. Indicam-se para os diferentes metabolitos as espécies onde foi identificada a sua presença. Os metabolitos encontrados no estudo de Kanamori e colaboradores encontram-se assinalados com *. I, 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacetaldeído; II, 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-etanol; III, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético; IV, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina; V, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacetaldeído; VI, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletanol; VII, ácido 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacético; VIII, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico; IX, 4-bromo-2,5-dimetoxifenol; X, 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxi-feniletilamina; XI, 1-acetoamino-2-(2-metoxi-4-bromo-5-hidroxifenil)-etano ou 5-O-desmetil-N-acetil-2C-B; XII, 1-acetoamino-2-(2-hidroxi-4-bromo-5-metoxifenil)-etano ou 2-O-desmetil-N-acetil-2C-B.

Quando comparado o perfil metabólico *in vivo* (Trabalhos I e II) e *in vitro* (Trabalhos III e IV) no ratinho, foram identificadas as mesmas vias metabólicas, o que vem confirmar a utilidade deste modelo *in vitro* para a previsão do metabolismo *in vivo*. No entanto, quer para a 4-MTA quer para a 2C-B, foram detectados mais metabolitos na urina de ratinho do que *in vitro*. No caso da 4-MTA apenas foi observada a formação do ácido 4-metiltiobenzóico nas incubações *in vitro*, enquanto que *in vivo* foram encontrados também dois metabolitos hidroxilados na urina de ratinho (ver Figura 16 e Figura 19). Para a 2C-B, os metabolitos 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina, 2-(4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenil)-etanol, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenacetúrico e β-hidroxi-2C-B, não foram encontrados *in vitro* (ver Figura 17 e Figura 20). Uma das limitações do uso de hepatócitos em suspensão é o curto tempo de incubação. Deste modo, enquanto que a recolha da urina nos estudos *in vivo* foi feita durante 24 h, o tempo máximo de incubação dos hepatócitos em suspensão durante o qual se mantêm os níveis aceitáveis de integridade celular nas incubações controlo é de 3 h. Por este motivo este modelo pode não permitir detectar metabolitos cuja formação é mais lenta, sendo detectados mais facilmente aqueles cuja formação é preferencial. Isto poderá explicar a razão pela qual *in vivo* foram detectados os metabolitos da 2C-B, 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina e 2-(4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenil)-etanol, enquanto que *in vitro* apenas foi encontrado o metabolito que resulta da mesma via metabólica, o ácido 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacético. Também a formação de conjugados (como por exemplo, o ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenacetúrico) é frequentemente difícil de observar neste modelo (Hengstler *et al.* 2000a; Hengstler *et al.* 2000b), sendo preferido para este efeito o uso de hepatócitos em cultura celular. Uma outra explicação para as diferenças observadas *in vivo* e *in vitro* é a possibilidade da ocorrência de metabolismo extra-hepático. Por exemplo, a formação dos metabolitos β-hidroxilados catalizada pela enzima dopamina-β-hidroxilase ocorre nos terminais nervosos ao nível intraneuronal (Caldwell 1980), o que explica a ausência destes metabolitos nas incubações da 2C-B *in vitro* e indica que a sua formação observada nas incubações *in vitro* da 4-MTA se deve a uma formação espontânea, o que foi posteriormente confirmado pela análise das incubações do composto na ausência de hepatócitos.

Comparando os resultados obtidos nos hepatócitos humanos com os dados disponíveis na literatura acerca do metabolismo destas drogas *in vivo* em humanos, enquanto para a 4-MTA [(Ewald *et al.* 2005) e Trabalho III] (ver Figura 19) o espectro de metabolitos formado foi menor, no caso da 2C-B [(de Boer *et al.* 1999c; Pilon 1997)

e Trabalho IV] foram encontrados mais metabolitos *in vitro* do que os que foram identificados *in vivo*. No caso do metabolismo *in vivo* da 2C-B, o estudo foi limitado tendo sido analisada a urina de um único voluntário humano, o que poderá explicar a pequena quantidade de metabolitos encontrada (de Boer *et al.* 1999c; Pilon 1997). Para a 4-MTA foram analisadas urinas de cinco indivíduos diferentes. A formação dos metabolitos desamino-oxo-4-MTA e desamino-hidroxi-4-MTA foi apenas detectada *in vivo* em humanos (Ewald *et al.* 2005). Estes metabolitos resultam da mesma via metabólica que dá origem à formação do ácido 4-metiltiobenzóico, detectado *in vivo* e *in vitro*, o que indica que muito provavelmente a sua formação *in vitro* poderá ocorrer mas em quantidades diminutas (a um nível não detectável pela sensibilidade dos métodos aplicados), sendo preferencial a formação do derivado benzóico.

Um resultado particularmente interessante foi a formação espontânea dos metabolitos β-hidroxilados da 4-MTA no meio de incubação. A formação destes metabolitos *in vivo* é estereoselectiva no caso da *d*-anfetamina, como resultado da catálise enzimática pela enzima dopamina-β-hidroxilase, tendo como resultado a excreção preferencial da fenilpropanolamina (Caldwell 1980). O mesmo não foi observado *in vivo* para a 4-MTA e para a 2C-B cuja excreção de ambos os estereoisómeros ocorreu em quantidades semelhantes. Deste modo, no caso da 4-MTA, a possibilidade de formação destes metabolitos sem a intervenção da catálise enzimática pode explicar a aparente falta de estereoselectividade na sua excreção.

Comparando os resultados obtidos no trabalho experimental da presente dissertação para o metabolismo da 2C-B nos hepatócitos criopreservados de rato (Trabalho IV) com um estudo conduzido por Kanamori e colaboradores em hepatócitos de rato mantidos em cultura, foram detectados metabolitos comuns, nomeadamente o 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletanol e o ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético (Kanamori *et al.* 2005). Para além destes metabolitos, estes autores identificaram a 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifeniletilamina, que embora não tenha sido detectada directamente no modelo experimental da presente dissertação (Trabalho IV) pode ser considerada como um composto intermediário na formação do ácido 4-bromo-2-hidroxi-5-metoxifenilacético. Por outro lado, a formação dos metabolitos N-acetilados após O-desmetilação do metoxilo substituinte da posição 2 do anel aromático da 2C-B, identificados no referido estudo (Kanamori *et al.* 2005), ocorreu de forma espontânea nas condições experimentais adoptadas nos estudos da presente dissertação (Trabalho IV). Estes mesmos autores tinham já estudado previamente o metabolismo da 2C-B *in*

vivo, no rato, e concluído que nesta espécie animal as vias metabólicas mais importantes são a O-desmetilação e a N-acetilação, com menor expressão da desaminação oxidativa (Kanamori *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2003). De facto, tendo em conta o metabolismo da *d*-anfetamina (Caldwell 1980), é de prever que a N-acetilação ocorra também para a 2C-B nesta espécie animal. Contudo, estes autores verificaram, em concordância com os resultados obtidos nos estudos da presente dissertação (Trabalho IV), que *in vitro* a desaminação oxidativa assume uma maior importância do que *in vivo* (Kanamori *et al.* 2005).

6.5. Caracterização da citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B em hepatócitos criopreservados humanos e de cinco espécies animais diferentes

O modelo *in vitro* de hepatócitos criopreservados (e também de hepatócitos pós-isolamento no caso dos dadores humanos) utilizado nos estudos da presente dissertação (Trabalhos III e IV), permitiu a avaliação da citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B para os hepatócitos das várias espécies animais estudadas, incluindo a espécie humana, através da quantificação do conteúdo intracelular de ATP.

Apesar de não ter sido realizado um estudo de concentração/resposta, foi observado que, para ambos os compostos, 4-MTA e 2C-B, e nas condições experimentais utilizadas, a concentração de 100 μM pode ser considerada como não citotóxica (perda de ATP celular no final das três horas de incubação nunca superior a 20% relativamente à observada nos controlos das espécies para as quais foi possível efectuar o tratamento estatístico dos dados: Homem, coelho e macaco). A concentração de 1000 μM resultou na indução significativa de citotoxicidade avaliada através da perda de viabilidade celular dos hepatócitos em todas as espécies estudadas (perda de viabilidade celular no final das três horas de incubação sempre superior a 50% relativamente à observada nos controlos das espécies para as quais foi possível efectuar o tratamento estatístico dos resultados: Homem, coelho e macaco). Esta concentração é relativamente baixa quando comparada às concentrações hepatotóxicas da MDMA (superiores a 1600 μM) em condições experimentais semelhantes nos hepatócitos de ratinho (Carvalho *et al.* 2001) e à *d*-anfetamina (superiores a 2 mM) em hepatócitos

isolados de rato (Carvalho *et al.* 1996), indicando uma maior toxicidade da 4-MTA e da 2C-B relativamente aos seus análogos.

As concentrações testadas nos estudos *in vitro* para a caracterização da citotoxicidade das anfetaminas são geralmente superiores às concentrações plasmáticas encontradas em indivíduos intoxicados com estes compostos (Capela *et al.* 2006a; Carvalho *et al.* 2004b; Carvalho *et al.* 2004c; Simantov e Tauber 1997; Stumm *et al.* 1999), o que permite legitimamente questionar a relevância dos efeitos observados *in vitro* para estas concentrações elevadas. Os estudos metabólicos *in vitro* requerem o uso de concentrações mais elevadas comparativamente às esperadas *in vivo* porque a capacidade metabólica dos modelos *in vitro* é frequentemente menor do que a do tecido hepático intacto. Da mesma forma, os estudos de toxicidade *in vitro* são realizados num intervalo de tempo relativamente curto, em contraposição aos estudos *in vivo* de maior duração, pelo que a observação de um efeito tóxico *in vitro* para uma concentração elevada indica a possibilidade de ocorrência desse efeito *in vivo*, para concentrações inferiores, mas associadas a uma exposição mais prolongada. No que diz respeito à 4-MTA, as concentrações plasmáticas encontradas em indivíduos intoxicados com esta droga de abuso variam grandemente, tendo sido relatados valores entre 7,7 e 26,9 μM (Decaestecker *et al.* 2001; Elliott 2000; EMCDDA 1999; Poortman e Lock 1999). Contudo, as concentrações atingidas nos tecidos podem ser substancialmente mais elevadas. A análise *post-mortem* conduzida num caso de uma intoxicação fatal com 4-MTA revelou concentrações de 170 μM no fígado e 201,6 μM no cérebro (concentração sanguínea de 5,36 μM), indicando que esta droga se concentra ao nível tecidular (Decaestecker *et al.* 2001). Outros estudos *post-mortem* realizados para derivados anfetamínicos, como por exemplo a MDMA, indicaram que as concentrações da droga no fígado podem ser até 18 vezes superiores à concentração sanguínea (de Letter *et al.* 2006) e 30 vezes mais elevadas no cérebro (Garcia-Repetto *et al.* 2003). Deve ainda ser salientado que estes estudos *post-mortem* são muitas vezes realizados após um tempo de sobrevida elevado e podem por isso subestimar as concentrações atingidas em vida, uma vez que os tratamentos para controlo das intoxicações quando as vítimas são hospitalizadas levam a uma diminuição dos níveis detectados dos compostos. Deste modo, as concentrações de 4-MTA testadas podem ser consideradas relevantes para a extrapolação dos resultados. Para a 2C-B não existem dados na literatura acerca de intoxicações em humanos. Por outro lado, a 2C-B não apresenta reactividade nos imunoensaios vulgarmente empregues para a detecção de anfetaminas em casos de

intoxicação, pelo que pode não haver uma associação à ingestão de 2C-B (de Boer *et al.* 1999b). No entanto, uma vez que a 2C-B é geralmente consumida em doses relativamente baixas (os comprimidos apreendidos continham quantidades de 2C-B inferiores a 20 mg) (de Boer *et al.* 1999b; Giroud *et al.* 1998), não é de esperar que as concentrações plasmáticas e tecidulares sejam tão elevadas quanto as que têm sido observadas para a 4-MTA, MDMA, e outros derivados anfetamínicos que são ingeridos em doses mais elevadas. Deste modo, apesar da citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B nos hepatócitos ter sido superior à previamente observada para outros análogos anfetamínicos, nomeadamente a *d*-anfetamina e a MDMA (Carvalho *et al.* 1996; Carvalho *et al.* 2001), estes resultados, que permitem antever um elevado potencial de hepatotoxicidade da 4-MTA, à semelhança do que foi já observado com a MDMA (Carvalho *et al.* 2001), não suscitam igual preocupação no caso da 2C-B, pois dificilmente esta droga atingirá níveis tão elevados no fígado.

Da comparação da citotoxicidade das duas drogas nos hepatócitos das várias espécies estudadas, pode ser concluído que as diferenças inter-espécie observadas são moderadas (ver Figura 2 do Trabalho III e Figura 3 do Trabalho IV). Apenas os hepatócitos de coelho parecem ser menos susceptíveis à perda de viabilidade. Por exemplo, após duas horas de incubação com a 4-MTA na concentração de 1000 μM, a viabilidade da suspensão celular dos hepatócitos de coelho era 78% relativamente às suspensões controlo, enquanto que estes valores nos hepatócitos humanos e de macaco eram 51% e 49%, respectivamente. Por sua vez, a incubação da 2C-B na concentração de 1000 μM com os hepatócitos de coelho resultou, no final das três horas de incubação, em níveis de ATP da suspensão celular de cerca de 40% relativamente ao controlo, enquanto que nos hepatócitos humanos e de macaco os valores de ATP correspondentes foram inferiores a 20% comparativamente aos respectivos controlos. Esta espécie foi a única para a qual se observou, no caso da 4-MTA, uma diminuição dos níveis desta droga na suspensão celular, indicando deste modo um maior grau de biotransformação. Tal como foi referido anteriormente, foi já demonstrado com a *d*-anfetamina que os hepatócitos de coelho apresentam, para esta droga, uma metabolização mais extensa do que os hepatócitos humanos, de macaco, de cão e de rato (Green *et al.* 1986). Uma possível explicação para a maior resistência dos hepatócitos desta espécie animal é a preferência pela via metabólica da desaminação oxidativa que no coelho foi observada para a *d*-anfetamina tanto *in vivo* (Caldwell 1980) como *in vitro* (Green *et al.* 1986) com formação mais extensa de benzilmetilcetona e de ácido benzóico. Ao contrário do que

acontece com outras reacções metabólicas como, por exemplo, a *p*-hidroxilação aromática da *d*-anfetamina após epoxidação (Carvalho *et al.* 1996) ou a desmetilenação da MDMA com formação de catecóis reactivos (Capela *et al.* 2006b; Carvalho *et al.* 2002b; Carvalho *et al.* 2004a; Carvalho *et al.* 2004b; Carvalho *et al.* 2004c), os metabolitos resultantes da desaminação oxidativa destes análogos não têm sido associados à toxicidade destas drogas quer *in vivo* quer *in vitro*.

Contrariamente à relativa similitude na citotoxicidade para os hepatócitos das diferentes espécies observada *in vitro* nos estudos da presente dissertação, os resultados obtidos com os hepatócitos dos três dadores humanos revelaram acentuadas diferenças na susceptibilidade aos efeitos citotóxicos da 4-MTA e da 2C-B (ver Figura 3 do Trabalho III e Figura 4 do Trabalho IV). Estes resultados não foram afectados pela criopreservação das células uma vez que foram testados paralelamente hepatócitos pós-isolamento e criopreservados. Apesar do pequeno número de dadores testados não permitir concluir com segurança acerca da existência de variabilidade interindividual na expressão de toxicidade destas drogas em humanos, estes resultados vão de encontro ao que tem sido já reconhecido para outros derivados anfetamínicos, nomeadamente a *d*-anfetamina (Mattay *et al.* 2003), MDMA (de Letter *et al.* 2004; Henry *et al.* 1992; O'Donohoe *et al.* 1998; Schifano 2004) e a *p*-metoxianfetamina (Eichelbaum 1984; Kraner *et al.* 2001). Tal como pode ser observado na Tabela 4 e na Tabela 5 para a MDMA, a ausência de uma relação directa entre a ocorrência de efeitos adversos, a dose ingerida, e a respectiva concentração plasmática, faz supor, por um lado, que determinados indivíduos estão particularmente predispostos à ocorrência de toxicidade e, por outro lado, que este fenómeno não é totalmente dependente da sua concentração plasmática, pelo que outros factores, incluindo a bioactivação metabólica, podem contribuir para explicar a variabilidade interindividual no risco de intoxicação com anfetaminas.

Sendo bem conhecido o envolvimento da CYP2D6 na biotransformação da MDMA (Kreth *et al.* 2000; Maurer *et al.* 2000; Tucker *et al.* 1994) e a expressão polimórfica desta enzima em humanos (com consequências profundas na actividade enzimática e capacidade metabolizadora) (Anzenbacher e Anzenbacherová 2001; Ingelman-Sundberg 2004b; Kroemer e Eichelbaum 1995), foi proposto que este polimorfismo poderia pelo menos parcialmente explicar a diferente susceptibilidade aos efeitos tóxicos desta droga de abuso (Ramamoorthy *et al.* 2002; Tucker *et al.* 1994). Estes autores propunham que os indivíduos deficientes na metabolização da MDMA,

como resultado da expressão de variantes polimórficas dotadas de menor (ou mesmo nula) actividade enzimática, estariam mais predispostos à ocorrência de toxicidade devido à acumulação da droga, resultando num aumento exacerbado das concentrações plasmáticas. Tal suposição levou alguns autores a analisarem o genótipo de indivíduos intoxicados com MDMA, na tentativa de encontrar uma associação entre a menor capacidade metabólica determinada geneticamente e a ocorrência de intoxicação. Nenhum dos estudos conduzidos para este efeito revelou tal associação (Gilhooly e Daly 2002; O'Donohoe *et al.* 1998; Schwab *et al.* 1999), o que pôs em causa essa hipótese. Por outro lado, De la Torre e colaboradores conduziram alguns estudos em que foi administrada MDMA a voluntários humanos, tendo conseguido realizar uma caracterização farmacocinética da MDMA. Ao contrário dos estudos realizados com indivíduos intoxicados, a administração da droga foi, neste caso, feita em condições controladas, possibilitando deste modo uma determinação mais rigorosa dos parâmetros farmacocinéticos. Estes autores caracterizaram a cinética da MDMA como não linear, uma vez que com a administração de doses progressivamente mais elevadas não se observou um aumento proporcional da respectiva concentração plasmática (ver Tabela 2 e Tabela 3) (de la Torre *et al.* 2000a; de la Torre *et al.* 2004b). De facto, quer nos estudos em que a MDMA foi administrada em dose única (que revelaram uma diminuição significativa da taxa de eliminação não renal com o aumento das doses administradas) (de la Torre *et al.* 2000a), quer nos estudos em que foram administradas doses repetidas separadas por um intervalo de 24 h (Farré *et al.* 2004), foi concluído que as concentrações plasmáticas atingidas não podiam ser explicadas pela simples acumulação da droga, indiciando fortemente um fenómeno de inibição metabólica com duração superior a 24 h (de la Torre *et al.* 2000a; Farré *et al.* 2004). Foi já demonstrado que, em concentrações elevadas, a MDMA actua como inibidor competitivo da CYP2D6 *in vitro* (Wu *et al.* 1997). Esta inibição ocorre por formação de um complexo com a enzima (Heydari *et al.* 2004) que envolve um carbeno por oxidação de substratos contendo um grupo amina terciária ou um substituinte metilenodioxol (Delaforge *et al.* 1999). A MDMA tem a particularidade de possuir ambos os grupos na sua molécula (Delaforge *et al.* 1999). O carbeno forma complexos estáveis com o Fe(II) e o Fe(III), e esta interacção com o grupo prostético heme das enzimas do citocromo P450 (CYP) é responsável pela inibição da actividade enzimática que se observa *in vivo* e *in vitro* (Delaforge *et al.* 1999; Heydari *et al.* 2004; Segura *et al.* 2005). Esta inibição pode ocorrer dentro do período de uma hora após a ingestão de MDMA em doses

vulgarmente utilizadas para fins recreativos (entre 50 e 150 mg), e os valores basais de actividade enzimática podem apenas ser repostos após um período de pelo menos 10 dias (Yang *et al.* 2006).

Para avaliar a contribuição da CYP2D6 na desmetilenação da MDMA *in vivo*, em humanos, Segura e colaboradores administraram repetidamente paroxetina, um fármaco SSRI que, tal como a MDMA, é simultaneamente substrato e inibidor desta enzima, para que a enzima CYP2D6 estivesse inibida antes da administração de uma dose única de MDMA a voluntários humanos (Segura *et al.* 2005). Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que a inibição da CYP2D6 pela paroxetina produziu alterações profundas nos parâmetros farmacocinéticos da MDMA. A concentração plasmática de MDMA aumentou significativamente como resultado da administração de paroxetina (Segura *et al.* 2005). O tempo ao fim do qual se atingiram as concentrações plasmáticas máximas dos metabolitos N-Me-α-MeDA e o seu derivado monometilado pela COMT, foi maior com o pré-tratamento com paroxetina (2 h e 3 h, respectivamente) comparativamente ao grupo ao qual foi administrado placebo em vez de paroxetina (1 hora e 2 h, respectivamente) (Segura *et al.* 2005). A concentração plasmática de MDA também aumentou significativamente, o que pode resultar quer do aumento da quantidade de MDMA disponível para sofrer N-desmetilação, quer da inibição da conversão da MDA no seu metabolito catecólico α-MeDA que é catalizada pela CYP2D6 (Segura *et al.* 2005). A inibição do metabolismo da MDMA pela paroxetina foi estimada em cerca de 30%. Este valor é inferior ao que foi estimado *in vitro* para a contribuição da CYP2D6 nesta reacção metabólica (entre 50-60%) (Ramamoorthy *et al.* 2002; Tucker *et al.* 1994). Para além da CYP2D6, outras enzimas contribuem para a desmetilenação da MDMA nomeadamente, a CYP1A2 e, em menor extensão, a CYP2B6 e a CYP3A4 (Kreth *et al.* 2000; Maurer *et al.* 2000; Tucker *et al.* 1994). A existência de vias alternativas pode explicar uma menor contribuição da CYP2D6 *in vivo* para a catalisação desta reacção metabólica. Para além disso, os indivíduos que participaram no estudo *in vivo* eram fumadores e podem, consequentemente, apresentar um aumento da actividade enzimática das enzimas da família CYP1A (Dahl 2002; Segura *et al.* 2005). A contribuição da CYP2D6 neste estudo pode, por este motivo, ter sido em certa medida subestimada. Por outro lado, existe a possibilidade de uma interacção bifásica com as CYP, nomeadamente com a CYP1A2, CYP2B6 e CYP3A4, com uma fase inicial inibitória transitória seguida de

uma fase subsequente de indução enzimática que foi demonstrada para compostos com a estrutura química metilenodioxifenilo (Murray 2000).

Segundo De la Torre e colaboradores, a explicação mais provável para a ausência de proporcionalidade entre a concentração plasmática de MDMA e os seus efeitos deve-se a esta cinética não linear que resulta em concentrações plasmáticas anormalmente elevadas relativamente às que seriam de esperar para a ingestão de doses elevadas ou repetidas (de la Torre *et al.* 2004b; Segura *et al.* 2005). Dado que o fenómeno de inibição da CYP2D6 pela MDMA se traduz num pequeno incremento das concentrações plasmáticas, os mesmos autores consideram que a importância do genótipo para a CYP2D6 na expressão dos efeitos tóxicos agudos é diminuta (de la Torre *et al.* 2004b; Segura *et al.* 2005). Por outro lado, sugerem que o aumento da capacidade enzimática da CYP2D6 (que tem origem num fenómeno de amplificação genética (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999; Johansson *et al.* 1993) pode condicionar uma maior susceptibilidade aos efeitos neurotóxicos que resultam da bioactivação metabólica da MDMA (de la Torre *et al.* 2004b; Segura *et al.* 2005).

Desta forma, apesar do reconhecido papel da CYP2D6 na bioactivação metabólica da MDMA, o envolvimento da expressão polimórfica desta enzima na variabilidade interindividual na expressão de toxicidade deste composto permanece controverso.

Com vista a avaliar qual a influência da bioactivação metabólica, e particularmente da expressão polimórfica da CYP2D6, na citotoxicidade das anfetaminas foram conduzidos os estudos em que se utilizou o modelo *in vitro* das células V79 geneticamente transformadas para a expressão de CYP humanas, que permitiu a avaliação da influência da biotransformação na citotoxicidade da MDMA (Trabalho V) e da 4-MTA (Trabalho VI).

6.6. Caracterização da influência do polimorfismo da enzima CYP2D6 na citotoxicidade da MDMA e da 4-MTA

O polimorfismo genético da CYP2D6 constitui um dos exemplos da variação farmacogenética do metabolismo mais extensamente caracterizados, sendo amplamente reconhecidas as consequências deste polimorfismo nas diferenças marcadas na

farmacocinética e efeitos terapêuticos de vários fármacos metabolizados por esta enzima (Ingelman-Sundberg 2004b; Kroemer e Eichelbaum 1995).

A variabilidade da actividade da CYP2D6 no fígado humano é atribuída exclusivamente a polimorfismos genéticos ou à sua inibição uma vez que a CYP2D6 não é indutível (Anzenbacher e Anzenbacherová 2001) e foram já caracterizadas as variantes genéticas responsáveis pelas alterações nos níveis de actividade da CYP2D6. Estas variantes podem corresponder a SNPs que alteram a sequência de aminoácidos da proteína codificada, SNPs que alteram o processamento do mRNA, deleções no gene CYP2D6 (Weinshilboum 2003), ou a expressão de múltiplas cópias do gene *CYP2D6* (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

O alelo *CYP2D6*4* é o mais frequentemente associado ao fenótipo de metabolizador pobre, com uma frequência alélica entre 12% e 21% nas populações caucasianas (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Apresenta sete mutações relativamente ao alelo *CYP2D6*1*, sendo a mutação responsável pelo defeito ao nível do processamento uma substituição G1934A na junção entre o intrão 3 e o exão 4 (Hanioka *et al.* 1990). Este alelo está praticamente ausente nas populações orientais, o que explica a baixa incidência do fenótipo de metabolizadores pobres nestas populações (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Pelo contrário, o alelo *CYP2D6*5*, que corresponde a uma deleção completa do gene *CYP2D6*, apresenta uma frequência muito semelhante em populações de diferentes origens étnicas (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999).

Para além destes dois alelos, foi também identificado um elevado número de alelos mais raros associados ao fenótipo de metabolizador pobre. A expressão do alelo *CYP2D6*9* origina uma enzima com menor actividade catalítica (Tyndale *et al.* 1991). O alelo *CYP2D6*10* é particularmente prevalente nas populações asiáticas (frequência de cerca de 50%) (Johansson *et al.* 1994) e por este motivo estas populações apresentam em média uma menor capacidade metabólica para esta enzima, apesar do fenótipo de metabolizador pobre ser mais raro (cerca de 1%) relativamente aos caucasianos (até 10%). A mutação no exão 1 responsável pela troca de aminoácidos prolina34serina resulta numa proteína instável (Johansson *et al.* 1994). Para além desta mutação, o alelo *CYP2D6*10* apresenta ainda a substituição de aminoácidos serina486treonina (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm). Esta variante origina uma deficiência nas estruturas terciária e quaternária da proteína e consequentemente uma diminuição acentuada na expressão da enzima funcional (Johansson *et al.* 1994). O alelo *CYP2D6*2* está associado ao fenótipo de metabolizador intermédio em populações

caucasianas (Raimundo *et al.* 2000) onde apresenta uma frequência de 25-35% (Ramamoorthy *et al.* 2002; Sachse *et al.* 1997). A presença deste alelo é também elevada em certas populações africanas, nomeadamente na Etiópia (prevalência de 10-29%). Este alelo apresenta relativamente ao alelo *wild type CYP2D6*1* duas mutações que resultam na substituição dos aminoácidos arginina296cisteína e serina486treonina (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm). O alelo *CYP2D6*17* foi identificado numa população do Zimbabwe (Masimirembwa *et al.* 1996). Os portadores deste alelo exibem uma capacidade metabólica diminuída. A variante *CYP2D6*17* parece ser a mais frequente nas populações negra africana do Zimbabwe e afro-americanas (prevalência de 34%) (Masimirembwa *et al.* 1996; Ramamoorthy *et al.* 2002). Esta enzima apresenta menor afinidade para o substrato codeína e para o antagonista β-adrenérgico bufuralol *in vitro* quando comparada à enzima expressa pelo alelo não mutado (Oscarson *et al.* 1997). As mutações deste alelo relativamente ao alelo não mutado resultam nas substituições dos aminoácidos treonina107isoleucina, arginina296cisteína e serina486treonina (Oscarson *et al.* 1997).

Foram também descritos alelos com duas, três, quatro, cinco e treze cópias do gene *CYP2D6* e o número de indivíduos portadores destas múltiplas cópias genéticas é maior nas populações da Etiópia e Arábia Saudita, onde cerca de um terço da população possui este genótipo (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Curiosamente, a incidência de alelos deficientes para o gene *CYP2D6* é muito baixa nestas regiões (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Foi posteriormente demonstrado que as variantes alélicas correspondentes à duplicação ou amplificação do gene *CYP2D6* (*CYP2D6*1XN*, *CYP2D6*2XN* e *CYP2D6*35X2*) têm uma distribuição mais alargada a nível mundial. Estas variantes apresentam uma frequência de 29% em etíopes (Aklillu *et al.* 1996) e de cerca de 1% a 5% em caucasianos (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Nas populações italiana e turca foi já indicada uma incidência deste fenótipo de cerca de 10%, estando praticamente ausente em asiáticos e sendo muito raro nas populações do Norte da Europa (Ingelman-Sundberg *et al.* 1999). Os dados relativamente à população da Europa Ocidental revelam uma incidência geral de 5,5% para a ocorrência do fenótipo de metabolizador ultra-rápido (Ingelman-Sundberg 2004b).

A influência do polimorfismo da CYP2D6 na alteração dos parâmetros farmacocinéticos da MDMA foi documentada *in vitro* (Easton *et al.* 2003; Lin *et al.* 1997; Ramamoorthy *et al.* 2001; Ramamoorthy *et al.* 2002; Tucker *et al.* 1994) e *in vivo* (de la Torre *et al.* 2005; Farré *et al.* 2004). Tucker e colaboradores verificaram que a

desmetilenação da MDMA estava substancialmente comprometida nos microssomas obtidos do fígado de um indivíduo cujo genótipo para a CYP2D6 indicava tratar-se de um metabolizador pobre. A formação do metabolito N-Me-α-MeDA foi inferior nestes microssomas comparativamente à que foi observada nos microssomas obtidos a partir de dois indivíduos genotipados para a CYP2D6 e classificados como metabolizadores extensivos (Tucker *et al.* 1994). Num outro estudo *in vitro* foram utilizadas células geneticamente transformadas para a expressão das variantes *wild-type* (CYP2D6*1) e mutada CYP2D6*10. Os autores compararam a actividade catalítica de ambas as variantes face a diversos substratos e/ou inibidores que incluíram a *p*-metoxianfetamina e a MDMA (Ramamoorthy *et al.* 2001). A capacidade da enzima CYP2D6*10 em metabolizar a MDMA (por abertura do anel metilenodioxilo e formação do catecol) e a *p*-metoxianfetamina (desmetilação do grupo metoxilo) foi significativamente inferior à da enzima não mutada CYP2D6*1 (razão V_{max}/K_m CYP2D6*1/CYP2D6*10 de 34 para a desmetilação da *p*-metoxianfetamina e de 123 para a desmetilenação da MDMA) (Ramamoorthy *et al.* 2001). A MDMA também inibe mais eficientemente a enzima *wild type* (razão K_i CYP2D6*10/K_i CYP2D6*1 de 21) o que indica uma diminuição da afinidade deste substrato para a variante mutada (Ramamoorthy *et al.* 2001). A actividade catalítica e a inibição das variantes foram marcadamente diferentes para os diferentes substratos estudados. Este estudo permitiu concluir, por um lado, que a capacidade catalítica da variante CYP2D6*10 é significativamente inferior à da variante *wild type* e, por outro lado, que quer a actividade catalítica quer a inibição das enzimas varia substancialmente de acordo com o substrato pelo que a capacidade metabólica das diferentes variantes não pode ser generalizada para diferentes substratos (Ramamoorthy *et al.* 2001). Estes mesmos autores investigaram posteriormente a desmetilenação da MDMA em microssomas que expressavam as variantes CYP2D6*2, *10 e *17, todas elas associadas a um decréscimo da actividade catalítica relativamente à enzima não mutada CYP2D6*1 (Ramamoorthy *et al.* 2002). As variantes *2, *17 e *10 apresentaram uma redução do metabolismo da MDMA relativamente à CYP2D6*1 de 15, 13 e 135 vezes, respectivamente (Ramamoorthy *et al.* 2002). Foi também avaliado o metabolismo de um outro substrato, o dextrometorfano, sendo neste caso a capacidade metabólica das mesmas variantes relativamente à CYP2D6*1 reduzida em 37, 51 e 164 vezes, respectivamente (Ramamoorthy *et al.* 2002). Tal como aconteceu no estudo inicial destes autores (Ramamoorthy *et al.* 2001), pôde ser uma vez mais observado que o efeito do polimorfismo na farmacocinética depende largamente do substrato, diferença

essa que foi desta vez particularmente acentuada para a variante CYP2D6*17 (Ramamoorthy *et al.* 2002). Para além das diferenças marcadas na actividade catalítica das diferentes variantes, estes autores estudaram ainda as interacções da MDMA com dez compostos inibidores da CYP2D6 e passíveis de serem ingeridos concomitantemente com esta droga. De entre os compostos estudados, a fluoxetina, paroxetina (fármacos SSRIs) e a cocaína inibiram fortemente a desmetilenação da MDMA, o que permite antecipar a possibilidade de interacções farmacológicas com repercussões na sua toxicidade resultantes das alterações farmacocinéticas, nomeadamente da redução do metabolismo e aumento das concentrações plasmáticas da MDMA (Ramamoorthy *et al.* 2002). Num outro estudo *in vitro* conduzido por Lin e colaboradores foi observado um menor grau de desmetilenação de MDMA nos microssomas obtidos do fígado de um indivíduo genotipado e classificado como metabolizador pobre relativamente a quatro outras preparações microssomais obtidas de quatro indivíduos classificados como metabolizadores extensivos (Lin *et al.* 1997). A formação de aductos do metabolito catecólico da MDMA, α-MeDA, com a GSH, em microssomas de fígado humano, foi também dependente da actividade da CYP2D6 dos dadores testados, que foi avaliada por fenotipagem com o substrato bufuralol (Easton *et al.* 2003).

Estas alterações farmacocinéticas caracterizadas *in vitro* foram mais recentemente avaliadas *in vivo* (de la Torre *et al.* 2005). Durante um ensaio clínico realizado com voluntários humanos, em que foi realizada uma administração repetida de MDMA (duas doses de 100 mg administradas com um intervalo de 24 h) foi genotipado um indivíduo que possuía dois alelos não funcionais para a CYP2D6 (genótipo *CYP2D6*4/*4*), tendo sido classificado como metabolizador pobre. Os restantes nove indivíduos que participaram no mesmo estudo foram classificados como metabolizadores extensivos. Três destes indivíduos eram igualmente portadores do alelo *CYP2D6*4* (genótipo *CYP2D6*1/*4*). A comparação dos parâmetros farmacocinéticos da MDMA entre os indivíduos homozigóticos para o alelo *CYP2D6*1*, heterozigóticos para os alelos *CYP2D6*1/*4* e homozigótico para o alelo *CYP2D6*4* permitiu concluir que a farmacocinética da MDMA e dos seus metabolitos (N-Me-α-MeDA e derivado mono-O-metilado pela COMT) varia marcadamente de acordo com o genótipo (de la Torre *et al.* 2005). Os resultados deste estudo estão representados na Tabela 3. De um modo geral pode ser observado que as concentrações plasmáticas de MDMA foram significativamente superiores para o indivíduo metabolizador pobre. Simultaneamente, a

formação dos metabolitos resultante da desmetilenação da MDMA pela CYP2D6 estava significativamente diminuída. Foi igualmente observado que nos indivíduos com genótipo *wild type* o tempo ao fim do qual se atingiu a concentração plasmática máxima do metabolito N-Me-α-MeDA mono-O-metilado foi inferior ao da MDMA. Tal não foi observado no indivíduo metabolizador pobre, indicando a anulação do efeito de metabolismo de primeira passagem (de la Torre *et al.* 2005). Os parâmetros farmacocinéticos da MDMA e seus metabolitos foram também marcadamente diferentes no caso dos indivíduos heterozigóticos para os alelos *CYP2D6*1/*4* que registaram valores intermédios entre os obtidos para os genótipos *CYP2D6*1/*1* e *CYP2D6*4/*4*, com diferenças estatisticamente significativas relativamente a ambos os grupos (de la Torre *et al.* 2005). Uma outra observação interessante deste estudo foi um maior aumento da temperatura corporal no indivíduo metabolizador pobre relativamente aos outros nove indivíduos, bem como a ausência de aumento da libertação de prolactina em resposta à administração de MDMA que foi observada nos metabolizadores extensivos (de la Torre *et al.* 2005). Os autores propuseram que estes efeitos poderiam estar associados ao respectivo genótipo, o que poderia, por exemplo, antecipar um maior risco da ocorrência de hipertermia em indivíduos com o genótipo *CYP2D6*4/*4* (de la Torre *et al.* 2005). As diferenças farmacocinéticas para os diferentes grupos foram apenas observadas nas primeiras 24h. Após a administração da segunda dose de MDMA, e muito provavelmente como resultado da inibição da CYP2D6, as diferenças entre os diferentes fenótipos foram abolidas (de la Torre *et al.* 2005).

Estes estudos *in vitro* e *in vivo* permitiram antecipar que as diferenças farmacocinéticas resultantes da expressão polimórfica da CYP2D6 poderiam condicionar fortemente a toxicidade aguda e crónica da MDMA. Foi sugerido que, para os metabolizadores pobres, o risco pode resultar das concentrações plasmáticas anormalmente elevadas e a consequente expressão de efeitos tóxicos directamente dependentes da MDMA, como por exemplo a hipertermia ou as alterações cardiovasculares. No entanto, a preocupação suscitada pela acumulação de MDMA na circulação sanguínea como resultado da deficiência do metabolismo enquanto responsável pela possível ocorrência de reacções tóxicas agudas não foi confirmada por três estudos subsequentes que procuraram associar o genótipo responsável pelo fenótipo de metabolizador pobre à ocorrência de tais intoxicações (Gilhooly e Daly 2002; O'Donohoe *et al.* 1998; Schwab *et al.* 1999). O estudo retrospectivo conduzido por

O'Donohoe e colaboradores em que foram investigadas duas mutações diferentes para o gene da CYP2D6 (correspondendo a dois alelos distintos do alelo *wild type*) numa população controlo constituída por 160 indivíduos e numa pequena população de sete indivíduos intoxicados com MDMA revelou que nenhum dos indivíduos intoxicados apresentava um genótipo homozigótico para qualquer das mutações (O'Donohoe *et al.* 1998). Apenas um dos indivíduos era heterozigótico, possuindo um dos alelos mutados. Este estudo, cujas principais limitações foram a análise de uma pequena população de indivíduos intoxicados com MDMA, e o número também reduzido de mutações investigadas, não permitiu concluir acerca da influência do genótipo da CYP2D6 na ocorrência de toxicidade induzida pela MDMA. Os autores propuseram que a presença de compostos contaminantes nos comprimidos de MDMA potencialmente dotados de toxicidade, ou outros factores ambientais e fisiológicos poderiam explicar a ausência de uma correlação entre a quantidade de MDMA ingerida e a ocorrência de intoxicação (O'Donohoe *et al.* 1998). Os autores de um estudo semelhante, em que foram genotipados três indivíduos que apresentaram hepatotoxicidade severa causada por intoxicação com MDMA (tendo sido excluídas outras hipóteses para a presença deste quadro clínico) concluíram igualmente que não havia uma associação entre o genótipo para a CYP2D6 e a ocorrência desta reacção tóxica (Schwab *et al.* 1999). A genotipagem realizada neste estudo foi mais completa do que a relatada no estudo anterior, tendo sido investigada a expressão de cinco alelos funcionais (*CYP2D6*1, *2, *2xN, *9 e *10*) e sete alelos não funcionais (*CYP2D6*3, *4, *6, *7, *8 e *16*). Os três indivíduos intoxicados foram classificados como metabolizadores extensivos (genótipos *1/*4, *2/*5 e *1/*1) (Schwab *et al.* 1999), no entanto, ao contrário do que foi assumido pelos autores, a presença do alelo *4 num dos indivíduos, e dos alelos **2* e **5* num outro, poderá estar associada ao fenótipo de metabolizador intermédio ou mesmo de metabolizador pobre para o caso do genótipo **2/*5* (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm). Mais uma vez, o número diminuto de indivíduos envolvido no estudo impede o estabelecimento de uma relação causal entre genótipo e ocorrência de toxicidade. Num estudo posterior conduzido por Gilhooly e Daly foram analisadas 15 amostras de indivíduos intoxicados fatalmente com MDMA, MDEA ou MDA (14 de tecido hepático e uma amostra de sangue), das quais foi possível genotipar 13 amostras para ambos os alelos deficientes *CYP2D6*3* e **4* e uma apenas para o alelo **4* (Gilhooly e Daly 2002). Nenhum indivíduo homozigótico para os alelos associados à deficiente actividade enzimática foi encontrado. Cinco destes

indivíduos expressavam um dos alelos deficientes (quatro indivíduos com genótipo **1/*4* e um indivíduo com genótipo **1/*3*) (Gilhooly e Daly 2002). A frequência dos alelos *CYP2D6*3* e **4* nestes 15 indivíduos era semelhante à encontrada numa população controlo de 662 indivíduos (Gilhooly e Daly 2002). Também a frequência do genótipo heterozigótico entre a população do estudo e a referida população controlo não diferiram. Assim, e não obstante o número de indivíduos intoxicados genotipados deste estudo ser ainda muito pequeno, foi uma vez mais notada uma ausência de correlação entre o genótipo associado ao metabolismo deficiente e a ocorrência de intoxicação com a MDMA ou compostos análogos.

A ausência de uma associação entre o fenótipo de metabolizador pobre e a ocorrência de intoxicações (Gilhooly e Daly 2002; O'Donohoe *et al.* 1998; Schwab *et al.* 1999) indicam que a expressão de variantes mutadas associadas a uma diminuição da capacidade metabólica da CYP2D6 não é muito provavelmente responsável pela maior susceptibilidade à ocorrência de efeitos tóxicos agudos como resultado do aumento das concentrações plasmáticas.

Uma explicação alternativa para justificar a ausência de correlação entre a quantidade de MDMA ingerida e a magnitude dos efeitos observados, foi a proposta de uma farmacocinética não linear da MDMA, resultante da inibição do metabolismo da CYP2D6 pela própria MDMA através da formação de um complexo com a enzima (Delaforge *et al.* 1999; Heydari *et al.* 2004); Yang, 2006 #855}. Esta observação foi feita em dois ensaios clínicos realizados com a MDMA. Mas e colaboradores observaram que os efeitos cardiovasculares induzidos pela ingestão de uma dose única de 125 mg de MDMA eram superiores mas não estatisticamente diferentes dos observados com a ingestão de uma dose de 75 mg (Mas *et al.* 1999). Os mesmos autores conduziram um ensaio clínico semelhante em que foram administradas de forma repetida e com um intervalo de 24 h duas doses de 100 mg de MDMA, tendo observado um aumento desproporcional das concentrações plasmáticas de MDMA entre a administração da primeira e da segunda dose, que não podia ser explicado pela simples acumulação da droga (Farré *et al.* 2004). No entanto, os autores observaram que a magnitude dos efeitos induzidos pela MDMA, nomeadamente, aumento da pressão sanguínea e ritmo cardíaco, efeitos subjectivos (efeitos avaliados com escalas comparativas entre vários tipos de drogas) e concentração sanguínea de cortisol, não foi proporcional ao aumento da concentração plasmática (Farré *et al.* 2004). Também num ensaio clínico em que foi administrada *d*-anfetamina a 25 voluntários numa dose única

de 25 mg não foi observada uma correlação entre as concentrações plasmáticas medidas e os efeitos observados (pressão sanguínea e efeitos subjectivos) ao longo de oito horas, tempo durante o qual foram monitorizados (Asghar *et al.* 2003).

A ausência de correlação entre a ocorrência de intoxicações, os valores de concentração sanguínea de MDMA e as quantidades ingeridas é já bem conhecida e está bem patente nos valores apresentados na Tabela 4 e na Tabela 5. Os resultados destes estudos são, no entanto, difíceis de interpretar por vários motivos entre os quais se destacam: (i) a ausência de conhecimento da quantidade ingerida na maior parte dos casos; (ii) a variabilidade no tempo decorrido entre a ingestão da droga e a colheita do sangue para a quantificação da droga e/ou dos seus metabolitos; (iii) a possibilidade dos indivíduos terem sido sujeitos a medidas terapêuticas para o controlo da intoxicação que levem a uma diminuição das concentrações da droga e (iv) o facto de várias destas determinações serem *post-mortem* e a provável ocorrência de fenómenos de redistribuição que fazem alterar as concentrações sanguíneas e tecidulares da droga. Pelo contrário, os resultados obtidos em ensaios clínicos, em que as variáveis acima descritas são em grande parte controladas, são fortemente indicadores da influência de outros factores, para além do aumento das concentrações plasmáticas, na ocorrência de intoxicações com anfetaminas, sendo por isso legítimo supor um papel preponderante da bioactivação metabólica na expressão dos efeitos tóxicos destas drogas. Apesar de ter sido já sugerido que para os metabolizadores ultra-rápidos, o risco associado à formação de metabolitos dotados de elevada citotoxicidade poderá estar aumentado, nenhum destes estudos *in vivo* ou *in vitro* até aqui referidos permitiu concluir acerca das implicações das alterações farmacocinéticas ao nível da expressão dos efeitos tóxicos da MDMA.

Os estudos realizados no âmbito da presente dissertação, que recorreram ao modelo *in vitro* constituído por culturas de células V79 geneticamente modificadas para a expressão da CYP2D6 e suas variantes mutadas e da CYP3A4 (Trabalhos V e VI), permitiram concluir que a CYP2D6 participa na bioactivação da MDMA e da 4-MTA, contribuindo para a citotoxicidade destas drogas através da formação de metabolitos potencialmente tóxicos, e que o polimorfismo da CYP2D6 pode modificar esta toxicidade através do aumento da capacidade metabólica para a produção destes metabolitos. No caso da MDMA, foi possível identificar qual o metabolito responsável e caracterizar a citotoxicidade do metabolito nas mesmas condições experimentais em que foi testada a MDMA (Trabalho V). Uma observação importante foi a concordância

entre as concentrações citotóxicas de 4-MTA e MDMA encontradas nos Trabalhos V e VI e as previamente observadas nos hepatócitos de ratinho para a 4-MTA (Trabalho III) e para a MDMA (Carvalho *et al.* 2001). Nas linhas celulares controlo, *parental* e *mockneo*, a incubação durante 24 h com 4-MTA na concentração de 0,5 mM resultou numa redução entre 35 a 45% da viabilidade, sendo esta redução de 100% para a concentração de 1 mM (ver figura 2 do Trabalho VI). A incubação de 4-MTA na concentração de 1 mM, durante 3 h, com os hepatócitos de ratinho criopreservados resultou numa redução superior a 85% da viabilidade celular (ver figura 2 do Trabalho III). Para a MDMA a redução da viabilidade das linhas celulares controlo foi entre 20 a 35% para a concentração de 2 mM (ver figura 2 do Trabalho V). Nos hepatócitos isolados de ratinho, a incubação de MDMA numa concentração de 1,6 mM, durante 3 h, resultou na perda de cerca de 25% da viabilidade celular (Carvalho *et al.* 2001). Deste modo, também nas células V79, a citotoxicidade da 4-MTA foi superior à da MDMA tal como tinha sido previamente observado com os hepatócitos isolados. As células V79 constituem um excelente modelo *in vitro* para a observação dos efeitos citotóxicos e da influência do polimorfismo enzimático nesses mesmos efeitos. Contudo, uma desvantagem do uso destas células é o facto de estas não constituírem um modelo de um alvo celular de toxicidade *in vivo*, uma vez que se tratam de linhas celulares imortalizadas e, neste caso, geneticamente transformadas. Apesar da extensa caracterização e validação das células V79 geneticamente modificadas, enquanto modelo de estudos de metabolismo e citotoxicidade (Krebsfaenger *et al.* 2003), a observação de que a susceptibilidade destas células aos compostos em estudo é semelhante à observada em suspensões celulares de hepatócitos primários traz, por este motivo, uma confiança adicional ao modelo celular utilizado.

A comparação dos resultados obtidos com as linhas celulares das células V79 geneticamente modificadas para a expressão da enzima CYP2D6 humana *wild type* com os das suas variantes com menor actividade enzimática permitiu concluir que a maior actividade metabólica estava associada a um aumento da susceptibilidade aos efeitos citotóxicos (avaliados pela perda de viabilidade celular através do ensaio da formação de colónias celulares) da MDMA (Trabalhos V) e da 4-MTA (Trabalho VI). No caso da 4-MTA não foi possível ainda determinar qual ou quais os metabolitos potencialmente envolvidos nos efeitos observados *in vitro* e não existem estudos adicionais que documentem a sua toxicidade *in vivo*. Pelo contrário, no caso da MDMA, foi possível identificar a N-Me-α-MeDA como a principal interveniente nos efeitos citotóxicos

observados nas linhas celulares V79 e caracterizar a sua citotoxicidade que se revelou muito superior à da MDMA nas mesmas condições experimentais [a incubação das células controlo *mockneo* com N-Me-α-MeDA na concentração de 10 μM causou uma perda significativa de viabilidade, enquanto que uma concentração de MDMA 1000 μM não modificou a viabilidade das células (ver figura 4 do Trabalho V)]. Deste modo, a relevância destes resultados obtidos *in vitro* para a situação *in vivo* pode ser discutida uma vez que a citotoxicidade dos metabolitos da MDMA tem sido extensamente documentada ao longo dos últimos anos.

Um dos mecanismos de lesão celular proposto para a MDMA tem por base a oxidação dos metabolitos catecólicos da MDMA que se encontra esquematizada na Figura 6. Desta oxidação resulta a formação de *o*-quinonas, semiquinonas, aminocromos e aductos (tioéteres) com a glutationa e com a cisteína dotados de elevada reactividade que podem reagir directamente com constituintes celulares nucleófilos, formando ligações covalentes com grupos NH_2 e SH presentes em macromoléculas essenciais à sobrevivência celular, nomeadamente as proteínas e os ácidos nucleicos (Figura 9). Por outro lado, o envolvimento destas espécies químicas em ciclos REDOX resulta num aumento da formação de ROS e RNS, podendo induzir fenómenos de stress oxidativo quando se esgotam as defesas antioxidantes intracelulares. Este metabolismo oxidativo da MDMA ocorre em paralelo com o metabolismo oxidativo das catecolaminas cuja libertação aumenta drasticamente em resultado da acção biológica da MDMA. Este processo oxidativo das catecolaminas endógenas, para além de estar associado à produção de espécies químicas igualmente dotadas de reactividade, leva ainda à inibição de enzimas cruciais para a defesa antioxidante das células, nomeadamente as enzimas relacionadas com a glutationa, incluindo a glutationa peroxidase (GPX), glutationa redutase (GR) e a glutationa-S-transferase (GST) (Remiao *et al.* 1999; Remiao *et al.* 2002).

A citotoxicidade associada ao metabolismo oxidativo da MDMA foi implicada na sua toxicidade hepática, neuronal, cardiovascular e renal. Para a ocorrência de hepatotoxicidade parece ser de especial importância a interacção com a homeostasia da GSH que resulta na perda de funções intracelulares importantes, podendo desencadear uma cascata de eventos conducente a dano celular irreversível (Carvalho *et al.* 2004a). O envolvimento do stress oxidativo acompanhado de uma diminuição acentuada dos níveis de GSH e ATP intracelulares foi observado em hepatócitos isolados de rato expostos à MDMA (Beitia *et al.* 1999). Estes efeitos foram também observados *in vivo*

em ratos (Beitia *et al.* 2000) e em ratinhos (Carvalho *et al.* 2002a; Johnson *et al.* 2002) aos quais foi administrada MDMA. A intervenção dos metabolitos catecólicos da MDMA nestes efeitos foi posteriormente comprovada *in vitro* em estudos realizados em hepatócitos isolados de rato conduzidos por Carvalho e colaboradores, em que foi demonstrado que os metabolitos N-Me-α-MeDA (Carvalho *et al.* 2004b) e α-MeDA (Carvalho *et al.* 2004a) exerciam maior toxicidade do que a MDMA, induzindo uma diminuição dos níveis intracelulares de ATP e de GSH, uma inibição marcada de enzimas antioxidantes (nomeadamente, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa-S-transferase), e consequente morte celular. Estes efeitos foram prevenidos pela pré-incubação das células com os antioxidantes ácido ascórbico e N-acetilcisteína (Carvalho *et al.* 2004b), tendo sido também demonstrada a formação de aductos da α-MeDA com a glutationa (Carvalho *et al.* 2004a). A formação hepática de aductos citotóxicos da α-MeDA com a GSH depende da actividade da CYP2D6, tal como foi descrito num estudo em que foi determinada a actividade enzimática da CYP2D6 nas fracções microssomais obtidas do fígado de diferentes dadores humanos por fenotipagem com o bufuralol (Easton *et al.* 2003), pelo que a variabilidade genética na expressão desta enzima pode também condicionar a toxicidade associada a estes metabolitos.

O metabolismo oxidativo da MDMA tem sido também apontado como um dos mais prováveis mecanismos para a ocorrência de neurotoxicidade (Chu *et al.* 1996; Colado *et al.* 1995; Johnson *et al.* 1991; Monks e Lau 1998; Tucker *et al.* 1994). A intervenção da bioactivação metabólica nestes efeitos foi proposta como resultado da ausência de um efeito neurotóxico directo quer da MDMA quer do seu metabolito N-desmetilado MDA, quando injectados directamente no cérebro (de la Torre *et al.* 2004b; Esteban *et al.* 2001; Monks *et al.* 2004). Foi então estudada a possível acção neurotóxica dos metabolitos catecólicos da MDMA e MDA, a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA, respectivamente, bem como dos seus derivados monometilados resultantes do metabolismo pela COMT, mas também estes metabolitos não causavam directamente qualquer efeito neurotóxico após administração intra-cerebral (de la Torre *et al.* 2004b; Johnson *et al.* 1992; McCann e Ricaurte 1991; Monks *et al.* 2004). Num estudo em que foi administrada N-Me-α-MeDA por via intraperitoneal, foi concluído que este metabolito apresenta a capacidade de atravessar a BHE uma vez que após administração periférica este metabolito foi detectado no cérebro de ratinhos (Escobedo *et al.* 2005). Esta observação tem repercussões importantes para o potencial neurotóxico destes

compostos *in vivo* uma vez que, apesar da existência da CYP2D6 ao nível cerebral, a contribuição da formação hepática dos metabolitos, onde ocorre em maior extensão, poderá ser muito significativa para a ocorrência dos efeitos neurotóxicos. Ao contrário do que acontece com os metabolitos catecólicos, a injecção directa no cérebro de rato dos conjugados da α-MeDA com a GSH [5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA] e com a N-acetilcisteína [5-(N-acetilcistein-S-il)-α-MeDA] produziu neurotoxicidade (causando uma diminuição acentuada dos níveis de serotonina sem alterações dos níveis de dopamina ou de noradrenalina) (Bai *et al.* 1999; Miller *et al.* 1997). A hidrofilia destes tioéteres faz pressupor a existência de sistemas de transporte para estes compostos ao nível cerebral, sem os quais a sua formação hepática e consequente circulação sistémica dificilmente poderia causar neurotoxicidade uma vez que estes compostos não conseguiriam penetrar a BHE. O mecanismo de transporte para estes compostos proposto por Monks e colaboradores envolve os transportadores endoteliais da glutationa (Monks e Lau 1997). Alternativamente, e embora com menor expressão do ponto de vista quantitativo, o conjugado com a cisteína, que se forma após metabolização do conjugado com a GSH por acção das enzimas γ-GT e dipeptidases presentes em grandes quantidades ao nível da membrana endotelial da BHE (Miller *et al.* 1995; Monks e Lau 1997), pode também ser transportado através das células endoteliais por transportadores específicos para aminoácidos (Monks e Lau 1997). Este conjugado cisteína-polifenol pode ser posteriormente convertido no conjugado N-acetilcisteína-polifenol (Miller *et al.* 1995; Monks e Lau 1997), que no caso do conjugado 5-(N-acetilcistein-S-il)-α-MeDA, parece ser mais reactivo do que os seus percursores 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 5-(cistein-S-il)-α-MeDA por ser eliminado mais lentamente, mantendo assim a sua actividade REDOX uma vez que está impossibilitado de sofrer ciclização interna (Bai *et al.* 1999; Monks e Lau 1997).

No entanto, o transporte dos conjugados da GSH parece ser fundamental para os efeitos neurotóxicos, dado que com a inibição da γ-GT se observou a potenciação dos efeitos neurotóxicos da MDA e da MDMA (Bai *et al.* 2001). A inibição da γ-GT pode levar a um aumento do transporte dos conjugados com a GSH ao diminuir os níveis do seu metabolismo no lúmen dos capilares cerebrais, facilitando o seu transporte através dos transportadores endoteliais de GSH (Bai *et al.* 2001). Os próprios conjugados podem inibir a γ-GT, contribuindo também deste modo para o seu próprio transporte ao nível cerebral (Monks e Lau 1997, 1998).

A neurotoxicidade dos metabolitos catecólicos α-MeDA e N-Me-α-MeDA e do conjugado 5-(glutation-S-il)-α-MeDA foi avaliada *in vitro* em culturas de células neuronais de rato tendo sido demonstrado que os metabolitos são mais neurotóxicos do que a MDMA nas mesmas condições experimentais, sendo o conjugado com a GSH a espécie mais neurotóxica (Capela *et al.* 2006a). A importância desta activação metabólica *in vivo* foi também recentemente demonstrada por Jones e colaboradores que observaram a produção dos conjugados da N-Me-α-MeDA com a GSH e com a N-acetilcisteína em cérebro de ratos aos quais foi administrada MDMA por injecção subcutânea (Jones *et al.* 2005). A administração de acivicina, um inibidor da γ-GT, antes da administração subcutânea de MDMA, resultou num aumento da concentração dos conjugados no dialisado cerebral. Este aumento foi proporcional ao grau de neurotoxicidade avaliada pelo decréscimo da concentração de serotonina e de 5-HIAA (Jones *et al.* 2005). Neste mesmo estudo foi também avaliada a neurotoxicidade serotonérgica mediada por estes metabolitos, tendo sido observado um decréscimo da concentração de serotonina e de 5-HIAA após administração do conjugado 5-(N-acetilcisteín-S-il)-N-Me-α-MeDA directamente no cérebro dos ratos (Jones *et al.* 2005). Foi possível então concluir que a formação sistémica dos conjugados dos metabolitos catecólicos com a GSH e com a N-acetilcisteína contribuem para a neurotoxicidade da MDMA *in vivo* (Jones *et al.* 2005).

A formação dos metabolitos catecólicos e a sua posterior conjugação com a GSH tem sido também associada à nefrotoxicidade induzida pela MDMA. A nefrotoxicidade de conjugados polifenólicos com a GSH foi já demonstrada em animais de experiência (Monks e Lau 1997, 1998). As reacções de hidrólise ou transpeptidação catalisadas pela γ-GT localizada na membrana apical das células tubulares proximais renais (PTC) ocorrem a nível extracelular, sendo o produto desta reacção, o dipéptido cisteinilglicina, substrato para as dipeptidases que apresentam a mesma localização celular (Monks e Lau 1997, 1998). Os conjugados com a cisteína são transportados através da membrana das células epiteliais do túbulo proximal pelo sistema de transporte de aminoácidos, exercendo assim toxicidade no interior da célula pela sua capacidade de interacção directa por ataque electrófilico a macromoléculas essenciais à sobrevivência celular e pelos fenómenos de stress oxidativo associados à formação destas espécies reactivas resultantes do elevado potencial REDOX destas espécies e dos intermediários envolvidos na sua formação (Monks e Lau 1997). Ao nível intracelular o conjugado com a cisteína pode sofrer acetilação por acção da enzima N-acetiltransferase

e ser posteriormente convertido no seu derivado mercaptúrico ou sofrer a acção da enzima β-liase com formação de um tiol reactivo (Monks e Lau 1997). Este tiol, que tem sido implicado na nefrotoxicidade de vários conjugados com a GSH e com a cisteína, pode ser inactivado pela enzima S-metiltransferase (van Bladeren 2000) (Figura 11). A nefrotoxicidade da MDMA e dos seus metabolitos catecólicos e conjugados com a GSH foi avaliada *in vitro* em culturas de PTC de rato e humanas (Carvalho *et al.* 2002b). Nas condições experimentais deste estudo a MDMA e a MDA não apresentaram um efeito tóxico significativo quando avaliado pela perda de viabilidade celular (Carvalho *et al.* 2002b). Pelo contrário, a α-MeDA, o respectivo monoconjugado com a GSH [5-(glutation-S-il)-α-MeDA] e o biconjugado com a GSH [2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA] induziram uma drástica diminuição da viabilidade celular (Carvalho *et al.* 2002b). A pré-incubação destas células com um inibidor da γ-GT (acivicina) e um inibidor da aminopeptidase M (bestatina) resultou no agravamento da nefrotoxicidade do conjugado 5-(glutation-S-il)-α-MeDA, indicando que a simplificação metabólica deste conjugado em conjugados cistein-S-il- ou cistein-S-il-glicina está provavelmente associada à destoxificação destes compostos, e que a nefrotoxicidade destes compostos está muito provavelmente associada aos ciclos REDOX induzidos ao nível extracelular (Carvalho *et al.* 2002b). Por outro lado, a possível existência de transportadores para os conjugados da GSH nestas células faz prever que um dos efeitos da inibição destas enzimas seja o aumento do transporte destes conjugados quando se inibe a sua biotransformação, o que poderá facilitar a sua toxicidade ao nível intracelular.

Também a toxicidade da MDMA ao nível cardiovascular parece ser, pelo menos parcialmente, devida à sua bioactivação metabólica. Esta hipótese foi estudada *in vitro* em cardiomiócitos isolados de rato que foram incubados com MDMA, MDA e com os metabolitos catecólicos α-MeDA e N-Me-α-MeDA (Carvalho *et al.* 2004c). Neste estudo foi verificado que os metabolitos catecólicos, α-MeDA, e principalmente a N-Me-α-MeDA, induzem toxicidade nestas células, a qual se caracterizou por uma diminuição da viabilidade celular, acompanhada pela diminuição dos níveis intracelulares de GSH, aumento do Ca^{2+} intracelular, diminuição dos níveis de ATP, inibição de importantes enzimas antioxidantes (GPX, GR e GST) e formação dos respectivos aminocromos (Carvalho *et al.* 2004c). Estes efeitos não foram observados quer com a MDMA quer com a MDA, pelo que foi concluído que a activação

metabólica da MDMA é importante para a expressão dos seus efeitos cardiotóxicos (Carvalho *et al.* 2004c).

O envolvimento do metabolismo oxidativo da MDMA e a respectiva caracterização dos mecanismos de toxicidade subjacentes à acção tóxica dos metabolitos e outras espécies reactivas associadas a este processo metabólico, em diferentes órgãos e células alvo de toxicidade da MDMA, permitem concluir acerca das fortes implicações que as alterações genéticas na principal enzima envolvida na catálise da desmetilenação da MDMA podem acarretar no que respeita à predisposição para ocorrência de toxicidade. No Trabalho V dos estudos da presente dissertação, foi demonstrada a citotoxicidade do metabolito N-Me-α-MeDA no modelo das células V79. Neste estudo, a N-Me-α-MeDA exerceu um efeito citotóxico significativo para uma concentração igual ou superior a 10 μM. Pode então ser colocada a questão da relevância das concentrações citotóxicas deste metabolito em termos clínicos. *In vivo*, a formação deste metabolito em humanos foi avaliada em dois estudos em que a MDMA foi administrada a voluntários. Num primeiro estudo, a MDMA foi administrada numa dose única de 100 mg e atingiu uma concentração plasmática máxima de 181,6 μg/L (0,9 μM; n=4 indivíduos), enquanto a concentração plasmática máxima do metabolito N-Me-α-MeDA foi de 154,5 μg/L (0,85 μM; n=4) (Segura *et al.* 2001). Num segundo estudo a MDMA foi administrada em duas doses consecutivas de 100 mg espaçadas por um intervalo de 24 h (de la Torre *et al.* 2005). Os parâmetros farmacocinéticos determinados neste estudo estão descritos na Tabela 3. Nas primeiras 24 h após a administração da MDMA foi determinada uma concentração plasmática máxima de 163,3 μg/L (aproximadamente 0,8 μM; valor médio encontrado nos sete indivíduos com genótipo *wild type CYP2D6*1/*1* e como tal classificados como metabolizadores extensivos), tendo sido a concentração plasmática máxima de N-Me-α-MeDA avaliada em 200,4 μg/L (aproximadamente 1,1 μM; apenas determinada em tês indivíduos) (de la Torre *et al.* 2005). Estes dois estudos permitiram concluir que a razão entre composto pai e metabolito se aproxima da unidade, o que indica uma formação do metabolito em grande extensão. Não podendo estes valores serem extrapolados para as situações de intoxicação grave e/ou fatal em que se atingem concentrações plasmáticas e tecidulares muito mais elevadas [que podem ser superiores a 500 μM de MDMA nos tecidos para uma correspondente concentração sanguínea de 70 μM; (ver Tabela 4 e Tabela 5), são apesar disso indicativos de que a concentração de 10 μM de N-Me-α-MeDA é relevante do ponto de vista clínico. Por outro lado, a produção deste metabolito no modelo *in*

vitro das células V79 utilizado no estudos da presente dissertação, pode ser subestimada em relação à produção *in vivo* uma vez que outras isoenzimas do citocromo P450, nomeadamente as CYP1A2, CYP2B6 e CYP3A4, contribuem também para a sua formação (Kreth *et al.* 2000; Maurer *et al.* 2000). Para além disso, a libertação de grandes quantidades de catecolaminas endógenas como resultado da acção biológica da MDMA pode facilmente saturar a capacidade metabólica da COMT que cataliza a O-metilação dos metabolitos catecólicos da MDMA, ou das sulfotransferases (SULT) ou UDP-glucuronosiltransferases (UGT) que catalizam a conjugação com o anião sulfonato e com o ácido glucurónico, respectivamente, resultando por isso num aumento das concentrações plasmáticas do metabolito *in vivo*. No caso da COMT, existem alguns indícios de que o metabolito mono-O-metilado resultante da metilação da N-Me-α-MeDA, a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina, não é totalmente desprovido de toxicidade, tendo sido recentemente implicado no aumento da libertação de ADH, o que sugere que a activação metabólica da MDMA é importante para o desenvolvimento da hiponatrémia (Forsling *et al.* 2002).

Para além da possível saturação da capacidade enzimática destas enzimas (COMT, UGT e SULT), deve ser considerada a possibilidade de existência de polimorfismo genético nos genes que codificam a sua expressão. Desta forma, a variabilidade interindividual na ocorrência de toxicidade pode não só estar associada ao aumento da produção do(s) metabolitos(s) tóxicos por reacções de metabolização de Fase I, como também à diminuição da capacidade de destoxificar estes metabolitos e as espécies reactivas que acompanham a sua formação pelas reacções de Fase II. Estes polimorfismos em diversas proteínas intervenientes nas diferentes reacções metabólicas podem actuar conjuntamente como factores que aumentam a predisposição para a ocorrência de toxicidade, ou podem, pelo contrário, antagonizar os respectivos efeitos resultando num fenótipo normal.

Apesar da grande importância dos polimorfismos num único gene que codifica uma proteína-chave no processo de toxicidade de determinado composto (quer se trate de uma droga de abuso, um fármaco ou um poluente ambiental) a resposta toxicológica resulta normalmente da interacção entre vários genes que codificam proteínas envolvidas em múltiplas vias da disposição e dos efeitos biológicos dos compostos. Entre estas proteínas que condicionam a resposta *in vivo* a um determinado xenobiótico, destacam-se as que estão envolvidas no transporte e metabolismo, os receptores e os factores de transcrição que regulam quer a resposta celular quer a própria expressão

genética. Muitos outros factores, incluindo variáveis não genéticas como, por exemplo, a idade, sexo, estado fisiopatológico (gravidez, existência de patologia hepática ou renal, entre outros), factores nutricionais, administração concomitante de fármacos e outros compostos, e factores dependentes do estilo de vida como consumo de álcool e de tabaco, influenciam grandemente a ocorrência de reacções adversas. Estas podem ser consequência de concentrações inesperadamente elevadas no alvo onde actua o composto ou alternativamente noutros compartimentos para os quais o composto tenha particular afinidade. Neste último caso as reacções adversas são frequentemente inesperadas, sendo por vezes designadas como reacções idiossincráticas. Tal como a predisposição individual do sistema imunitário pode ser responsável pela ocorrência de reacções adversas imprevistas e graves (reacções alérgicas), uma combinação rara de diferentes genótipos pode ser a causa responsável pelas reacções de toxicidade raras mas frequentemente com consequências muito severas e mesmo fatais que ocorrem como resultado da ingestão das anfetaminas.

Por exemplo, no caso da COMT, um SNP [substituição G1947A que resulta na substituição de aminoácidos valina108metionina (val108met) para a COMT solúvel e val158met para a COMT ligada à membrana] no gene que codifica esta enzima resulta na expressão de uma enzima com baixa actividade catalítica (Lachman *et al.* 1996; Lotta *et al.* 1995; Lundstrom *et al.* 1995). Dentro da população caucasiana a actividade da COMT varia substancialmente, sendo que 25% dos caucasianos apresentam um fenótipo de elevada actividade enzimática e 25% um fenótipo de actividade enzimática reduzida (Weinshilboum *et al.* 1999). A actividade da COMT varia também marcadamente entre populações de diferentes origens étnicas. A actividade enzimática da COMT é menor nos caucasianos do que nas populações afro-americanas, africanas e asiáticas, o que pode ser explicado pela maior frequência dos alelos mutados nas populações caucasianas (Ameyaw *et al.* 2000; McLeod *et al.* 1994; McLeod *et al.* 1998; Weinshilboum *et al.* 1999; Zhu 2002). Dadas as diferenças de actividade enzimática da COMT com origem na sua expressão polimórfica pode ser antecipada a sua potencial influência na toxicidade das anfetaminas. De facto, a diminuição da inactivação metabólica das catecolaminas endógenas que são libertadas por acção das anfetaminas pode contribuir para o aumento da sua toxicidade, prolongando a duração de acção e facilitando o seu metabolismo por auto-oxidação que resulta na formação de espécies altamente reactivas e deletérias para o normal funcionamento celular. Tal suposição foi suportada por um estudo em que foi comparado o efeito da *d*-anfetamina ao nível

cerebral numa população de indivíduos genotipados para a mutação val/met da COMT e agrupados consoante o seu genótipo (val/val, val/met ou met/met) (Mattay *et al.* 2003). Os resultados obtidos neste estudo, em que os efeitos da *d*-anfetamina foram monitorizados por técnicas de imagiologia cerebral, permitiram concluir que os indivíduos homozigóticos para a mutação (genótipo met/met) podem ser mais propensos à ocorrência de reacções adversas a compostos do tipo das anfetaminas (Mattay *et al.* 2003). No caso concreto da MDMA, a COMT cataliza também a metilação dos metabolitos catecólicos N-Me-α-MeDA e α-MeDA e embora de uma forma geral se considere que esta reacção será uma via de destoxificação pela inactivação do grupo catecólico associado à elevada reactividade destes compostos, deve também ser considerada a eventual predisposição dos indivíduos possuidores de um fenótipo de actividade enzimática elevada para a ocorrência de hiponatrémia dado o envolvimento do metabolito monometilado da N-Me-α-MeDA na libertação de vasopressina (Forsling *et al.* 2002).

Também as enzimas SULT humanas que conjugam os metabolitos catecólicos da MDMA (Maurer *et al.* 2000) e das catecolaminas neurotransmissoras são expressas de forma polimórfica (Freimuth *et al.* 2001; Nagata e Yamazoe 2000). Foram já descritos polimorfismos para diferentes isoenzimas nomeadamente, para a SULT1A (quatro variantes) (Nagata e Yamazoe 2000), SULT1C1 (três variantes) (Freimuth *et al.* 2001) e SULT2A (três variantes) (Nagata e Yamazoe 2000). Apesar de não existirem ainda estudos que comprovem a importância da expressão polimórfica das SULT na capacidade de destoxificação das anfetaminas, alguns dos polimorfismos desta enzima parecem ter uma importância funcional, afectando a estabilidade e a actividade destas isoenzimas (Daly 2003; Freimuth *et al.* 2001; Nagata e Yamazoe 2000). São ainda necessários estudos que comprovem a importância clínica destes polimorfismos (Daly 2003). No entanto, no caso das anfetaminas pode ser antecipado que a diminuição da actividade enzimática resultante destes polimorfismos genéticos estará muito provavelmente associada a um aumento da susceptibilidade aos efeitos adversos resultantes da maior permanência dos metabolitos potencialmente tóxicos que, desta forma, são eliminados de forma menos eficiente.

A mesma observação pode ser feita em relação ao polimorfismo genético de outras enzimas envolvidas na destoxificação dos metabolitos por conjugação com o ácido glucurónico. A actividade enzimática das UGT apresenta grandes variações interindividuais na população e, sendo esta a reacção de conjugação mais comum no

metabolismo humano, esta variabilidade tem sido associada à ocorrência de determinadas patologias como por exemplo a síndrome de Gilbert´s (como resultado da deficiência de glucuronidação da bilirrubina) e à diminuição do metabolismo de diferentes fármacos (por exemplo, paracetamol, tolbutamida, irinotecano e rifampicina) e consequente aumento da susceptibilidade a reacções adversas. Os polimorfismos descritos para as UGT resultam quer de uma inserção das bases TA na TATA-box que afecta os níveis de expressão do gene e consequentemente os níveis de enzima expressa (Daly 2003; Monaghan *et al.* 1996), quer de SNPs cujas alterações de aminoácidos modificam a actividade catalítica da enzima (Aono *et al.* 1995; Daly 2003; de Morais *et al.* 1992; Iyer *et al.* 1998; Miners *et al.* 2002; Zheng *et al.* 2001). Não parecem existir estudos que visem a caracterização da influência destes polimorfismos na toxicidade das anfetaminas, no entanto, tal como acontece para as SULT, a expressão polimórfica destas enzimas poderá resultar no aumento do risco para a ocorrência de intoxicações com estas drogas dado o papel preponderante desta reacção metabólica de fase II na destoxificação dos metabolitos reactivos resultantes do metabolismo oxidativo das anfetaminas.

Uma outra família de enzimas que está envolvida no metabolismo de fase II e é essencial para a destoxificação de espécies reactivas resultantes do stress oxidativo induzido pelas anfetaminas é a GST, ao catalizar a conjugação de compostos electrófilos com a GSH. Estas enzimas apresentam ainda a capacidade de se ligar aos xenobióticos, impedindo desta forma o dano celular por eles produzido, o que pode ou não inibir a enzima. Estas enzimas são indutíveis e algumas são expressas de forma polimórfica. Estes polimorfismos consistem quer em deleções genéticas (para as enzimas GSTM1 e GSTT1) que resultam na perda de actividade enzimática (Pemble *et al.* 1994; Seidegard *et al.* 1988), quer em SNPs (GSTP1) que resultam na diminuição da actividade enzimática (Ali-Osman *et al.* 1997; Daly 2003). A expressão destas enzimas pode também sofrer um fenómeno de duplicação genética que consiste na expressão de um alelo raro que tem como consequência o aumento da capacidade enzimática (McLellan *et al.* 1997). Enquanto a diminuição da capacidade enzimática destas enzimas poderá estar associada a um aumento do risco para a ocorrência de toxicidade pelo seu papel na destoxificação das espécies electrófilas resultantes do metabolismo oxidativo das anfetaminas, o aumento do potencial destoxificante pelo aumento da expressão destas enzimas pode constituir um factor de protecção contra estas espécies reactivas. Num estudo realizado no Japão, em que foi comparada a frequência do alelo

mutado para a enzima GSTP1 numa população de indivíduos consumidores de metanfetamina e numa população de indivíduos controlo, foi detectada uma diferença significativa na frequência dos alelos mutado e não mutado (*wild type*) entre as duas populações e, por outro lado, a frequência do genótipo e alelo mutados estava também correlacionada com a ocorrência de psicose (Hashimoto *et al.* 2005). Foi por isso proposto que este polimorfismo poderia contribuir para uma maior vulnerabilidade na ocorrência de psicose associada ao abuso de metanfetamina na população japonesa (Hashimoto *et al.* 2005).

Ao contrário do que acontece com a diminuição da actividade enzimática das enzimas de fase II envolvidas no processo de destoxificação dos metabolitos reactivos das anfetaminas que parecem ser, pelo menos parcialmente, responsáveis pela toxicidade das anfetaminas, a diminuição da actividade catalítica das enzimas de fase I, que podem contribuir para a formação destes metabolitos *in vivo*, pode constituir um factor de protecção relativamente à acção tóxica destas drogas. No caso concreto da MDMA e do seu metabolito N-desmetilado MDA, cujo metabolismo oxidativo é principalmente catalizado pela CYP2D6 com a abertura do anel metilenodioxilo e formação do respectivo catecol, outras isoenzimas do citocromo P450 podem influenciar a formação dos seus metabolitos tóxicos, nomeadamente a CYP1A2, CYP2B6 e a CYP3A4. Ao contrário do que acontece com a CYP2D6, estas isoenzimas são indutíveis pelo que, considerando apenas os fenómenos de variabilidade genética, não só o polimorfismo dos genes que codificam estas proteínas mas também os que codificam as proteínas envolvidas no complexo processo de indução enzimática podem contribuir para a variabilidade interindividual na actividade enzimática.

Para a isoenzima CYP1A2 existem 16 variantes descritas e algumas destas variantes foram associadas ao decréscimo de actividade enzimática, decréscimo de expressão enzimática e ao aumento de indutibilidade da enzima (http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm). Para a CYP2B6 foram descritos até à presente data mais de 49 alelos e 27 variantes desta enzima (http://www.cypalleles.ki.se/cyp2b6.htm). Alguns destes polimorfismos parecem resultar num decréscimo da actividade enzimática ou da expressão da proteína *in vitro*, tendo sido apenas avaliado *in vivo* o decréscimo da actividade enzimática da variante CYP2B6*16 que demonstrou ter repercussões importantes no metabolismo do fármaco efavirenz, sendo um potencial factor importante na terapia anti-VIH nas populações africanas onde o alelo *CYP2B6*16* parece ser mais comum (Wang *et al.* 2006). Para a

isoenzima CYP3A4 foi observada uma enorme variabilidade interindividual na sua expressão, podendo o conteúdo hepático microssomal da proteína variar entre 40 a 50 vezes (Ingelman-Sundberg 2004a). Apesar de ser reconhecido que existe um forte controlo genético na expressão desta enzima (Ozdemir *et al.* 2000), não foi ainda possível identificar entre os cerca de 39 alelos descritos (http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm) o(s) responsável(eis) pela variabilidade *in vivo* da actividade enzimática (Anzenbacher e Anzenbacherová 2001). Uma das possíveis explicações para a alta variabilidade na quantidade e indutibilidade da CYP3A4 observada entre os seres humanos pode residir na existência de polimorfismos nos genes que codificam as proteínas que regulam a transcrição do gene *CYP3A4*, como por exemplo, o receptor PXR (Hustert *et al.* 2001), bem como nos genes que determinam a regulação pós-tradução.

Os polimorfismos genéticos de qualquer uma destas isoenzimas do citocromo P450 foram ainda pouco estudados bem como os polimorfismos das proteínas envolvidas na sua indução (receptores Ahr, CAR e PXR), e as respectivas consequências clínicas. Desta forma, na ausência de estudos que o comprovem, apenas pode ser antecipada uma eventual influência de alguns destes polimorfismos acima descritos na expressão da toxicidade das anfetaminas através da modificação da formação dos metabolitos resultantes da oxidação destas drogas para cuja formação *in vivo* estas isoenzimas contribuem.

Para além da variabilidade genética que condiciona a expressão das proteínas envolvidas no metabolismo destas drogas, também os polimorfismos nos genes que codificam as proteínas envolvidas na acção biológica das anfetaminas podem influenciar a acção tóxica destes compostos.

A activação dos receptores serotonérgicos pré- e pós-sinápticos resulta na activação de uma série de vias intracelulares, como por exemplo a via da adenilato ciclase, que estão envolvidas nos efeitos moleculares das anfetaminas (Simantov 2004). A estimulação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} localizados nos neurónios GABAérgicos resulta no aumento da síntese da dopamina e consequente activação das vias dopaminérgicas (Gudelsky e Nash 1996; Nash *et al.* 1990; Sprague *et al.* 1998). A estimulação dos receptores 5-HT_{2A} resulta também no aumento da actividade da enzima fosforílase do glicogénio que pode contribuir para a diminuição da principal fonte de energia no cérebro, o glicogénio, através do aumento da glicogenólise (Darvesh *et al.* 2002; Poblete e Azmitia 1995). A estimulação das vias serotonérgicas e dopaminérgicas

tem sido proposta como um dos principais mecanismos que explicam a acção neurotóxica (Capela *et al.* 2006b; Nash *et al.* 1990; Schmidt *et al.* 1990a; Schmidt *et al.* 1991), cardiotóxica (Carvalho 2004; Fitzgerald e Reid 1994; McDaid e Docherty 2001), termogénica (Carmo *et al.* 2003; Gordon *et al.* 1991; Green *et al.* 1995; Liechti *et al.* 2000; Mechan *et al.* 2002; Schmidt *et al.* 1990b; Walubo e Seger 1999) e imunotóxica (Connor 2004; Yau *et al.* 1997) das anfetaminas. É então legítimo supor que a variabilidade genética nos receptores da serotonina e dopamina possa influenciar grandemente os efeitos biológicos e toxicológicos induzidos pelas anfetaminas. No que respeita ao receptor serotonérgico 5-HT_{2A}, o principal polimorfismo descrito para esta proteína não parece afectar a sua expressão ou estrutura pelo que não foi ainda encontrado um polimorfismo funcional que muito provavelmente se encontra em *linkage disequilibrium* com o alelo que é já conhecido (Hiratsuka e Mizugaki 2001; Masellis *et al.* 1995). Para os receptores da dopamina foram já descritos alguns polimorfismos (Cichon *et al.* 2000; Cravchik e Gejman 1999; Steen *et al.* 1997), entre os quais os dos receptores D2 (Persico *et al.* 1996) e D4 (Li *et al.* 2004) que foram associados a uma maior predisposição para o consumo de drogas psicoestimulantes. Uma associação interessante entre o polimorfismo val158met da enzima de metabolismo de Fase II COMT e o polimorfismo dos receptores dopaminérgicos D4, que parece ter um efeito aditivo no risco para a dependência da metanfetamina (Li *et al.* 2004), permite realçar a importância das interacções genéticas na resposta biológica e toxicológica.

Os transportadores da serotonina e da dopamina são igualmente alvos cruciais para a acção toxicológica das anfetaminas. O transportador pré-sináptico da serotonina (SERT ou 5HTT) é responsável pelo transporte desta monoamina neurotransmissora para o interior dos neurónios pré-sinápticos mantendo uma reserva de serotonina disponível para a subsequente libertação. Da ligação da MDMA ao SERT resulta a inibição da recaptação neuronal de serotonina e o aumento da sua libertação para o espaço sináptico (Rudnick e Wall 1992; Simantov 2004). Daqui resulta o aumento da estimulação das vias serotonérgicas uma vez que o neurotransmissor se acumula na fenda sináptica sendo também captado por outros transportadores como por exemplo os transportadores da dopamina (DAT), podendo a consequente reversão do transporte da dopamina contribuir também para o aumento da libertação deste neurotransmissor para além do já referido mecanismo de aumento da sua síntese nos neurónios GABAérgicos (Simantov 2004). Deste modo, a acção da MDMA e de outras anfetaminas onde se

incluem, por exemplo, a 4-MTA (Huang *et al.* 1992; Murphy *et al.* 2002; Scorza *et al.* 1999) e a *d*-anfetamina (Carvalho 1998; Seiden *et al.* 1993), nestes transportadores, condiciona fortemente a sua acção biológica e toxicológica. A variabilidade genética na expressão do SERT parece ser devida à existência de um polimorfismo que consiste num elemento de repetição a montante do local de transcrição do gene *SCL6A4* que codifica o transportador (Lesch e Gutknecht 2005). A maior parte dos alelos caracteriza-se por elementos de repetição constituídos por 14 unidades (alelo curto) ou 16 unidades (alelo longo) (Lesch e Gutknecht 2005). Os estudos que caracterizaram a influência deste polimorfismo na capacidade de captação da serotonina pelo SERT revelaram que a expressão homozigótica do alelo curto está associada a uma menor expressão do SERT, a uma menor capacidade de captação de serotonina e a uma deficiente neurotransmissão serotonérgica (Lesch e Gutknecht 2005; Roiser *et al.* 2006). A expressão deste alelo curto tem sido associada à ocorrência de reacções adversas ao nível neurológico em indivíduos consumidores de MDMA como resultado de uma maior susceptibilidade do sistema serotonérgico aos efeitos induzidos pela MDMA (Roiser *et al.* 2005; Roiser *et al.* 2006). Também o polimorfismo do gene *SCL6A3* que codifica o transportador da dopamina DAT1 foi associado a uma variabilidade na susceptibilidade aos efeitos subjectivos da *d*-anfetamina após estudo desta droga num ensaio clínico (Lott *et al.* 2005) e ao risco de desenvolvimento de psicose numa população de indivíduos consumidores de metanfetamina (Ujike *et al.* 2003).

Do que acima foi exposto pode ser concluído que a variabilidade genética pode ser responsável pela grande variabilidade interindividual na ocorrência de intoxicações com as drogas de abuso do tipo das anfetaminas. A variabilidade e a relativa raridade (quando considerado o vasto universo de consumidores) na ocorrência de intoxicações que é uma das características da toxicidade destes compostos, pode ser parcialmente explicada por uma componente poligénica nos mecanismos de toxicidade subjacentes. A possibilidade da existência de uma combinação rara de genótipos que resulte num fenótipo de maior susceptibilidade pode ser considerada como uma causa para a ocorrência de intoxicações de grande severidade e frequentemente fatais que parecem ser independentes das quantidades de droga ingerida e das concentrações plasmáticas atingidas. No entanto, a variabilidade genética pode não só ser influenciada pelas interacções genéticas mas também por factores não genéticos e ambientais. A possibilidade de interacções medicamentosas associada ao tipo de consumo destes estimulantes é apreciável porque existe uma percentagem muito elevada de

consumidores de anfetaminas que ingerem múltiplas drogas (várias anfetaminas, álcool, canabinóides, cocaína, opiáceos, fármacos e outros compostos com vista a aumentar os efeitos desejados e/ou a combater os efeitos indesejáveis que surgem após a ingestão das drogas). Por outro lado, os factores comportamentais e ambientais associados ao consumo da MDMA podem aumentar o seu potencial tóxico uma vez que a ingestão destes compostos é frequentemente feita em locais com elevada temperatura ambiente, com níveis de ruído elevado e acompanhada de exercício muscular vigoroso. Todas estas condições demonstraram influenciar a toxicidade das anfetaminas, potenciando a sua acção tóxica ao nível de diferentes órgãos alvo. Por este motivo, a questão da variabilidade na resposta toxicológica das anfetaminas permanece em aberto. No entanto, a caracterização dos diferentes mecanismos que condicionam a toxicidade destas drogas de abuso ao nível genético pode, no futuro, traduzir-se numa importante ferramenta para a compreensão e previsão da maior ou menor probabilidade ou predisposição para a ocorrência de toxicidade. Com base neste conhecimento podem ser estabelecidos testes de diagnóstico molecular que permitam a identificação dos indivíduos mais susceptíveis em função das suas determinantes genéticas. Por outro lado, a melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade pode resultar na descoberta de novas e mais adequadas estratégias para o controlo das intoxicações, uma vez que o sucesso destas intervenções é muitas vezes diminuto como resultado do ainda incompleto conhecimento da etiologia das diferentes reacções adversas que surgem com a ingestão destas drogas. Tal como acontece com as doenças de origem poligénica e com forte influência de factores ambientais (como por exemplo a asma), ou com as reacções adversas idiossincráticas observadas com diferentes terapias farmacológicas, a interpretação e a aplicação do conhecimento da influência do polimorfismo genético na toxicidade, e até na própria dependência, das drogas de abuso é ainda dificultada pelas limitações inerentes à complexidade da análise integrada de todos os factores que podem contribuir para uma determinada resposta. No entanto, espera-se que, no futuro, o aumento deste conhecimento associado às novas tecnologias genómicas e avanços na bioinformática permita a compreensão destes mecanismos complexos através do estudo integrado das diferentes variáveis que os condicionam.

7. CONCLUSÕES

Os estudos realizados no âmbito da presente dissertação permitiram concluir que:

- *In vivo*, no ratinho, a 4-MTA é pouco metabolizada, ao contrário do que acontece com a 2C-B que é maioritariamente excretada após biotransformação;

- As vias metabólicas identificadas para a 4-MTA e para a 2C-B *in vivo*, no ratinho, são semelhantes às descritas para a *d*-anfetamina e seus análogos. Para a 4-MTA foram observadas as reacções metabólicas de desaminação oxidativa e hidroxilação alifática. Para a 2C-B foram adicionalmente observadas as reacções de O-desmetilação e conjugação com a glicina. Por comparação com os dados disponíveis na literatura sobre a metabolização *in vivo* destas drogas em humanos, o ratinho como modelo animal aproxima-se qualitativamente do humano em termos de perfil metabólico;

- Tal como acontece *in vivo*, no ratinho, a metabolização da 4-MTA *in vitro* em hepatócitos isolados humanos e de cinco espécies animais (ratinho, rato, coelho, cão e macaco) é pouco extensa, enquanto a 2C-B é extensamente metabolizada pelas células hepáticas;

- As vias metabólicas identificadas para a 4-MTA e para a 2C-B *in vitro*, nos hepatócitos isolados de ratinho, são semelhantes às observadas *in vivo*, no ratinho, e, por comparação com os dados disponíveis na literatura, esta semelhança existe também nas outras espécies animais e no Homem, pelo que o modelo *in vitro* utilizado nestes estudos permite prever o metabolismo *in vivo*;

- As diferenças observadas no metabolismo da 4-MTA e da 2C-B *in vitro*, em hepatócitos isolados, entre as diferentes espécies avaliadas são diminutas;

- A 4-MTA e a 2C-B são citotóxicas no modelo *in vitro* dos hepatócitos isolados em todas as espécies avaliadas, sendo a sua citotoxicidade superior à documentada para os análogos *d*-anfetamina e MDMA em estudos semelhantes;

- As diferenças observadas na citotoxicidade da 4-MTA e da 2C-B *in vitro*, em hepatócitos isolados, entre as diferentes espécies avaliadas são moderadas. Apenas os hepatócitos de coelho se distinguem pela sua maior resistência aos efeitos citotóxicos e pela maior capacidade de metabolismo pela via da desaminação oxidativa. Pelo contrário, as diferenças na citotoxicidade observadas entre hepatócitos provenientes de diferentes dadores humanos permitem antecipar uma variabilidade interindividual na susceptibilidade aos efeitos tóxicos destas drogas;

- A expressão polimórfica da enzima CYP2D6 influencia a citotoxicidade da 4-MTA e da MDMA. No modelo celular constituído por células V79 geneticamente modificadas para a expressão de CYP humanas, a expressão da enzima CYP2D6 *wild type*, metabolicamente mais activa relativamente às variantes mutadas que apresentam actividade enzimática diminuída, resulta na potenciação da citotoxicidade destas drogas relativamente às linhas celulares controlo sem competência metabólica para as enzimas do citocromo P450;

- Um metabolito envolvido no efeito citotóxico observado com a MDMA foi identificado. A N-Me-α-MeDA apresenta uma citotoxicidade muito superior à da MDMA nas mesmas condições experimentais, o que permite antecipar que os indivíduos que possuem um fenótipo de metabolizador ultra-rápido para a CYP2D6 podem apresentar uma maior susceptibilidade aos efeitos citotóxicos da MDMA.

De um modo geral, pode ser considerado que os dois novos derivados anfetamínicos que foram alvo de estudo da presente dissertação, 4-MTA e 2C-B, apresentam no seu perfil de biotransformação semelhanças ao dos seus análogos anfetamínicos. A citotoxicidade destas duas drogas parece ser, no entanto, superior à dos compostos análogos.

A grande variabilidade na susceptibilidade aos efeitos tóxicos das anfetaminas continua uma questão em aberto. No entanto, os estudos da presente dissertação permitiram pela primeira vez estabelecer, para a MDMA e para a 4-MTA, uma relação causal entre as alterações farmacocinéticas determinadas pelo polimorfismo do metabolismo humano e as respectivas consequências toxicológicas, o que permite propor uma explicação para as acentuadas diferenças interindividuais na ocorrência de intoxicações com estas drogas de abuso.

8. REFERÊNCIAS

Acuna-Castillo, C., Villalobos, C., Moya, P.R., Saez, P., Cassels, B.K. and Huidobro-Toro, J.P. (2002) Differences in potency and efficacy of a series of phenylisopropylamine/phenylethylamine pairs at 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors. Br J Pharmacol 136, 510-519.

Adedoyin, A., Arns, P.A., Richards, W.O., Wilkinson, G.R. and Branch, R.A. (1998) Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: investigation of cytochromes P450 2C19 and 2D6. Clin Pharmacol Ther 64, 8-17.

Aklillu, E., Persson, I., Bertilsson, L., Johansson, I., Rodrigues, F. and Ingelman-Sundberg, M. (1996) Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. J Pharmacol Exp Ther 278, 441-446.

Akrawi, M., Rogiers, V., Vandenberghe, Y., Palmer, C.N., Vercruysse, A., Shephard, E.A. and Phillips, I.R. (1993) Maintenance and induction in co-cultured rat hepatocytes of components of the cytochrome P450-mediated mono-oxygenase. Biochem Pharmacol 45, 1583-1591.

Ali-Osman, F., Akande, O., Antoun, G., Mao, J.X. and Buolamwini, J. (1997) Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. J Biol Chem 272, 10004-10012.

Allen, R.P., McCann, U.D. and Ricaurte, G.A. (1993) Persistent effects of (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on human sleep. Sleep 16, 560-564.

Ameyaw, M.M., Syvanen, A.C., Ulmanen, I., Ofori-Adjei, D. and McLeod, H.L. (2000) Pharmacogenetics of catechol-O-methyltransferase: frequency of low activity allele in a Ghanaian population. Hum Mutat 16, 445-446.

Andreu, V., Mas, A., Bruguera, M., Salmeron, J.M., Moreno, V., Nogue, S. and Rodes, J. (1998) Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. J Hepatol 29, 394-397.

Anzenbacher, P. and Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. Cell Mol Life Sci 58, 737–747.

Aono, S., Adachi, Y., Uyama, E., Yamada, Y., Keino, H., Nanno, T., Koiwai, O. and Sato, H. (1995) Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. Lancet 345, 958-959.

Apollonio, L.G., Whittall, I.R., Pianca, D.J., Kyd, J.M. and Maher, W.A. (2006) Product ion mass spectra of amphetamine-type substances, designer analogues, and ketamine using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 20, 2259-2264.

Arriagada, C., Dagnino-Subiabre, A., Caviedes, P., Armero, J.M., Caviedes, R. and Segura-Aguilar, J. (2000) Studies of aminochrome toxicity in a mouse derived neuronal cell line: is this toxicity mediated via glutamate transmission? Amino Acids 18, 363-373.

Asghar, S.J., Tanay, V.A., Baker, G.B., Greenshaw, A. and Silverstone, P.H. (2003) Relationship of plasma amphetamine levels to physiological, subjective, cognitive and biochemical measures in healthy volunteers. Hum Psychopharmacol 18, 291-299.

Bach, M.V., Coutts, R.T. and Baker, G.B. (1999) Involvement of CYP2D6 in the in vitro metabolism of amphetamine, two N-alkylamphetamines and their 4-methoxylated derivatives. Xenobiotica 29, 719-732.

Baggott, M., Heifets, B., Jones, R.T., Mendelson, J., Sferios, E. and Zehnder, J. (2000) Chemical analysis of ecstasy pills. JAMA 284, 2190.

Bai, F., Jones, D.C., Lau, S.S. and Monks, T.J. (2001) Serotonergic neurotoxicity of 3,4-(+/-)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(+/-)-methylendioxymethamphetamine (ecstasy) is potentiated by inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase. Chem Res Toxicol 14, 863-870.

Bai, F., Lau, S.S. and Monks, T.J. (1999) Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of alpha-methyldopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. Chem Res Toxicol 12, 1150-1157.

Barca, A., Pani, B., Tamaro, M. and Russo, E. (1999) Molecular interactions of ruthenium complexes in isolated mammalian nuclei and cytotoxicity on V79 cells in culture. Mutat Res 423, 171-181.

Battaglia, G., Brooks, B.P., Kulsakdinun, C. and De Souza, E.B. (1988a) Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. Eur J Pharmacol 149, 159-163.

Battaglia, G., Yeh, S.Y. and De Souza, E.B. (1988b) MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. Pharmacol Biochem Behav 29, 269-274.

Battaglia, G., Yeh, S.Y., O'Hearn, E., Molliver, M.E., Kuhar, M.J. and De Souza, E.B. (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.

Bedford-Russell, A.R., Schwartz, R.H. and Dawling, S. (1992) Accidental ingestion of 'Ecstasy' (3,4-methylenedioxymethylamphetamine). Arch Dis Child 67, 1114-1115.

Behonick, G.S., Novak, M.J., Nealley, E.W. and Baskin, S.I. (2001) Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes). J Appl Toxicol 21, S15-S22.

Beitia, G., Cobreros, A., Sainz, L. and Cenarruzabeitia, E. (1999) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced hepatotoxicity: effect on cytosolic calcium signals in isolated hepatocytes. Liver 19, 234-241.

Beitia, G., Cobreros, A., Sainz, L. and Cenarruzabeitia, E. (2000) Ecstasy-induced toxicity in rat liver. Liver 20, 8-15.

Bell, S.E.J., Burns, D.T., Dennis, A.C. and Speers, J.S. (2000) Rapid analysis of ecstasy and related phenethylamines in seized tablets by Raman spectroscopy. Analyst 125, 541-544.

Berger, U.V., Gu, X.F. and Azmitia, E.C. (1992) The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. Eur J Pharmacol 215, 153-160.

Bindoli, A., Rigobello, M.P. and Deeble, D.J. (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. Free Radic Biol Med 13, 391-405.

Bindoli, A., Rigobello, M.P. and Galzigna, L. (1989) Toxicity of aminochromes. Toxicol Lett 48, 3-20.

Black, P.H. (1994a) Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. Antimicrob Agents Chemother 38, 1-6.

Black, P.H. (1994b) Immune system-central nervous system interactions: effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain. Antimicrob Agents Chemother 38, 7-12.

Blessing, W.W., Seaman, B., Pedersen, N.P. and Ootsuka, Y. (2003) Clozapine reverses hyperthermia and sympathetically mediated cutaneous vasoconstriction induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in rabbits and rats. J Neurosci 23, 6385-6391.

Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. and Monks, T.J. (2000) Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol 13, 135-160.

Boot, B.P., McGregor, I.S. and Hall, W. (2000) MDMA (Ecstasy) neurotoxicity: assessing and communicating the risks. Lancet 355, 1818-1821.

Brauer, R.B., Heidecke, C.D., Nathrath, W., Beckurts, K.T., Vorwald, P., Zilker, T.R., Schweigart, U., Holscher, A.H. and Siewert, J.R. (1997) Liver transplantation for the treatment of fulminant hepatic failure induced by the ingestion of ecstasy. Transpl Int 10, 229-233.

Broder, S., Subramanian, G. and Venter, J.C. (2002) The human genome. In: J. Licinio and M.-L. Wong (Eds), Pharmacogenomics. The search for individualized therapies, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 9-34.

Brodkin, J., Malyala, A. and Nash, J.F. (1993) Effect of acute monoamine depletion on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. Pharmacol Biochem Behav 45, 647-653.

Brody, S., Krause, C., Veit, R. and Rau, H. (1998) Cardiovascular autonomic dysregulation in users of MDMA ("Ecstasy"). Psychopharmacology 136, 390-393.

Broening, H.W., Bowyer, J.F. and Slikker, W.J. (1995) Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. J Pharmacol Exp Ther 275, 325-333.

Broening, H.W., Morford, L.L., Inman-Wood, S.L., Fukumura, M. and Vorhees, C.V. (2001) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced learning and memory impairments depend on the age of exposure during early development. J Neurosci 21, 3228-3235.

Bronley-DeLancey, A., McMillan, D.C., McMillan, J.M., Jollow, D.J., Mohr, L.C. and Hoel, D.G. (2006) Application of cryopreserved human hepatocytes in trichloroethylene risk assessment: relative disposition of chloral hydrate to trichloroacetate and trichloroethanol. Environ Health Perspect 114, 1237-1242.

Bronson, M.E., Jiang, W., De Ruiter, J. and Clark, C.R. (1995) A behavioral comparison of Nexus, Cathinone, BDB, and MDA. Pharmacol Biochem Behav 51, 473-475.

Brown, C. and Osterloh, J. (1987) Multiple severe complications from recreational ingestion of MDMA ('Ecstasy'). JAMA 258, 780-781.

Brown, H.S., Griffin, M. and Houston, J.B. (2006) Evaluation of Cryopreserved Human Hepatocytes as an Alternative In Vitro System to Microsomes for the Prediction of Metabolic Clearance. Drug Metab Dispos doi:10.1124/dmd.106.011569.

Bryden, A.A., Rothwell, P.J. and O'Reilly, P.H. (1995) Urinary retention with misuse of "ecstasy". BMJ 310, 504.

Burnat, P., Brumant-Payen, C.L., Huart, B., Ceppa, F. and Pailler, F.M. (1996) L'ecstasy: psychostimulant, hallucinogène et toxique. La Presse Médicale 25, 1208-1212.

Caballero, F., Lopez-Navidad, A., Cotorruelo, J. and Txoperena, G. (2002) Ecstasy-induced brain death and acute hepatocellular failure: multiorgan donor and liver transplantation. Transplantation 74, 532-537.

Cadet, J.L. and Brannock, C. (1998) Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. Neurochem Int 32, 117-131.

Cadet, J.L., Ladenheim, B., Baum, I., Carlson, E. and 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.

Cadet, J.L., Ladenheim, B., Hirata, H., Rothman, R.B., Ali, S., Carlson, E., Epstein, C. and Moran, T.H. (1995) Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA): evidence from using CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. Synapse 21, 169-176.

Caldwell, J. (1980) The metabolism of amphetamines and related stimulants in animals and man. In: J. Caldwell (Ed), Amphetamines and Related Stimulants: Chemical, Biological, Clinical, and Sociological Aspects, CRC Press, Boca Raton, pp. 29-46.

Cami, J., Farre, M., Mas, M., Roset, P.N., Poudevida, S., Mas, A., San, L. and de la Torre, R. (2000) Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"): psychomotor performance and subjective effects. J Clin Psychopharmacol 20, 455-466.

Capela, J.P., Meisel, A., Abreu, A.R., Branco, P.S., Ferreira, L.M., Lobo, A.M., Remiao, F., Bastos, M.L. and Carvalho, F. (2006a) Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. J Pharmacol Exp Ther 316, 53-61.

Capela, J.P., Ruscher, K., Lautenschlager, M., Freyer, D., Dirnagl, U., Gaio, A.R., Bastos, M.L., Meisel, A. and Carvalho, F. (2006b) Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia. Neuroscience 139, 1069-1081.

Carmo, H., Remiao, F., Carvalho, F., Fernandes, E., de Boer, D., Reys, L.A. and Bastos, M.L. (2003) 4-Methylthioamphetamine-induced hyperthermia in mice: influence of serotonergic and catecholaminergic pathways. Toxicol Appl Pharmacol 190, 262-271.

Carvalho, F. (1998) Estudo da hepatotoxicidade de d-anfetamina. Ensaios *in vivo* e *in vitro* (tese de doutoramento). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto.

Carvalho, F., Remiao, F., Amado, F., Domingues, P., Correia, A.J. and 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. and 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, M. (2004) Estudos *in vitro* da hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina ("ecstasy") e dos seus metabolitos (tese de doutoramento). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto.

Carvalho, M., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2001) Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. Arch Toxicol 74, 789-793.

Carvalho, M., Carvalho, F., Remião, F., Pereira, M.L., Pires-das-Neves, R. and Bastos, M.L. (2002a) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. Arch Toxicol 76, 166-172.

Carvalho, M., Hawksworth, G., Milhazes, N., Borges, F., Monks, T.J., Fernandes, E., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2002b) Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. Arch Toxicol 76, 581-588.

Carvalho, M., Milhazes, N., Remiao, F., Borges, F., Fernandes, E., Amado, F., Monks, T.J., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2004a) Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. Arch Toxicol 78, 16-24.

Carvalho, M., Remiao, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2004b) The toxicity of N-methyl-alpha-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. Toxicology 200, 193-203.

Carvalho, M., Remiao, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Monteiro, M., Goncalves, M.J., Seabra, V., Amado, F., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2004c) Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. Chem Res Toxicol 17, 623-632.

Chadwick, I.S., Curry, P.D., Linsley, A., Freemont, A.J. and Doran, B. (1991) Ecstasy, 3-4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA), a fatality associated with coagulopathy and hyperthermia. J R Soc Med 84, 371.

Chavdarian, C.G., Karashima, D., Castagnoli, N.J. and Hundley, H.K. (1978) Oxidative and cardiovascular studies on natural and synthetic catecholamines. J Med Chem 21, 548-554.

Cho, A.K., Narimatsu, S. and Kumagai, Y. (1999) Metabolism of drugs of abuse by cytochromes P450. Addiction Biol 4, 283-301.

Chu, T., Kumagai, Y., Di Stefano, E.W. and Cho, A.K. (1996) Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. Biochem Pharmacol 51, 789-796.

Cichon, S., Nothen, M.M., Rietschel, M. and Propping, P. (2000) Pharmacogenetics of schizophrenia. Am J Med Genet 97, 98-106.

Clarke's. (2004) Clarke´s analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material, Pharmaceutical Press, London.

Clauwaert, K.M., Van Bocxlaer, J.F., De Letter, E.A., Van Calenbergh, S., Lambert, W.E. and De Leenheer, A.P. (2000) Determination of the designer drugs 3, 4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine. Clin Chem 46, 1968-1977.

Coecke, S., Bogni, A., Langezaal, I., Worth, A., Hartung, T. and Monshouwer, M. (2001) The use of genetically engineered cells for assessing CYP2D6-related polymorphic effects. Toxicol In Vitro 15, 553-556.

Cohen, R.S. (1995) Subjective reports on the effects of the MDMA ('ecstasy') experience in humans. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 19, 1137-1145.

Colado, M.I., Esteban, B., O'Shea, E., Granados, R. and 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. and Green, A.R. (1998) Role of hyperthermia in the protective action of clomethiazole against MDMA ('ecstasy')-induced neurodegeneration, comparison with the novel NMDA channel blocker AR-R15896AR. Br J Pharmacol 124, 479-484.

Colado, M.I. and Green, A.R. (1995) The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. Eur J Pharmacol 280, 343-346.

Colado, M.I., Murray, T.K. and 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. and Green, A.R. (1999b) 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., Martin, A.B. and Green, A.R. (1999c) Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') administration. Br J Pharmacol 126, 911-924.

Colado, M.I., O'Shea, E., Granados, R., Murray, T.K. and Green, A.R. (1997) 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. and Green, A.R. (1995) The hyperthermic and neurotoxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and 3,4 methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. Br J Pharmacol 115, 1281-1289.

Cole, J.C. and Sumnall, H.R. (2003) Altered states: the clinical effects of Ecstasy. Pharmacol Ther 98, 35-58.

Commins, D.L., Axt, K.J., Vosmer, G. and Seiden, L.S. (1987a) 5,6-Dihydroxytryptamine, a serotonergic neurotoxin, is formed endogenously in the rat brain. Brain Res 403, 7-14.

Commins, D.L., Vosmer, G., Virus, R.M., Woolverton, W.L., Schuster, C.R. and Seiden, L.S. (1987b) Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. J Pharmacol Exp Ther 241, 338-345.

Connor, T.J. (2004) Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'): a stressor on the immune system. Immunology 111, 357-367.

Connor, T.J., McNamara, M.G., Finn, D., Currid, A., O'Malley, M., Redmond, A.M., Kelly, J.P. and Leonard, B.E. (1998) Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. Immunopharmacology 38, 253-260.

Coore, J.R. (1996) A fatal trip with ecstasy: a case of 3,4-methylenedioxymethamphetamine/3,4-methylenedioxyamphetamine toxicity. J R Soc Med 89, 51P-52P.

Cottler, L.B., Womack, S.B., Compton, W.M. and Ben-Abdallah, A. (2001) Ecstasy abuse and dependence among adolescents and young adults: applicability and reliability of DSM-IV criteria. Hum Psychopharmacol 16, 599-606.

Cox, B. and Tha, S.J. (1975) The role of dopamine and noradrenaline in temperature control of normal and reserpine-pretreated mice. J Pharm Pharmacol 27, 242-247.

Cravchik, A. and Gejman, P.V. (1999) Functional analysis of the human D5 dopamine receptor missense and nonsense variants: differences in dopamine binding affinities. Pharmacogenetics 9, 199-206.

Crespi, D., Mennini, T. and Gobbi, M. (1997) Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylendioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. Br J Pharmacol 121, 1735-1743.

Crino, P.B., Vogt, B.A., Chen, J.C. and Volicer, L. (1989) Neurotoxic effects of partially oxidized serotonin: tryptamine-4,5-dione. Brain Res 504, 247-257.

Cunningham, M. (1997) Ecstasy-induced rhabdomyolysis and its role in the development of acute renal failure. Intensive Crit Care Nurs 13, 216-223.

Dafters, R.I. (1995) Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consumption, and chronic dosing. Physiol Behav 58, 877-828.

Dafters, R.I., Duffy, F., O'Donnell, P.J. and Bouquet, C. (1999) Level of use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or Ecstasy) in humans correlates with EEG power and coherence. Psychopharmacology 145, 82-90.

Dafters, R.I. and 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.

Dahl, M.L. (2002) Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing? Clin Pharmacokinet 41, 453-470.

Daly, A.K. (2003) Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. Fundam Clin Pharmacol 17, 27–41.

Dams, R., De Letter, E.A., Mortier, K.A., Cordonnier, J.A., Lambert, W.E., Piette, M.H., Van Calenbergh, S. and De Leenheer, A.P. (2003) Fatality due to combined use of the designer drugs MDMA and PMA: a distribution study. J Anal Toxicol 27, 318-322.

Dar, K.J. and McBrien, M.E. (1996) MDMA induced hyperthermia: report of a fatality and review of current therapy. Intensive Care Med 22, 995-996.

Darvesh, A.S., Shankaran, M. and Gudelsky, G.A. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine produces glycogenolysis and increases the extracellular concentration of glucose in the rat brain. J Pharmacol Exp Ther 301, 138-144.

Darvesh, A.S., Yamamoto, B.K. and Gudelsky, G.A. (2005) Evidence for the involvement of nitric oxide in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletion in the rat brain. J Pharmacol Exp Ther 312, 694-701.

Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R. and Snyder, S.H. (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. J Neurosci 13, 2651-2661.

Dawson, V.L., Kizushi, V.M., Huang, P.L., Snyder, S.H. and Dawson, T.M. (1996) Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. J Neurosci 16, 2479-2487.

de Boer, D. and Bosman, I. (2004) A new trend in drugs-of-abuse; the 2C-series of phenethylamine designer drugs. Pharm World Sci 26, 110-113.

de Boer, D., Egberts, T. and Maes, R.A.A. (1999a) Para-methylthioamphetamine, a new amphetamine designer drug of abuse. Pharm World Sci 21, 47-48.

de Boer, D., Gijzels, M.J., Bosman, I.J. and Maes, R.A.A. (1999b) More data about the new psychoactive drug 2C-B. J Anal Toxicol 23, 227-228.

de Boer, D., Reys, L.A.d., Pylon, N., Gijzels, M., Bosman, I.J. and Maes, R.A.A. (1998) Studies on the metabolism of 2C-B. Joint SOFT/TIAFT international meeting, Alberquerque, NM; USA, pp. 352-354.

de Boer, D., Reys, L.A.d., Pylon, N., Gijzels, M., Bosman, I.J. and Maes, R.A.A. (1999c) Preliminary results on the urinary excretion of 2C-B (4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine) and its metabolites in humans. Br J Pharmacol 127, 41P.

Decaestecker, T., De Letter, E.A., Clauwaert, K., Bouche, M.P., Lambert, W., Van Bocxlaer, J., Piette, M., Van den Eeckhout, E., Van Peteghem, C. and De Leenheer, A. (2001) Fatal 4-MTA intoxication: development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for multiple matrices. J Anal Toxicol 25, 705-710.

Delaforge, M., Jaouen, M. and Bouille, G. (1999) Inhibitory metabolite complex formation of methylenedioxymethamphetamine with rat and human cytochrome P450. Particular involvement of CYP 2D. Environ Toxicol Pharmacol 7, 153-158.

de la Torre, R., Farre, M., Mathuna, B.O., Roset, P.N., Pizarro, N., Segura, M., Torrens, M., Ortuno, J., Pujadas, M. and Cami, J. (2005) MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. Eur J Clin Pharmacol 61, 551-554.

de la Torre, R., Farre, M., Navarro, M., Pacifici, R., Zuccaro, P. and Pichini, S. (2004a) Clinical pharmacokinetics of amfetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices. Clin Pharmacokinet 43, 157-185.

de la Torre, R., Farre, M., Ortuno, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P.N., Segura, J. and Cami, J. (2000a) Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. Br J Clin Pharmacol 49, 104-109.

de la Torre, R., Farre, M., Roset, P.N., Lopez, C.H., Mas, M., Ortuno, J., Menoyo, E., Pizarro, N., Segura, J. and Cami, J. (2000b) Pharmacology of MDMA in humans. Ann N Y Acad Sci 914, 225-237.

de la Torre, R., Farre, M., Roset, P.N., Pizarro, N., Abanades, S., Segura, M., Segura, J. and Cami, J. (2004b) Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. Ther Drug Monit 26, 137-144.

de Letter, E.A., Bouche, M.P., Van Bocxlaer, J.F., Lambert, W.E. and Piette, M.H. (2004) Interpretation of a 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities. Forensic Sci Int 141, 85-90.

de Letter, E.A., Clauwaert, K.M., Lambert, W.E., Van Bocxlaer, J.F., De Leenheer, A.P. and Piette, M.H. (2002) Distribution study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. J Anal Toxicol 26, 113-118.

de Letter, E.A., Coopman, V.A.E., Cordonnier, J.A.C.M. and Piette, M.H.A. (2001) One fatal and seven non-fatal cases of 4-methylthioamphetamine (4-MTA) intoxication: clinico-pathological findings. Int J Legal Med 114, 352-356.

de Letter, E.A., Piette, M.H., Lambert, W.E. and Cordonnier, J.A. (2006) Amphetamines as potential inducers of fatalities: a review in the district of Ghent from 1976-2004. Med Sci Law 46, 37-65.

Demisch, L. and Seiler, N. (1975) Oxidative metabolism of mescaline in the central nervous system--V. In vitro deamination of mescaline to 3,4,5-trimethoxy-benzoic acid. Biochem Pharmacol 24, 575-580.

de Morais, S.M., Uetrecht, J.P. and Wells, P.G. (1992) Decreased glucuronidation and increased bioactivation of acetaminophen in Gilbert's syndrome. Gastroenterology 102, 577-586.

Denborough, M.A. and Hopkinson, K.C. (1997) Dantrolene and "ecstasy". Med J Aust 166, 165-166.

de Sousa, G., Florence, N., Valles, B., Coassolo, P. and Rahmani, R. (1995) Relationships between in vitro and in vivo biotransformation of drugs in humans and animals: pharmaco-toxicological consequences. Cell Biol Toxicol 11, 147-153.

de Sousa, G., Nicolas, F., Placidi, M., Rahmani, R., Benicourt, M., Vannier, B., Lorenzon, G., Mertens, K., Coecke, S., Callaerts, A., Rogiers, V., Khan, S., Roberts, P., Skett, P., Fautrel, A., Chesne, C. and Guillouzo, A. (1999) A multi-laboratory evaluation of cryopreserved monkey hepatocyte functions for use in pharmaco-toxicology. Chem Biol Interact 121, 77-97.

Doehmer, J., Buters, J.T., Luch, A., Soballa, V., Baird, W.M., Morisson, H., Stegeman, J.J., Townsend, A.J., Greenlee, W.F., Glatt, H.R., Seidel, A., Jacob, J. and Greim, H. (1999) Molecular studies on the toxifying effects by genetically engineered cytochromes P450. Drug Metab Rev 31, 423-435.

Dowling, G.P., McDonoughIII, E.T. and Bost, R.O. (1987) 'Eve' and 'Ecstasy'. A report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA. JAMA 257, 1615-1617.

Downing, J. (1986) The psychological and physiological effects of MDMA on normal volunteers. J Psychoactive Drugs 18, 335-340.

Dring, L.G., Smith, R.L. and Williams, R.T. (1970) The metabolic fate of amphetamine in man and other species. Biochem J 116, 425-435.

Duarte, J.A., Leao, A., Magalhaes, J., Ascensao, A., Bastos, M.L., Amado, F.L., Vilarinho, L., Quelhas, D., Appell, H.J. and Carvalho, F. (2005) Strenuous exercise aggravates MDMA-induced skeletal muscle damage in mice. Toxicology 206, 349-358.

Dukat, M., Young, R. and Glennon, R.A. (2002) Effect of PMA optical isomers and 4-MTA in PMMA-trained rats. Pharmacol Biochem Behav 72, 299-305.

Dumont, G.J. and Verkes, R.J. (2006) A review of acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in healthy volunteers. J Psychopharmacol 20, 176-187.

Dykhuizen, R.S., Brunt, P.W., Atkinson, P., Simpson, J.G. and Smith, C.C. (1995) Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. Gut 36, 939-941.

Easton, N., Fry, J., O'Shea, E., Watkins, A., Kingston, S. and Marsden, C.A. (2003) Synthesis, in vitro formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy). Brain Res 987, 144-154.

Easton, N. and Marsden, C.A. (2006) Ecstasy: are animal data consistent between species and can they translate to humans? J Psychopharmacol 20, 194-210.

Eichelbaum, M. (1984) Polymorphic drug oxidation in humans. Fed Proc 43, 2298-2302.

Eiselt, R., Domanski, T.L., Zibat, A., Mueller, R., Presecan-Siedel, E., Hustert, E., Zanger, U.M., Brockmoller, J., Klenk, H.P., Meyer, U.A., Khan, K.K., He, Y.A., Halpert, J.R. and Wojnowski, L. (2001) Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. Pharmacogenetics 11, 447-458.

Ekins, S., Vandenbranden, M., Ring, B.J., Gillespie, J.S., Yang, T.J., Gelboin, H.V. and Wrighton, S.A. (1998) Further characterization of the expression in liver and catalytic activity of CYP2B6. J Pharmacol Exp Ther 286, 1253-1259.

Ekins, S. and Wrighton, S.A. (1999) The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism. Drug Metab Rev 31, 719-754.

Elliott, S.P. (2000) Fatal Poisoning with a new phenethylamine: 4-methylthioamphetamine (4-MTA). J Anal Toxicol 24, 85-89.

Elliott, S.P. (2001) Analysis of 4-methylthioamphetamine in clinical specimens. Ann Clin Biochemistry 38, 339-347.

Ellis, A.J., Wendon, J.A., Portmann, B. and Williams, R. (1996) Acute liver damage and ecstasy ingestion. Gut 38, 454-458.

EMCDDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (1999) Report on the Risk Assessment of 4-MTA in the Framework of the Joint Action on New Synthetic Drugs. Office for official publications of the European. Communities, Luxembourg, pp. 3-114.

Ensslin, H.K., Kovar, K.A. and Maurer, H.H. (1996) Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, "Eve") and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. J Chromatogr B Biomed Appl 683, 189-197.

EPA. Environmental Protection Agency (1998) Health effects test guidelines OPPTS 870.5300. In vitro mammalian cell gene mutation test, pp. 1-12.

Escobedo, I., O'Shea, E., Orio, L., Sanchez, V., Segura, M., de la Torre, R., Farre, M., Green, A.R. and Colado, M.I. (2005) A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. Br J Pharmacol 144, 231-241.

Esteban, B., O'Shea, E., Camarero, J., Sanchez, V., Green, A.R. and Colado, M.I. (2001) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. Psychopharmacology 154, 251-260.

European Communities. (1999) Council decision of 13 September 1999 defining 4-MTA as a new synthetic drug which is to be made subject to control measures and criminal penalties. Official Journal of the European Communities, p. 1.

Evans, W.E. and McLeod, H.L. (2003) Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. N Engl J Med 348, 538-549.

Evans, W.E. and Relling, M.V. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science 286, 487-491.

Ewald, A.H., Peters, F.T., Weise, M. and Maurer, H.H. (2005) Studies on the metabolism and toxicological detection of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA) in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 824, 123-131.

Fallon, J.K., Kicman, A.T., Henry, J.A., Milligan, P.J., Cowan, D.A. and Hutt, A.J. (1999) Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) in humans. Clin Chem 45, 1058-1069.

Fang, C., Chung, Y.L., Liu, J.T. and Lin, C.H. (2002) Rapid analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a comparison of nonaqueous capillary electrophoresis/fluorescence detection with GC/MS. Forensic Sci Int 125, 142-148.

Fantegrossi, W.E., Godlewski, T., Karabenick, R.L., Stephens, J.M., Ullrich, T., Rice, K.C. and Woods, J.H. (2003) Pharmacological characterization of the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") and its enantiomers on lethality, core temperature, and locomotor activity in singly housed and crowded mice. Psychopharmacology 166, 202-211.

Faraj, B.A., Olkowski, Z.L. and Jackson, R.T. (1994) Active [3H]-dopamine uptake by human lymphocytes: correlates with serotonin transporter activity. Pharmacology 48, 320-327.

Farfel, G.M. and 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.

Farfel, G.M., Vosmer, G.L. and Seiden, L.S. (1992) The N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801 protects against serotonin depletions induced by methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine. Brain Res 595, 121-127.

Farré, M., de la Torre, R., Mathuna, B.O., Roset, P.N., Peiró, A.M., Torrens, M., Ortuno, J., Pujadas, M. and Camí, J. (2004) Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. Psychopharmacology 173, 364-375.

Fields, W.R., Morrow, C.S., Doehmer, J. and Townsend, A.J. (1999) Expression of stably transfected murine glutathione S-transferase A3-3 protects against nucleic acid alkylation and cytotoxicity by aflatoxin B1 in hamster V79 cells expressing rat cytochrome P450-2B1. Carcinogenesis 20, 1121-1125.

Filep, J. and Rosenkranz, B. (1987) Mechanism of vasopressin-induced platelet aggregation. Thromb Res 45, 7-15.

Fineschi, V., Centini, F., Mazzeo, E. and Turillazzi, E. (1999) Adam (MDMA) and Eve (MDEA) misuse: an immunohistochemical study on three fatal cases. Forensic Sci Int 104, 65-74.

Fineschi, V. and Masti, A. (1996) Fatal poisoning by MDMA (ecstasy) and MDEA: a case report. Int J Legal Med 108, 272-275.

Fitzgerald, J.L. and Reid, J.J. (1994) Sympathomimetic actions of methylenedioxymethamphetamine in rat and rabbit isolated cardiovascular tissues. J Pharm Pharmacol 46, 826-832.

Fitzgerald, R.L., Blanke, R.V. and Poklis, A. (1990) Stereoselective pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the rat. Chirality 2, 241-248.

Flanagin, B.A., Cook, E.H.J. and de Wit, H. (2006) An association study of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and amphetamine response. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 141, 576-583.

Foley, R.J., Kapatkin, K., Verani, R. and Weinman, E.J. (1984) Amphetamine-induced acute renal failure. South Med J 77, 258-260.

Ford, D.K. and Yerganian, G. (1958) Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. J Natl Cancer Inst 21, 393-425.

Forsling, M.L., Fallon, J.K., Shah, D., Tilbrook, G.S., Cowan, D.A., Kicman, A.T. and Hutt, A.J. (2002) The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus. Br J Pharmacol 135, 649-656.

Foster, B.C., Litster, D.L., Buttar, H.S., Dawson, B. and Zamecnik, J. (1993) Biotransformation and urinary excretion of 4-substituted amphetamines in pregnant mice. Biopharm Drug Dispos 14, 709-719.

Frederick, D.L. and Paule, M.G. (1997) Effects of MDMA on complex brain function in laboratory animals. Neurosci Biobehav Rev 21, 67-78.

Freimuth, R.R., Eckloff, B., Wieben, E.D. and Weinshilboum, R.M. (2001) Human sulfotransferase SULT1C1 pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomic studies. Pharmacogenetics 11, 747-756.

Frith, C.H., Chang, L.W., Lattin, D.L., Walls, R.C., Hamm, J. and Doblin, R. (1987) Toxicity of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the dog and the rat. Fundam Appl Toxicol 9, 110-119.

Fukuda, T., Nishida, Y., Imaoka, S., Hiroi, T., Naohara, M., Funae, Y. and Azuma, J. (2000) The decreased in vivo clearance of CYP2D6 substrates by CYP2D6*10 might be caused not only by the low-expression but also by low affinity of CYP2D6. Arch Biochem Biophys 380, 303-308.

Gabelova, A., Farkasova, T., Bacova, G. and Robichova, S. (2002) Mutagenicity of 7H-dibenzo[c,g]carbazole and its tissue specific derivatives in genetically engineered Chinese hamster V79 cell lines stably expressing cytochrome P450. Mutat Res 517, 135-145.

Ganapathy, V., Prasad, P.D., Ganapathy, M.E. and Leibach, F.H. (1999) Drugs of abuse and placental transport. Adv Drug Deliv Rev 38, 99-110.

Garcia-Repetto, R., Moreno, E., Soriano, T., Jurado, C., Gimenez, M.P. and Menendez, M. (2003) Tissue concentrations of MDMA and its metabolite MDA in three fatal cases of overdose. Forensic Sci Int 135, 110-114.

Garrett, E.R., Seyda, K. and 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.

Gerra, G., Zaimovic, A., Ferri, M., Zambelli, U., Timpano, M., Neri, E., Marzocchi, G.F., Delsignore, R. and Brambilla, F. (2000) Long-lasting effects of (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) on serotonin system function in humans. Biol Psychiatry 47, 127-136.

Gerra, G., Zaimovic, A., Giucastro, G., Maestri, D., Monica, C., Sartori, R., Caccavari, R. and Delsignore, R. (1998) Serotonergic function after (+/-)3,4-methylene-dioxymethamphetamine ('Ecstasy') in humans. Int Clin Psychopharmacol 13, 1-9.

Gesi, M., Lenzi, P., Soldani, P., Ferrucci, M., Giusiani, A., Fornai, F. and Paparelli, A. (2002a) Morphological effects in the mouse myocardium after methylenedioxymethamphetamine administration combined with loud noise exposure. Anat Rec 267, 37-46.

Gesi, M., Soldani, P., Lenzi, P., Ferrucci, M., Giusiani, A., Fornai, F. and Paparelli, A. (2002b) Ecstasy during loud noise exposure induces dramatic ultrastructural changes in the heart. Pharmacol Toxicol 91, 29-33.

Gijzels, M. (1997) 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine. Identification in street samples. Profiling in biological specimens., Netherlands Institute for Drugs and Doping Research. Faculty of Pharmacy, Universiteit Utrecht, Utrecht, p. 24.

Gilhooly, T.C. and Daly, A.K. (2002) CYP2D6 deficiency, a factor in ecstasy related deaths? Br J Clin Pharmacol 54, 69-70.

Giroud, C., Augsburger, M., Rivier, L., Mangin, P., Sadeghipour, F., Varesio, E., Veuthey, J.L. and Kamalaprija, P. (1998) 2C-B: A new psychoactive phenylethylamine recently discovered in ecstasy tablets sold on the Swiss black market. J Anal Toxicol 22, 345-354.

Giroud, C., Augsburger, M., Sadeghipour, F., Varesio, E., Veuthey, J.-L. and Rivier, L. (1997) Ecstasy-the situation in the French part of Switzerland: Composition of the seized drugs, analysis of biological specimens and short review of its pharmacology and toxicology. Praxis 86, 510-523.

Glennon, R.A. (1999) Arylalkylamine drugs of abuse: an overview of drug discrimination studies. Pharmacol Biochem Behav 64, 251-256.

Glennon, R.A., Titeler, M. and Lyon, R.A. (1988) A preliminary investigation of the psychoactive agent 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine: a potential drug of abuse. Pharmacol Biochem Behav 30, 597-601.

Gobbi, M., Moia, M., Pirona, L., Ceglia, I., Reyes-Parada, M., Scorza, C. and Mennini, T. (2002) p-Methylthioamphetamine and 1-(m-chlorophenyl)piperazine, two non-neurotoxic 5-HT releasers in vivo, differ from neurotoxic amphetamine derivatives in their mode of action at 5-HT nerve endings in vitro. J Neurochem 82, 1435-1443.

Gollamudi, R., Ali, S.F., Lipe, G., Newport, G., Webb, P., Lopez, M., Leakey, J., Kolta, M. and Slikker, W.J. (1989) Influence of inducers and inhibitors on the metabolism in vitro and neurochemical effects in vivo of MDMA. Neurotoxicology 10, 455-466.

Gong, D.W., He, Y., Karas, M. and Reitman, M. (1997) Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. J Biol Chem 272, 24129-24132.

Goodwin, B., Moore, L.B., Stoltz, C.M., McKee, D.D. and Kliewer, S.A. (2001) Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. Mol Pharmacol 60, 427-431.

Gordon, C.J., Watkinson, W.P., O'Callaghan, J.P. and Miller, D.B. (1991) Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. Pharmacol Biochem Behav 38, 339-344.

Gore, S.M. (1999) Fatal uncertainty: death-rate from use of ecstasy or heroin. Lancet 354, 1265-1266.

Gough, A.C., Miles, J.S., Spurr, N.K., Moss, J.E., Gaedigk, A., Eichelbaum, M. and Wolf, C.R. (1990) Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. Nature 347, 773-776.

Gouzoulis-Mayfrank, E. and Daumann, J. (2006) Neurotoxicity of methylenedioxyamphetamines (MDMA; ecstasy) in humans: how strong is the evidence for persistent brain damage? Addiction 101, 348-361.

Green, A.R. (2004) MDMA: fact and fallacy, and the need to increase knowledge in both the scientific and popular press. Psychopharmacology 173, 231-233.

Green, A.R., Cross, A.J. and Goodwin, G.M. (1995) Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"). Psychopharmacology 119, 247-260.

Green, A.R., Mechan, A.O., Elliott, J.M., O'Shea, E. and Colado, M.I. (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). Pharmacol Rev 55, 463-508.

Green, A.R., O'Shea, E. and Colado, M.I. (2004) A review of the mechanisms involved in the acute MDMA (ecstasy)-induced hyperthermic response. Eur J Pharmacol 500, 3-13.

Green, C.E., Le Valley, S.E. and Tyson, C.A. (1986) Comparison of amphetamine metabolism using isolated hepatocytes from five species including human. J Pharmacol Exp Ther 237, 931-936.

Greene, S.L., Dargan, P.I., O'connor, N., Jones, A.L. and Kerins, M. (2003) Multiple toxicity from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). Am J Emerg Med 21, 121-124.

Grob, C.S., Poland, R.E., Chang, L. and Ernst, T. (1996) Psychobiologic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans: methodological considerations and preliminary observations. Behav Brain Res 73, 103-107.

Groombridge, C.J. (1998) The Identification of 4-Methylthioamphetamine in a Drug Seizure. Microgram XXXI, 150-159.

Grynberg, A., Ziegler, D. and Rupp, H. (1996) Sympathoadrenergic overactivity and lipid metabolism. Cardiovasc Drugs Ther 10, 223-230.

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. and 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. and Yamamoto, B.K. (2003) Neuropharmacology and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. Methods Mol Med 79.

Gudelsky, G.A., Yamamoto, B.K. and 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.

Guillouzo, A., Rialland, L., Fautrel, A. and Guyomard, C. (1999) Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. Chem Biol Interact 121, 7-16.

Gunasekar, P.G., Kanthasamy, A.G., Borowitz, J.L. and Isom, G.E. (1995) NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. J Neurochem 65, 2016-2021.

Halket, J.M. (1993) Derivatives for gas chromatography-mass spectrometry. In: K. Blau and J.M. Halket (Eds), Handbook of derivatives for chromatography, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 297-325.

Hall, A.P., Lyburn, I.D., Spears, F.D. and Riley, B. (1996) An unusual case of Ecstasy poisoning. Intensive Care Med 22, 670-671.

Halliwell, B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res Commun 9, 1-32.

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

Hanioka, N., Kimura, S., Meyer, U.A. and Gonzalez, F.J. (1990) The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. Am J Hum Genet 47, 994-1001.

Harris, D.S., Baggott, M., Mendelson, J.H., Mendelson, J.E. and Jones, R.T. (2002) Subjective and hormonal effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. Psychopharmacology 162, 396-405.

Hartung, T.K., Schofield, E., Short, A.I., Parr, M.J. and Henry, J.A. (2002) Hyponatraemic states following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') ingestion. QJM 95, 431-437.

Hashimoto, T., Hashimoto, K., Matsuzawa, D., Shimizu, E., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H. and Iyo, M. (2005) A functional glutathione S-transferase P1 gene polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 135, 5-9.

Hastings, T.G., Lewis, D.A. and Zigmond, M.J. (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 1956-1961.

Hatzidimitriou, G., McCann, U.D. and Ricaurte, G.A. (1999) Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery. J Neurosci 19, 5096-5107.

He, S.Y. (1995) Methamphetamine-induced toxicity in cultured adult rat cardiomyocytes. Nihon Hoigaku Zasshi 49, 175-186.

Hegadoren, K.M., Baker, G.B. and Bourin, M. (1999) 3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. Neurosci Biobehav Rev 23, 539-553.

Hegadoren, K.M., Martin-Iverson, M.T. and Baker, G.B. (1995) Comparative behavioural and neurochemical studies with a psychomotor stimulant, an hallucinogen and 3,4-methylenedioxy analogues of amphetamine. Psychopharmacology 118, 295-304.

Hegedus, Z.L. (2000) The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. Toxicology 145, 85-101.

Heim, M. and Meyer, U.A. (1990) Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. Lancet 336, 529-532.

Helmlin, H.J., Bracher, K., Bourquin, D., Vonlanthen, D. and Brenneisen, R. (1996) Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. J Anal Toxicol 20, 432-440.

Hemmersbach, P. and de la Torre, R. (1996) Stimulants, narcotics and beta-blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. J Chromatogr B Biomed Appl 687, 221-238.

Hengstler, J.G., Ringel, M., Biefang, K., Hammel, S., Milbert, U., Gerl, M., Klebach, M., Diener, B., Platt, K.L., Böttger, T., Steinberg, P. and Oesch, F. (2000a) Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. Chem Biol Interact 125, 51-73.

Hengstler, J.G., Utesch, D., Steinberg, P., Ringel, M., Swales, N., Biefang, K., Platt, K.L., Diener, B., Böttger, T., Fischer, T. and Oesch, F. (2000b) Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available *in vitro* model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. Drug Metab Rev 32, 81-118.

Henry, J.A., Fallon, J.K., Kicman, A.T., Hutt, A.J., Cowan, D.A. and Forsling, M. (1998) Low-dose MDMA ("ecstasy") induces vasopressin secretion. Lancet 351, 1784.

Henry, J.A. and Hill, I.R. (1998) Fatal interaction between ritonavir and MDMA. Lancet 352, 1751-1752.

Henry, J.A., Jeffreys, K.J. and Dawling, S. (1992) Toxicity and Deaths from 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). Lancet 340, 384-387.

Hensley, D. and Cody, J.T. (1999) Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS. J Anal Toxicol 23, 518-523.

Hernandez-Lopez, C., Farre, M., Roset, P.N., Menoyo, E., Pizarro, N., Ortuno, J., Torrens, M., Cami, J. and de la Torre, R. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and alcohol interactions in humans: psychomotor performance, subjective effects, and pharmacokinetics. J Pharmacol Exp Ther 300, 236-244.

Hewitt, K.E. and 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.

Hewitt, N.J., Fischer, T., Zuehlke, U., Oesch, F. and Utesch, D. (2000) Metabolic activity of fresh and cryopreserved cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) hepatocytes. Xenobiotica 30, 665-681.

Heydari, A., Yeo, K.R., Lennard, M.S., Ellis, S.W., Tucker, G.T. and Rostami-Hodjegan, A. (2004) Mechanism-based inactivation of CYP2D6 by methylenedioxymethamphetamine. Drug Metab Dispos 32, 1213-1217.

Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Unger, S.E. and 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.

Hiratsuka, M. and Mizugaki, M. (2001) Genetic Polymorphisms in Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Targets. Mol Genet and Metab 73, 298–305.

Ho, E., Karimi-Tabesh, L. and Koren, G. (2001) Characteristics of pregnant women who use ecstasy (3, 4-methylenedioxymethamphetamine). Neurotoxicol Teratol 23, 561-567.

Hoffman, B.B. and Lefkowitz, R.J. (1996) Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon and A.G. Gilman (Eds), Goodman & Gillman's The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, New York, pp. 199-248.

Hohoff, C., McDonald, J.M., Baune, B.T., Cook, E.H., Deckert, J. and de Wit, H. (2005) Interindividual variation in anxiety response to amphetamine: possible role for adenosine A2A receptor gene variants. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 139, 42-44.

Holden, R. and Jackson, M.A. (1996) Near-fatal hyponatraemic coma due to vasopressin over-secretion after "ecstasy" (3,4-MDMA). Lancet 347, 1052.

Holland, G.F., Buck, C.J. and Weissman, A. (1963) Anorexigenic agents: Aromatic substituted 1-phenyl-2-propylamines. J Med Chem 19.

Holmes, S.B., Banerjee, A.K. and Alexander, W.D. (1999) Hyponatraemia and seizures after ecstasy use. Postgrad Med J 75, 32-33.

Holt, S.G. and Moore, K.P. (2001) Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. Intensive Care Med 27, 803-811.

Honkakoski, P. and Negishi, M. (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. Biochem J 347, 321-337.

Horner, S.A., Fry, J.R., Clothier, R.H. and Balls, M. (1985) A comparison of two cytotoxicity assays for the detection of metabolism-mediated toxicity in vitro: a study with cyclophosphamide. Xenobiotica 15, 681-686.

House, R.V., Thomas, P.T. and 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. and Bhargava, H.N. (1995) Selective modulation of immune function resulting from in vitro exposure to methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). Toxicology 96, 59-69.

Howard, L.A., Sellers, E.M. and Tyndale, R.F. (2002) The role of pharmacogenetically-variable cytochrome P450 enzymes in drug abuse and dependence. Pharmacogenomics 3, 185-199.

Huang, J.D., Guo, W.C., Lai, M.D., Guo, Y.L. and Lambert, G.H. (1999) Detection of a novel cytochrome P-450 1A2 polymorphism (F21L) in Chinese. Drug Metab Dispos 27, 98-101.

Huang, X., Marona-Lewicka, D. and Nichols, D.E. (1992) p-Methylthioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotonin-releasing agent. Eur J Pharmacol 229, 31-38.

Huether, G., Zhou, D. and Ruther, 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.

Hurtado-Guzman, C., Fierro, A., Iturriaga-Vasquez, P., Sepulveda-Boza, S., Cassels, B.K. and Reyes-Parada, M. (2003) Monoamine oxidase inhibitory properties of optical isomers and N-substituted derivatives of 4-methylthioamphetamine. J Enzyme Inhib Med Chem 18, 339-347.

Hurtado-Guzman, C., Martinez-Alvarado, P., Dagnino-Subiabre, A., Paris, I., Caviedes, P., Caviedes, R., Cassels, B.K. and Segura-Aguilar, J. (2002) Neurotoxicity of some MAO inhibitors in adult rat hypothalamic cell culture. Neurotox Res 4, 161-163.

Hustert, E., Zibat, A., Presecan-Siedel, E., Eiselt, R., Mueller, R., Fuss, C., Brehm, I., Brinkmann, U., Eichelbaum, M., Wojnowski, L. and Burk, O. (2001) Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. Drug Metab Dispos 29, 1454-1459.

Ide, S., Kobayashi, H., Ujike, H., Ozaki, N., Sekine, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Iwata, N., Tanaka, K., Shen, H., Iwahashi, K., Itokawa, M., Minami, M., Satoh, M., Ikeda, K. and Sora, I. (2006) Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. Pharmacogenomics J 6, 179-188.

IDT. Instituto da Droga e da Toxicodependência (2004) Relatório Anual 2003 - A Situação do País em Matéria de Drogas e Toxicodependências. Vol. I - Informação Estatística 2003, Lisboa, pp. 157-158.

Ingelman-Sundberg, M. (2004a) Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 369, 89-104.

Ingelman-Sundberg, M. (2004b) Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. Trends Pharmacol Sci 25, 193-200.

Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. and McLellan, R.A. (1999) Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. Trends Pharmacol Sci 20, 342-349.

Ioannides, C. (1999) Effect of diet and nutrition on the expression of cytochromes P450. Xenobiotica 29, 109-154.

Irwin, M., Hauger, R.L., Jones, L., Provencio, M. and 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.

Ishigami, A., Tokunaga, I., Gotohda, T. and Kubo, S. (2003) Immunohistochemical study of myoglobin and oxidative injury-related markers in the kidney of methamphetamine abusers. Leg Med 5:42-48

Iyer, L., King, C.D., Whitington, P.F., Green, M.D., Roy, S.K., Tephly, T.R., Coffman, B.L. and Ratain, M.J. (1998) Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. J Clin Invest 101, 847-854.

Jacob 3rd, P. and Shulgin, A.T. (1994) Structure-activity relationships of the classic hallucinogens and their analogs. NIDA Res Monogr 146, 74-91.

James, R.C., Roberts, S.M. and Harbison, R.D. (1983) The perturbation of hepatic glutathione by alpha 2-adrenergic agonists. Fundam Appl Toxicol 3, 303-308.

Jansen, K.L. (1999) Ecstasy (MDMA) dependence. Drug Alcohol Depend 53, 121-124.

Jayanthi, S., Ladenheim, B., Andrews, A.M. and 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.

Jezova, D. and Vigas, M. (1988) Apomorphine injection stimulates beta-endorphin, adrenocorticotropin, and cortisol release in healthy man. Psychoneuroendocrinology 13, 479-485.

Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Ohno, A., Makino, Y., Matsushima, E., Hanioka, N. and Ando, M. (2003) Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. Drug Metab Dispos 31, 398-403.

Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjoqvist, F. and Ingelman-Sundberg, M. (1993) Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 11825-11829.

Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q.Y., Bertilsson, L., Sjoqvist, F. and Ingelman-Sundberg, M. (1994) Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. Mol Pharmacol 46, 452-459.

Johnson, E.A., Shvedova, A.A., Kisin, E., O'Callaghan, J.P., Kommineni, C. and Miller, D.B. (2002) d-MDMA during vitamin E deficiency: effects on dopaminergic neurotoxicity and hepatotoxicity. Brain Res 933, 150-163.

Johnson, J.A. (2003) Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. Trends Genet 19, 660-666.

Johnson, M., Elayan, I., Hanson, G.R., Foltz, R.L., Gibb, J.W. and Lim, H.K. (1992) Effects of 3,4-dihydroxymethamphetamine and 2,4,5-trihydroxymethamphetamine, two metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, on central serotonergic and dopaminergic systems. J Pharmacol Exp Ther 261, 447-453.

Johnson, M., Hanson, G.R. and Gibb, J.W. (1989) Effect of MK-801 on the decrease in tryptophan hydroxylase induced by methamphetamine and its methylenedioxy analog. Eur J Pharmacol 165, 315-318.

Johnson, M., Letter, A.A., Merchant, K., Hanson, G.R. and 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.

Johnson, M.P., Conarty, P.F. and Nichols, D.E. (1991) (^{3}H) Monoamine releasing and uptake inhibition properties of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine analogues. Eur J Pharmacol 200, 9-16.

Jones, A.L. and Simpson, K.J. (1999) Review article: mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications. Aliment Pharmacol Ther 13, 129-133.

Jones, A.W. (2005) Driving under the influence of drugs in Sweden with zero concentration limits in blood for controlled substances. Traffic Inj Prev 6, 317-322.

Jones, A.W. and Holmgren, A. (2005) Abnormally high concentrations of amphetamine in blood of impaired drivers. J Forensic Sci 50, 1215-1220.

Jones, D.C., Duvauchelle, C., Ikegami, A., Olsen, C.M., Lau, S.S., de la Torre, R. and Monks, T.J. (2005) Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. J Pharmacol Exp Ther 313, 422-431.

Jurado, C., Gimenez, M.P., Soriano, T., Menendez, M. and Repetto, M. (2000) Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS. J Anal Toxicol 24, 11-16.

Kall, M.A. and Clausen, J. (1995) Dietary effect on mixed function P450 1A2 activity assayed by estimation of caffeine metabolism in man. Hum Exp Toxicol 14, 801-807.

Kanamori, T., Inoue, H., Iwata, Y., Ohmae, Y. and Kishi, T. (2002) In vivo metabolism of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in the rat: identification of urinary metabolites. J Anal Toxicol 26, 61-66.

Kanamori, T., Tsujikawa, K., Ohmae, Y., Iwata, Y.T., Inoue, H., Inouye, Y. and Kishi, T. (2003) Excretory profile of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in rat. J Health Sci 49, 166-169.

Kanamori, T., Tsujikawa, K., Ohmae, Y., Iwata, Y.T., Inoue, H., Kishi, T., Nakahama, T. and Inouye, Y. (2005) A study of the metabolism of methamphetamine and 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in isolated rat hepatocytes. Forensic Sci Int 148, 131-137.

Kapadia, G.J. and Fayez, M.B. (1970) Peyote constituents: chemistry, biogenesis, and biological effects. J Pharm Sci 59, 1699-1727.

Katagi, M. and Tsuchihashi, H. (2002) Update on clandestine amphetamines and their analogues recently seen in Japan. J Health Sci 48, 14-21.

Kavanagh, P.V., Corrigan, D., Maguire, R.T., Meegan, M.J., Keating, J.J., Clancy, J. and Burdett, J. (1999) Excretion Profile of 4-Methylthioamphetamine in Dogs. Pharm Pharmacol Commun 5, 653-655.

Kelly, D.W., Holder, C.L., Korfmacher, W.A., Getek, T.A., Lay, J.O.J., Casciano, D.A., Shaddock, J.G., Duhart, H.M. and Slikker, W.J. (1992) Metabolism of methapyrilene by Fischer-344 rat and B6C3F1 mouse hepatocytes. Xenobiotica 22, 1367-1381.

Kendrick, W.C., Hull, A.R. and Knochel, J.P. (1977) Rhabdomyolysis and shock after intravenous amphetamine administration. Ann Intern Medicine 86, 381-387.

Kessel, B. (1994) Hyponatraemia after ingestion of ecstasy. BMJ 308, 414.

Khakoo, S.I., Coles, C.J., Armstrong, J.S. and Barry, R.E. (1995) Hepatotoxicity and accelerated fibrosis following 3,4-methylenedioxymetamphetamine ("ecstasy") usage. J Clin Gastroenterol 20, 244-247.

Khorana, N., Pullagurla, M.R., Dukat, M., Young, R. and Glennon, R.A. (2004) Stimulus effects of three sulfur-containing psychoactive agents. Pharmacol Biochem Behav 78, 821-826.

Kirkbride, K.P., Ward, A.D., Jenkins, N.F., Klass, G. and Coumbaros, J.C. (2001) Synthesis of 4-methyl-5-arylpyrimidines and 4-arylpyrimidines: route specific markers for the Leuckardt preparation of amphetamine, 4-methoxyamphetamine, and 4-methylthioamphetamine. Forensic Sci Int 115, 53-67.

Kish, S.J. (2002) How strong is the evidence that brain serotonin neurons are damaged in human users of ecstasy? Pharmacol Biochem Behav 71, 845-855.

Koebe, H.G., Muhling, B., Deglmann, C.J. and Schildberg, F.W. (1999) Cryopreserved porcine hepatocyte cultures. Chem Biol Interact 121, 99-115.

Kraemer, T. and Maurer, H.H. (1998) Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 713, 163-187.

Kraemer, T. and Maurer, H.H. (2002) Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivatives. Ther Drug Monit 24, 277-289.

Kramer, H.K., Poblete, J.C. and Azmitia, E.C. (1998) Characterization of the translocation of protein kinase C (PKC) by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA/ecstasy) in synaptosomes: evidence for a presynaptic localization involving the serotonin transporter (SERT). Neuropsychopharmacology 19, 265-277.

Kraner, J.C., McCoy, D.J., Evans, M.A., Evans, L.E. and Sweeney, B.J. (2001) Fatalities caused by the MDMA-related drug paramethoxyamphetamine (PMA). J Anal Toxicol 25, 645-648.

Krebsfaenger, N., Murdter, T.E., Zanger, U.M., Eichelbaum, M.F. and Doehmer, J. (2003) V79 Chinese hamster cells genetically engineered for polymorphic cytochrome P450 2D6 and their predictive value for humans. ALTEX 20, 143-154.

Kreth, K., Kovar, K., Schwab, M. and Zanger, U.M. (2000) Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy"-related designer drugs. Biochem Pharmacol 59, 1563-1571.

Kroemer, H.K. and Eichelbaum, M. (1995) "It's the genes, stupid". Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. Life Sci 56, 2285-2298.

Kumagai, Y., Lin, L.Y., Schmitz, D.A. and Cho, A.K. (1991) Hydroxyl radical mediated demethylenation of (methylenedioxy)phenyl compounds. Chem Res Toxicol 4, 330-334.

Kunugi, H., Nanko, S., Ueki, A., Otsuka, E., Hattori, M., Hoda, F., Vallada, H.P., Arranz, M.J. and Collier, D.A. (1997) High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease. Neurosci Lett 221, 202-204.

Lachman, H.M., Papolos, D.F., Saito, T., Yu, Y.M., Szumlanski, C.L. and Weinshilboum, R.M. (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. Pharmacogenetics 6, 243-250.

Lampe, J.W., King, I.B., Li, S., Grate, M.T., Barale, K.V., Chen, C., Feng, Z. and Potter, J.D. (2000) Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. Carcinogenesis 21, 1157-1162.

Lander, E.S., *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860-921.

Lang, T., Klein, K., Fischer, J., Nussler, A.K., Neuhaus, P., Hofmann, U., Eichelbaum, M., Schwab, M. and Zanger, U.M. (2001) Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. Pharmacogenetics 11, 399-415.

Langenbach, R., Freed, H.J. and Huberman, E. (1978) Liver cell-mediated mutagenesis of mammalian cells by liver carcinogens. Proc Natl Acad Sci U S A 75, 2864-2867.

Lefkowitz, R.J., Hoffman, B.B. and Taylor, P. (1996) Neurotransmission. The autonomic and somatic motor nervous systems. In: J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon and A.G. Gilman (Eds), Goodman & Gillman's The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, New York, pp. 105-139.

Lehmann, E.D., Thom, C.H. and Croft, D.N. (1995) Delayed severe rhabdomyolysis after taking 'ecstasy'. Postgrad Med J 71, 186-187.

Leonardi, E.T. and Azmitia, E.C. (1994) MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). Neuropsychopharmacology 10, 231-238.

Lesch, K.P. and Gutknecht, L. (2005) Pharmacogenetics of the serotonin transporter. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29, 1062-1073.

Lester, S.J., Baggott, M., Welm, S., Schiller, N.B., Jones, R.T., Foster, E. and Mendelson, J. (2000) Cardiovascular effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. A double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 133, 969-973.

Li, A.P. (1999) Overview: hepatocytes and cryopreservation--a personal historical perspective. Chem Biol Interact 121, 1-5.

Li, A.P., Gorycki, P.D., Hengstler, J.G., Kedderis, G.L., Koebe, H.G., Rahmani, R., de Sousas, G., Silva, J.M. and Skett, P. (1999a) Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. Chem Biol Interact 121, 117-123.

Li, A.P., Lu, C., Brent, J.A., Pham, C., Fackett, A., Ruegg, C.E. and Silber, P.M. (1999b) Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. Chem Biol Interact 121, 17-35.

Li, A.P., Maurel, P., Gomez-Lechon, M.J., Cheng, L.C. and Jurima-Romet, M. (1997) Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. Chem Biol Interact 107, 5-16.

Li, Q., Murakami, I., Stall, S., Levy, A.D., Brownfield, M.S., Nichols, D.E. and Van de Kar, L.D. (1996) Neuroendocrine pharmacology of three serotonin releasers: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butane (MBDB), 5-methoxy-6-methyl-2-aminoindan (MMAI) and p-methylthioamphetamine (MTA). J Pharmacol Exp Ther 279, 1261-1267.

Li, T., Chen, C.K., Hu, X., Ball, D., Lin, S.K., Chen, W., Sham, P.C., Loh, E.-W., Murray, R.M. and Collier, D.A. (2004) Association analysis of the DRD4 and COMT genes in methamphetamine abuse. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 129, 120-124.

Licinio, J. and Wong, M.-L. (2002) Pharmacogenomics. The search for individualized therapies., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Liechti, M.E., Gamma, A. and Vollenweider, F.X. (2001) Gender differences in the subjective effects of MDMA. Psychopharmacology 154, 161-168.

Liechti, M.E., Saur, M.R., Gamma, A., Hell, D. and Vollenweider, F.X. (2000) Psychological and physiological effects of MDMA ("Ecstasy") after pretreatment with the 5-HT(2) antagonist ketanserin in healthy humans. Neuropsychopharmacology 23, 396-404.

Liechti, M.E. and Vollenweider, F.X. (2000a) Acute psychological and physiological effects of MDMA ("Ecstasy") after haloperidol pretreatment in healthy humans. Eur Neuropsychopharmacol 10, 289-295.

Liechti, M.E. and Vollenweider, F.X. (2000b) The serotonin uptake inhibitor citalopram reduces acute cardiovascular and vegetative effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') in healthy volunteers. J Psychopharmacol 14, 269-274.

Lim, H.K. and Foltz, R.L. (1988) 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. and Foltz, R.L. (1989) Identification of metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in human urine. Chem Res Toxicol 2, 142-143.

Lim, H.K. and Foltz, R.L. (1991) In vivo formation of aromatic hydroxylated metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification by ion trap tandem mass spectrometric (MS/MS and MS/MS/MS) techniques. Biol Mass Spectrom 20, 677-686.

Lim, H.K., Su, Z. and Foltz, R.L. (1993) Stereoselective disposition: enantioselective quantitation of 3,4-(methylenedioxy) methamphetamine and three of its metabolites by gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. Biol Mass Spectrom 22, 403-411.

Lim, H.K., Zeng, S., Chei, D.M. and 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. J Pharm Biomed Anal 10, 657-665.

Lin, L.Y., Di Stefano, E.W., Schmitz, D.A., Hsu, L., Ellis, S.W., Lennard, M.S., Tucker, G.T. and Cho, A.K. (1997) Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. Drug Metab Dispos 25, 1059-1064.

Lin, L.Y., Kumagai, Y. and Cho, A.K. (1992) Enzymatic and chemical demethylenation of (methylenedioxy)amphetamine and (methylenedioxy)methamphetamine by rat brain microsomes. Chem Res Toxicol 5, 401-406.

Lobos, M., Borges, Y., Gonzalez, E. and Cassels, B. (1992) The action of the psychoactive drug 2C-B on isolated rat thoracic aorta. Gen Pharmacol 23, 1139-1142.

Logan, A.S., Stickle, B., O'Keefe, N. and Hewitson, H. (1993) Survival following 'Ecstasy' ingestion with a peak temperature of 42 degrees. Anaesthesia 48, 1017-1018.

Logan, B.J., Laverty, R., Sanderson, W.D. and Yee, Y.B. (1988) Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) neurotoxicity. Eur J Pharmacol 152, 227-234.

Losser, M.R. and Payen, D. (1996) Mechanisms of liver damage. Semin Liver Dis 16, 357-637.

Lott, D.C., Kim, S.J., Cook, E.H.J. and de Wit, H. (2005) Dopamine transporter gene associated with diminished subjective response to amphetamine. Neuropsychopharmacology 30, 602-609.

Lott, D.C., Kim, S.J., Cook, E.H.J. and de Wit, H. (2006) Serotonin transporter genotype and acute subjective response to amphetamine. Am J Addict 15, 327-335.

Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melen, K., Julkunen, I. and Taskinen, J. (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. Biochemistry 34, 4202-4210.

Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature 404, 652-660.

Lu, C., Miwa, G.T., Prakash, S.R., Gan, L.S. and Balani, S.K. (2006) A novel model for the prediction of drug-drug interactions in humans based on in vitro cyp phenotypic data. Drug Metab Dispos doi:10.1124/dmd.106.011346.

Lundstrom, K., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P. and Ulmanen, I. (1995) Cloning, expression and structure of catechol-O-methyltransferase. Biochim Biophys Acta 1251, 1-10.

Luo, D. and Vincent, S.R. (1994) NMDA-dependent nitric oxide release in the hippocampus in vivo: interactions with noradrenaline. Neuropharmacology 33, 1345-1350.

Madan, A., De Haan, R., Mudra, D., Carroll, K., Le Cluyse, E. and Parkinson, A. (1999) Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. Drug Metab Dispos 27, 327-335.

Malberg, J.E., Sabol, K.E. and 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. and 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. and Bochner, F. (1999) Acute Toxicity of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and dark Agouti Rats. Pharmacol Biochem Behav 64, 29-34.

Marona-Lewicka, D. and Nichols, D.E. (1997) The Effect of Selective Serotonin Releasing Agents in the Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats. Stress 2, 91-100.

Marquet, P., Lacassie, E., Battu, C., Faubert, H. and Lachatre, G. (1997) Simultaneous determination of amphetamine and its analogs in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 700, 77-82.

Marston, H.M., Reid, M.E., Lawrence, J.A., Olverman, H.J. and Butcher, S.P. (1999) Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. Psychopharmacology 144, 67-76.

Mas, M., Farre, M., de la Torre, R., Roset, P.N., Ortuno, J., Segura, J. and Cami, J. (1999) Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine in humans. J Pharmacol Exp Ther 290, 136-145.

Masellis, M., Paterson, A.D., Badri, F., Lieberman, J.A., Meltzer, H.Y., Cavazzoni, P. and Kennedy, J.L. (1995) Genetic variation of 5-HT2A receptor and response to clozapine. Lancet 346, 1108.

Masimirembwa, C., Persson, I., Bertilsson, L., Hasler, J. and Ingelman-Sundberg, M. (1996) A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. Br J Clin Pharmacol 42, 713-719.

Mattay, V.S., Goldberg, T.E., Fera, F., Hariri, A.R., Tessitore, A., Egan, M.F., Kolachana, B., Callicott, J.H. and Weinberger, D.R. (2003) Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 6186-6191.

Matthai, S.M., Davidson, D.C., Sills, J.A. and Alexandrou, D. (1996) Cerebral oedema after ingestion of MDMA ("ecstasy") and unrestricted intake of water. BMJ 312, 1359.

Maurer, H.H. (1996) On the metabolism and the toxicological analysis of methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs by gas chromatography-mass spectrometry. Ther Drug Monit 18, 465-470.

Maurer, H.H., Bickeboeller-Friedrich, J., Kraemer, T. and Peters, F.T. (2000) Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'). Toxicol Lett 112-113.

Maxwell, D.L., Polkey, M.I. and Henry, J.A. (1993) Hyponatraemia and catatonic stupor after taking "ecstasy". BMJ 307, 1399.

McCann, U.D., Eligulashvili, V., Mertl, M., Murphy, D.L. and Ricaurte, G.A. (1999a) Altered neuroendocrine and behavioral responses to m-chlorophenylpiperazine in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users. Psychopharmacology 147, 56-65.

McCann, U.D., Eligulashvili, V. and Ricaurte, G.A. (2000) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies. Neuropsychobiology 42, 11-16.

McCann, U.D., Mertl, M., Eligulashvili, V. and Ricaurte, G.A. (1999b) Cognitive performance in (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") users: a controlled study. Psychopharmacology 143, 417-425.

McCann, U.D. and Ricaurte, G.A. (1991) Major metabolites of (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) do not mediate its toxic effects on brain serotonin neurons. Brain Res 545, 279-282.

McCann, U.D., Ridenour, A., Shaham, Y. and Ricaurte, G.A. (1994) Serotonin neurotoxicity after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "Ecstasy"): a controlled study in humans. Neuropsychopharmacology 10, 129-138.

McCann, U.D., Slate, S.O. and Ricaurte, G.A. (1996) Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'ecstasy'). Drug Safety 115, 107-115.

McCann, U.D., Szabo, Z., Scheffel, U., Dannals, R.F. and Ricaurte, G.A. (1998) Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. Lancet 352, 1433-1437.

McCann, U.D., Szabo, Z., Seckin, E., Rosenblatt, P., Mathews, W.B., Ravert, H.T., Dannals, R.F. and Ricaurte, G.A. (2005) Quantitative PET studies of the serotonin transporter in MDMA users and controls using [11C]McN5652 and [11C]DASB. Neuropsychopharmacology 30, 1741-1750.

McDaid, J. and Docherty, J.R. (2001) Vascular actions of MDMA involve alpha1 and alpha2-adrenoceptors in the anaesthetized rat. Br J Pharmacol 133.

McElhatton, P.R., Bateman, D.N., Evans, C., Pughe, K.R. and Thomas, S.H. (1999) Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure. Lancet 354, 1441-1442.

McKenna, D.J. and Peroutka, S.J. (1990) Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). J Neurochem 54, 14-22.

McKinnon, R.A., Burgess, W.M., Hall, P.M., Roberts-Thomson, S.J., Gonzalez, F.J. and McManus, M.E. (1995) Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. Gut 36, 259-267.

McLellan, R.A., Oscarson, M., Alexandrie, A.K., Seidegard, J., Evans, D.A., Rannug, A. and Ingelman-Sundberg, M. (1997) Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. Mol Pharmacol 52, 958-965.

McLeod, H.L., Fang, L., Luo, X., Scott, E.P. and Evans, W.E. (1994) Ethnic differences in erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in black and white Americans. J Pharmacol Exp Ther 270, 26-29.

McLeod, H.L., Syvanen, A.C., Githang'a, J., Indalo, A., Ismail, D., Dewar, K., Ulmanen, I. and Sludden, J. (1998) Ethnic differences in catechol O-methyltransferase pharmacogenetics: frequency of the codon

108/158 low activity allele is lower in Kenyan than Caucasian or South-west Asian individuals. Pharmacogenetics 8, 195-199.

Mechan, A.O., Esteban, B., O'Shea, E., Elliott, J.M., Colado, M.I. and Green, A.R. (2002) The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. Br J Pharmacol 135, 170-180.

Meisel, C., Gerloff, T., Kirchheiner, J., Mrozikiewicz, P.M., Niewinski, P., Brockmoller, J. and Roots, I. (2003) Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design. J Mol Med 81, 154-167.

Mergen, G., Silva, R., Ferreira, L.M., Branco, P.S., Remião, F., Carvalho, F., Bastos, M.L., Söylemezoğlu, T. and Carmo, H. (2006) Validation of a HPLC-ECD method for the quantification of the highly reactive metabolite of ecstasy, N-methyl-α-methyldopamine, in human serum. Toxicol Lett 164, S309.

Meyer, A., Mayerhofer, A., Kovar, K.A. and Schmidt, W.J. (2002) Enantioselective metabolism of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ('eve') isomers in rat brain and blood. Neurosci Lett 330, 193-197.

Meyer, U.A. (2002) Introduction to pharmacogenomics: promises, opportunities, and limitations. In: J. Licinio and M.-L. Wong (Eds), Pharmacogenomics. The search for individualized therapies, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 1-8.

Miller, E.K., Raese, J.D. and Morrison-Bogorad, M. (1991) Expression of heat shock protein 70 and heat shock cognate 70 messenger RNAs in rat cortex and cerebellum after heat shock or amphetamine treatment. J Neurochem 56, 2060-2071.

Miller, R.T., Lau, S.S. and Monks, T.J. (1995) Metabolism of 5-(glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine following intracerebroventricular administration to male Sprague-Dawley rats. Chem Res Toxicol 8, 634-641.

Miller, R.T., Lau, S.S. and Monks, T.J. (1997) 2,5-Bis-(glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine, a putative metabolite of (+/-)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. Eur J Pharmacol 323, 173-180.

Mills, E.M., Banks, M.L., Sprague, J.E. and Finkel, T. (2003) Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. Nature 426, 403-404.

Mills, E.M., Rusyniak, D.E. and Sprague, J.E. (2004) The role of the sympathetic nervous system and uncoupling proteins in the thermogenesis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. J Mol Med 82, 787-799.

Milroy, C.M., Clark, J.C. and Forrest, A.R. (1996) Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. J Clin Pathol 49, 149-153.

Miners, J.O., McKinnon, R.A. and Mackenzie, P.I. (2002) Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. Toxicology 181-182, 453-456.

Mohan, P. and Bloom, S. (1999) Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. Cardiovasc Pathol 8, 255-261.

Molliver, M.E., Berger, U.V., Mamounas, L.A., Molliver, D.C., O'Hearn, E. and Wilson, M.A. (1990) Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. Ann N Y Acad Sci 600, 649-661.

Monaghan, G., Ryan, M., Seddon, R., Hume, R. and Burchell, B. (1996) Genetic variation in bilirubin UPD-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. Lancet 347, 578-581.

Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43, 109-142.

Monks, T.J., Jones, D.C., Bai, F. and Lau, S.S. (2004) The role of metabolism in 3,4-(+)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(+)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) toxicity. Ther Drug Monit 26, 132-136.

Monks, T.J. and Lau, S.S. (1997) Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. Chem Res Toxicol 10, 1296-1313.

Monks, T.J. and Lau, S.S. (1998) The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38, 229-255.

Monte, A.P., Marona-Lewicka, D., Parker, M.A., Wainscott, D.B., Nelson, D.L. and Nichols, D.E. (1996) Dihydrobenzofuran analogues of hallucinogens. 3. Models of 4-substituted (2,5-dimethoxyphenyl)alkylamine derivatives with rigidified methoxy groups. J Med Chem 39, 2953-2961.

Montiel-Duarte, C., Ansorena, E., Lopez-Zabalza, M.J., Cenarruzabeitia, E. and Iraburu, M.J. (2004) Role of reactive oxygen species, glutathione and NF-kappaB in apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") on hepatic stellate cells. Biochem Pharmacol 67, 1025-1033.

Montiel-Duarte, C., Varela-Rey, M., Oses-Prieto, J.A., Lopez-Zabalza, M.J., Beitia, G., Cenarruzabeitia, E. and Iraburu, M.J. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. Biochim Biophys Acta 1588, 26-32.

Moore, K.A., Mozayani, A., Fierro, M.F. and 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.

Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Willson, T.M., Collins, J.L. and Kliewer, S.A. (2000) St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 7500-7502.

Morgan, E.T. (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. Drug Metab Rev 29, 1129-1188.

Morgan, M.J. (1999) Memory deficits associated with recreational use of "ecstasy" (MDMA). Psychopharmacology 141, 30-36.

Morgan, M.J. (2000) Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. Psychopharmacology 152, 230-248.

Murphy, J., Flynn, J.J., Cannon, D.M., Guiry, P.J., McCormack, P., Baird, A.W., McBean, G.J. and Keenan, A.K. (2002) In vitro neuronal and vascular responses to 5-hydroxytryptamine: modulation by 4-methylthioamphetamine, 4-methylthiomethamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. Eur J Pharmacol 444, 61-67.

Murray, M. (2000) Mechanisms of inhibitory and regulatory effects of methylenedioxyphenyl compounds on cytochrome P450-dependent drug oxidation. Curr Drug Metab 1, 67-84.

Musshoff, F. (2000) Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. Drug Metab Rev 32, 15-44.

Nagata, K. and Yamazoe, Y. (2000) Pharmacogenetics of sulfotransferase. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40, 159-176.

Nakagawa, Y. and Moldeus, P. (1992) Cytotoxic effects of phenyl-hydroquinone and some hydroquinones on isolated rat hepatocytes. Biochem Pharmacol 44, 1059-1065.

Nakajima, M., Yokoi, T., Mizutani, M., Kinoshita, M., Funayama, M. and Kamataki, T. (1999) Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. J Biochem 125, 803-808.

Namera, A., Yashiki, M., Kojima, T. and Ueki, M. (2002) Automated headspace solid-phase microextraction and in-matrix derivatization for the determination of amphetamine-related drugs in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr Sci 40, 19-25.

Nash, J.F. (1990) Ketanserin pretreatment attenuates MDMA-induced dopamine release in the striatum as measured by in vivo microdialysis. Life Sci 47, 2401-2408.

Nash, J.F. and Brodkin, 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. and 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. and Yamamoto, B.K. (1992) Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. Brain Res 581, 237-243.

Nash, J.F.J., Meltzer, H.Y. and Gudelsky, G.A. (1988) Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. J Pharmacol Exp Ther 245, 873-879.

Navarro, M., Pichini, S., Farre, M., Ortuno, J., Roset, P.N., Segura, J. and de la Torre, R. (2001) Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH. Clin Chem 47, 1788-1795.

Nichols, D.E. (1981) Structure-activity relationships of phenethylamine hallucinogens. J Pharm Sci 70, 839-849.

Nichols, D.E., Hoffman, A.J., Oberlender, R.A., Jacob, P.r. and Shulgin, A.T. (1986) Derivatives of 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine: representatives of a novel therapeutic class. J Med Chem 29, 2009-2015

Nichols, D.E., Lloyd, D.H., Hoffman, A.J., Nichols, M.B. and Yim, G.K. (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. and Oberlender, R. (1989) Structure-activity relationships of MDMA-like substances. NIDA Res Monogr 94, 1-29.

Nishiyama, T., Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Inada, T., Furukawa, T. and Ozaki, N. (2005) Haplotype association between GABAA receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder. Pharmacogenomics J 5, 89-95.

Nomura, A., Ujike, H., Tanaka, Y., Otani, K., Morita, Y., Kishimoto, M., Morio, A., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Kuroda, S. (2006) Genetic variant of prodynorphin gene is risk factor for methamphetamine dependence. Neurosci Lett 400, 158-162.

Nonogaki, K. (2000) New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. Diabetologia 43, 533-549.

O'Donohoe, A., O'Flynn, K., Shields, K., Hawi, Z. and Gill, M. (1998) MDMA toxicity: no evidence for a major influence of metabolic genotype at CYP2D6. Addict Biol 3, 309-314.

OEDT. Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (2001) Relatório Anual sobre a Evolução do Fenómeno da Droga na União Europeia — 2001, Luxemburgo, pp. 23-24.

OEDT. Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (2003) Relatório Anual 2003: A Evolução do Fenómeno de Droga na União Europeia e na Noruega, Luxemburgo, pp. 9-10.

OEDT Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (2005) Relatório Anual 2005: A Evolução do Fenómeno da Droga na Europa, Luxemburgo, pp. 45-54.

O'Hearn, E., Battaglia, G., De Souza, E.B., Kuhar, M.J. and 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.

O'Shea, E., Granados, R., Esteban, B., Colado, M.I. and 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.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) OECD Guideline for the testing of chemicals (476). In vitro mammalian cell gene mutation tests. OECD/OCDE, pp. 1-10.

Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. and Nicotera, P. (1989) Role of Ca2+ in toxic cell killing. Trends Pharmacol Sci 10, 281-285.

Oscarson, M., Hidestrand, M., Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1997) A combination of mutations in the CYP2D6*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. Mol Pharmacol 52, 1034-1040.

Ozdemir, V., Kalowa, W., Tang, B.K., Paterson, A.D., Walker, S.E., Endrenyi, L. and Kashuba, A.D. (2000) Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. Pharmacogenetics 10, 373-388.

Pacifici, R., Pichini, S., Zuccaro, P., Farre, M., Segura, M., Ortuno, J., Di Carlo, S., Bacosi, A., Roset, P.N., Segura, J. and de la Torre, R. (2004) Paroxetine inhibits acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on the immune system in humans. Pharmacol Exp Ther 309, 285-292.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farre, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Hernandez-Lopez, C., Ortuno, J., Segura, J., Cami, J. and de la Torre, R. (2000) Immunomodulating activity of MDMA. Ann N Y Acad Sci 914, 215-224.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farre, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Ortuno, J., Pujadas, M., Bacosi, A., Menoyo, E., Segura, J. and de la Torre, R. (2001a) Effects of repeated doses of MDMA ("ecstasy") on cell-mediated immune response in humans. Life Sci 69, 2931-2941.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farre, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Ortuno, J., Segura, J. and de la Torre, R. (1999) Immunomodulating properties of MDMA alone and in combination with alcohol: a pilot study. Life Sci 65, PL309-316.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Farre, M., Pichini, S., Di Carlo, S., Roset, P.N., Palmi, I., Ortuno, J., Menoyo, E., Segura, J. and de la Torre, R. (2002) Cell-mediated immune response in MDMA users after repeated dose administration: studies in controlled versus noncontrolled settings. Ann N Y Acad Sci 965, 421-433.

Pacifici, R., Zuccaro, P., Hernandez-Lopez, C., Pichini, S., Di Carlo, S., Farre, M., Roset, P.N., Ortuno, J., Segura, J. and de la Torre, R. (2001b) Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine alone and in combination with ethanol on the immune system in humans. J Pharmacol Exp Ther 296, 207-215.

Parkinson, A. (2001) Biotransformation of xenobiotics. In: C.D. Klaassen (Ed), Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, New York, pp. 133-224.

Parrott, A.C. (2002) Recreational Ecstasy/MDMA, the serotonin syndrome, and serotonergic neurotoxicity. Pharmacol Biochem Behav 71, 837-844.

Parrott, A.C. (2004) Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. Psychopharmacology 173, 234-241.

Parrott, A.C., Lees, A., Garnham, N.J., Jones, M. and Wesnes, K. (1998) Cognitive performance in recreational users of MDMA of 'ecstasy': evidence for memory deficits. J Psychopharmacol 12, 79-83.

Passarge, E. (2001) Colour Atlas of Genetics, Thieme, Stuttgart.

Patel, N., Kumagai, Y., Unger, S.E., Fukuto, J.M. and Cho, A.K. (1991) Transformation of dopamine and alpha-methyldopamine by NG108-15 cells: formation of thiol adducts. Chem Res Toxicol 4, 421-426.

Paterson, D.J. (1996) Antiarrhythmic mechanisms during exercise. J Appl Physiol 80, 1853-1862.

Pedersen, N.P. and Blessing, W.W. (2001) Cutaneous vasoconstriction contributes to hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in conscious rabbits. J Neurosci 21, 8648-8654.

Pelah, Z., Wilson, J.M., Ohashi, M., Budzikiewicz, H. and Djerassi, C. (1963) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems - XXXIV. Aromatic methyl and ethyl ethers. Tetrahedron 19, 2233-2240.

Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B. and Taylor, J.B. (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. Biochem J 300, 271-276.

Peroutka, S.J., Newman, H. and Harris, H. (1988) Subjective effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in recreational users. Neuropsychopharmacology 1, 273-277.

Persico, A.M., Bird, G., Gabbay, F.H. and Uhl, G.R. (1996) D2 dopamine receptor gene TaqI A1 and B1 restriction fragment length polymorphisms: enhanced frequencies in psychostimulant-preferring polysubstance abusers. Biol Psychiatry 40, 776-784.

Peters, F.T., Schaefer, S., Staack, R.F., Kraemer, T. and Maurer, H.H. (2003) Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. J Mass Spectrom 38, 659-676.

Philip, P.A., Ali-Sadat, S., Doehmer, J., Kocarek, T., Akhtar, A., Lu, H. and Chan, K.K. (1999) Use of V79 cells with stably transfected cytochrome P450 cDNAs in studying the metabolism and effects of cytotoxic drugs. Cancer Chemother Pharmacol 43, 59-67.

Pilon, N. (1997) Non-chiral aspects of ecstasy. Identification and (semi-)quantification of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine and its major metabolites (report). Netherlands Institute for Drugs and Doping Research. Faculty of Pharmacy, Universiteit Utrecht, Utrecht.

Pizarro, N., Farre, M., Pujadas, M., Peiro, A.M., Roset, P.N., Joglar, J. and de la Torre, R. (2004) Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihydroxymethamphetamine). Drug Metab Dispos 32, 1001-1007.

Plessinger, M.A. (1998) Prenatal exposure to amphetamines. Risks and adverse outcomes in pregnancy. Obstet Gynecol Clin North Am 25, 119-138.

Poblete, J.C. and Azmitia, E.C. (1995) Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT2A receptor. Brain Res 680, 9-15.

Poortman, A.J. (1998) The Identification of 4-Methylthioamphetamine. Microgram XXXI, 174-180.

Poortman, A.J. and Lock, E. (1999) Analytical profile of 4-methylthioamphetamine (4-MTA), a new street drug. Forensic Sci Int 100, 221-233.

Price, L.H., Ricaurte, G.A., Krystal, J.H. and Heninger, G.R. (1989) Neuroendocrine and mood responses to intravenous L-tryptophan in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users. Preliminary observations. Arch Gen Psychiatry 46, 20-22.

Quinn, S.T., Guiry, P.J., Schwab, T., Keenan, A.K. and McBean, G.J. (2006) Blockade of noradrenaline transport abolishes 4-methylthioamphetamine-induced contraction of the rat aorta in vitro. Auton Autacoid Pharmacol 26, 335-344.

Ragan, J.F.A., Hite, S.A., Samuels, M.S. and Garey, R.E. (1985) 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine: Identification of a New Street Drug. J Anal Toxicol 9, 91-93.

Raimundo, S., Fischer, J., Eichelbaum, M., Griese, E.U., Schwab, M. and Zanger, U.M. (2000) Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. Pharmacogenetics 10, 577-581.

Ramamoorthy, J.D., Ramamoorthy, S., Leibach, F.H. and 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. and Ganapathy, V. (1992) Active transport of dopamine in human placental brush-border membrane vesicles. Am J Physiol 262, C1189-1196.

Ramamoorthy, Y., Tyndale, R.F. and Sellers, E.M. (2001) Cytochrome P450 2D6.1 and cytochrome P450 2D6.10 differ in catalytic activity for multiple substrates. Pharmacogenetics 11, 477-487.

Ramamoorthy, Y., Yu, A., Suh, N., Haining, R.L., Tyndale, R.F. and Sellers, E.M. (2002) Reduced (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") metabolism with cytochrome P450 2D6 inhibitors and pharmacogenetic variants in vitro. Biochem Pharmacol 63, 2111-2119.

Ramcharan, S., Meenhorst, P.L., Otten, J.M., Koks, C.H., de Boer, D., Maes, R.A. and Beijnen, J.H. (1998) Survival after massive ecstasy overdose. J Toxicol Clin Toxicol 36, 727-731.

Ramsey, J.D., Butcher, M.A., Murphy, M.F., Lee, T., Johnston, A. and Holt, D.W. (2001) A new method to monitor drugs at dance venues. BMJ 323, 603.

Randall, T. (1992) Ecstasy-fueled 'rave' parties become dances of death for English youths. JAMA 268, 1505-1506.

Rao, Y., Hoffmann, E., Zia, M., Bodin, L., Zeman, M., Sellers, E.M. and Tyndale, R.F. (2000) Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping, and in vivo effects on smoking. Mol Pharmacol 58, 747-755.

Ratain, M.J., Mick, R., Janisch, L., Berezin, F., Schilsky, R.L., Vogelzang, N.J. and Kut, M. (1996) Individualized dosing of amonafide based on a pharmacodynamic model incorporating acetylator phenotype and gender. Pharmacogenetics 6, 93-101.

Reed, L.J., Winstock, A., Cleare, A.J. and McGuire, P. (1999) Toxic effect of MDMA on brain serotonin neurons. Lancet 353, 1268.

Reinach, B., de Sousa, G., Dostert, P., Ings, R., Gugenheim, J. and Rahmani, R. (1999) Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes. Chem Biol Interact 121, 37-48.

Relling, M.V., Lin, J.S., Ayers, G.D. and Evans, W.E. (1992) Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. Clin Pharmacol Ther 52, 643-658.

Remião, F. (2002) Cardiotoxicidade do isoproterenol e dos produtos da sua oxidação. Estudos mecanísticos em suspensões de cardiomiócitos isolatos de rato adulto (tese de doutoramento). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto.

Remiao, F., Carmo, H., Carvalho, F.D. and Bastos, M.L. (1999) Inhibition of Glutathione Reductase by Isoproterenol Oxidation Products. J Enzyme Inhib 15, 47-61.

Remiao, F., Carvalho, M., Carmo, H., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2002) Cu2+-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. Chem Res Toxicol 15, 861-869.

Rendic, S. and Carlo, F.J.D. (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drug Metab Rev 29, 413-580.

Reneman, L., Booij, J., de Bruin, K., Reitsma, J.B., deWolff, F.A., Gunning, W.B., den Heeten, G.J. and van den Brink, W. (2001) Effects of dose, sex, and long-term abstention from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons. Lancet 358, 1864-1849.

Reneman, L., Booij, J., Lavalaye, J., de Bruin, K., Reitsma, J.B., Gunning, B., den Heeten, G.J. and van den Brink, W. (2002) Use of amphetamine by recreational users of ecstasy (MDMA) is associated with reduced striatal dopamine transporter densities: a [123I]beta-CIT SPECT study--preliminary report. Psychopharmacology 159, 335-340.

Ricaurte, G.A., De Lanney, L.E., Irwin, I. and Langston, J.W. (1988) Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration. Brain Res 446, 165-168.

Ricaurte, G.A., Finnegan, K.T., Irwin, I. and Langston, J.W. (1990) Aminergic metabolites in cerebrospinal fluid of humans previously exposed to MDMA: preliminary observations. Ann N Y Acad Sci 600.

Ricaurte, G.A. and McCann, U.D. (1992) Neurotoxic amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. Ann N Y Acad Sci 648, 371-382.

Ricaurte, G.A., McCann, U.D., Szabo, Z. and Scheffel, U. (2000a) Toxicodynamics and long-term toxicity of the recreational drug, 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'). Toxicol Lett 112-113, 143-146.

Ricaurte, G.A., Yuan, J. and McCann, U.D. (2000b) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. Neuropsychobiology 42, 5-10.

Roberts, L. and Wright, H. (1993) Survival following intentional massive overdose of 'Ecstasy'. J Accid Emerg Med 11, 53-54.

Robinson, T.E., Castaneda, E. and Whishaw, I.Q. (1993) Effects of cortical serotonin depletion induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on behavior, before and after additional cholinergic blockade. Neuropsychopharmacology 8, 77-85.

Rohrig, T.P. and Prouty, R.W. (1992) Tissue distribution of methylenedioxymethamphetamine. J Anal Toxicol 16, 52-53.

Roiser, J.P., Cook, L.J., Cooper, J.D., Rubinsztein, D.C. and Sahakian, B.J. (2005) Association of a functional polymorphism in the serotonin transporter gene with abnormal emotional processing in ecstasy users. Am J Psychiatry 162, 609-612.

Roiser, J.P., Rogers, R.D., Cook, L.J. and Sahakian, B.J. (2006) The effect of polymorphism at the serotonin transporter gene on decision-making, memory and executive function in ecstasy users and controls. Psychopharmacology 188, 213-227.

Rothman, R.B. and Baumann, M.H. (2003) Monoamine transporters and psychostimulant drugs. Eur J Pharmacol 479, 23-40.

Rudnick, G. and Wall, S.C. (1992) The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 1817-1821.

Rudnick, G. and Wall, S.C. (1993) Non-neurotoxic amphetamine derivatives release serotonin through serotonin transporters. Mol Pharmacol 43, 271-276.

Rueff, J., Chiapella, C., Chipman, J.K., Darroudi, F., Silva, I.D., Duverger-van Bogaert, M., Fonti, E., Glatt, H.R., Isern, P., Laires, A., Leonard, A., Llagostera, M., Mossesso, P., Natarajan, A.T., Palitti, F., Rodrigues, A.S., Schinoppi, A., Turchi, G. and Werle-Schneider, G. (1996) Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. Mutat Res 353, 151-176.

Rutty, G.N. and Milroy, C.M. (1997) The pathology of the ring-substituted amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethylamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'). J Pathol 181, 255-256.

Sabol, K.E., Lew, R., Richards, J.B., Vosmer, G.L. and Seiden, L.S. (1996) 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.

Sabol, K.E. and Seiden, L.S. (1998) Reserpine attenuates D-amphetamine and MDMA-induced transmitter release in vivo: a consideration of dose, core temperature and dopamine synthesis. Brain Res 806, 69-78.

Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. and Roots, I. (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. Am J Hum Genet 60, 284-295.

Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. and Roots, I. (1999) Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. Br J Clin Pharmacol 47, 445-449.

Samyn, N., De Boeck, G., Wood, M., Lamers, C.T., De Waard, D., Brookhuis, K.A., Verstraete, A.G. and Riedel, W.J. (2002) Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. Forensic Sci Int 128, 90-97.

Santos-Marques, M.J., Carvalho, F., Sousa, C., Remiao, F., Vitorino, R., Amado, F., Ferreira, R., Duarte, J.A. and Bastos, M.L. (2006) Cytotoxicity and cell signalling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes. Toxicology 224, 210-218.

Satchell, S.C. and Connaughton, M. (1994) Inappropriate antidiuretic hormone secretion and extreme rises in serum creatinine kinase following MDMA ingestion. Br J Hosp Med 51, 495.

Schifano, F. (2004) A bitter pill. Overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities. Psychopharmacology 173, 242-248.

Schifano, F., Di Furia, L., Forza, G., Minicuci, N. and Bricolo, R. (1998) MDMA ('ecstasy') consumption in the context of polydrug abuse: a report on 150 patients. Drug Alcohol Depend 52, 85-90.

Schmidt, C.J., Abbate, G.M., Black, C.K. and Taylor, V.L. (1990a) Selective 5-hydroxytryptamine2 receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. J Pharmacol Exp Ther 255, 478-483.

Schmidt, C.J., Black, C.K., Abbate, G.M. and Taylor, V.L. (1990b) Methylenedioxymethamphetamine-induced hyperthermia and neurotoxicity are independently mediated by 5-HT2 receptors. Brain Res 529, 85-90.

Schmidt, C.J., Black, C.K. and Taylor, V.L. (1990c) Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of methylenedioxymethamphetamine. Eur J Pharmacol 181, 59-70.

Schmidt, C.J., Taylor, V.L., Abbate, G.M. and 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.

Schuldiner, S., Steiner-Mordoch, S., Yelin, R., Wall, S.C. and Rudnick, G. (1993) Amphetamine derivatives interact with both plasma membrane and secretory vesicle biogenic amine transporters. Mol Pharmacol 44, 1227-1231.

Schwab, M., Seyringer, E., Brauer, R.B., Hellinger, A. and Griese, E.U. (1999) Fatal MDMA intoxication. Lancet 353, 593-594.

Scorza, M.C., Carrau, C., Silveira, R., Zapata-Torres, G., Cassels, B.K. and Reyes-Parada, M. (1997) Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives. Biochem Pharmacol 54, 1361-1369.

Scorza, M.C., Silveira, R., Nichols, D.E. and Reyes-Parada, M. (1999) Effects of 5-HT-releasing agents on the extracellular hippocampal 5-HT of rats. Implications for the development of novel antidepressants with a short onset of action. Neuropharmacology 38, 1055-1061.

Screaton, G.R., Singer, M., Cairns, H.S., Thrasher, A., Sarner, M. and Cohen, S.L. (1992) Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after MDMA ("ecstasy") abuse. Lancet 339, 677-678.

Segura, J., Ventura, R. and Jurado, C. (1998) Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 713, 61-90.

Segura, M., Farre, M., Pichini, S., Peiro, A.M., Roset, P.N., Ramirez, A., Ortuno, J., Pacifici, R., Zuccaro, P., Segura, J. and de la Torre, R. (2005) Contribution of cytochrome P450 2D6 to 3,4-methylenedioxymethamphetamine disposition in humans: use of paroxetine as a metabolic inhibitor probe. Clin Pharmacokinet 44, 649-660.

Segura, M., Ortuno, J., Farre, M., McLure, J.A., Pujadas, M., Pizarro, N., Llebaria, A., Joglar, J., Roset, P.N., Segura, J. and de la Torre, R. (2001) 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. Chem Res Toxicol 14, 1203-1208.

Seidegard, J., Vorachek, W.R., Pero, R.W. and Pearson, W.R. (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 7293-7297.

Seiden, L.S. and Sabol, K.E. (1996) Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction. NIDA Res Monogr 163, 251-276.

Seiden, L.S., Sabol, K.E. and Ricaurte, G.A. (1993) Amphetamine: Effects on Catecholamine Systems and Behaviour. Annu Rev Pharmacol Toxicol 32, 639-677.

Seiler, N. and Demisch, L. (1974a) Oxidative metabolism of mescaline in the central nervous system-III. Side chain degradation of mescaline and formation of 3,4,5-trimethoxy-benzoic acid in vivo. Biochem Pharmacol 23, 259-271.

Seiler, N. and Demisch, L. (1974b) Oxidative metabolism of mescaline in the central nervous system. IV. In vivo metabolism of mescaline and 2,3,4-trimethoxy-beta-phenylethylamine. Biochem Pharmacol 23, 273-287.

Semple, D.M., Ebmeier, K.P., Glabus, M.F., O'Carroll, R.E. and Johnstone, E.C. (1999) Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA ('ecstasy') users. Br J Psychiatry 175, 63-69.

Shah, N.S. and Himwich, H.E. (1971) Study with mescaline-8-C14 in mice: effect of amine oxidase inhibitors on metabolism. Neuropharmacology 10, 547-556.

Shankaran, M., Yamamoto, B.K. and Gudelsky, G.A. (1999a) Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. Eur J Pharmacol 385, 103-110.

Shankaran, M., Yamamoto, B.K. and Gudelsky, G.A. (1999b) 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.

Shankaran, M., Yamamoto, B.K. and Gudelsky, G.A. (2001) Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT. Synapse 40, 55-64.

Shannon, M. (2000) Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). Pediatr Emerg Care 16, 377-380.

Shiiyama, S., Soejima-Ohkuma, T., Honda, S., Kumagai, Y., Cho, A.K., Yamada, H., Oguri, K. and 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.

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. and Guengerich, F.P. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J Pharmacol Exp Ther 270, 414-423.

Shulgin, A.T. (1986) The background and chemistry of MDMA. J Psychoactive Drugs 18, 291-304.

Shulgin, A.T. and Carter, M.F. (1975) Centrally active phenethylamines. Psychopharmacol Commun 1, 93-98.

Shulgin, A.T. and Nichols, D.E. (1978) Characterization of three new psychotomimetics. In: R.C. Stillman and R.E. Willette (Eds), The psychopharmacology of hallucinogens, Pergamon, New York.

Sies, H. and Graf, P. (1985) Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. Biochem J 226, 545-549.

Silva, J.M., Day, S.H. and Nicoll-Griffith, D.A. (1999) Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. Chem Biol Interact 121, 49-63.

Silva, R., Costa, V.M., Boldt, S., Carmo, H., Carvalho, F., Carvalho, M., Bastos, M.L. and Remião, F. (2006) Validation of a HPLC-ECD method for the detection of adrenaline-GSH adducts in biological samples. Toxicol Lett 164, S132.

Simantov, R. (2004) Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). Life Sci 74, 803-814.

Simantov, R. and Tauber, M. (1997) The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. FASEB J 11, 141-146.

Skett, P., Roberts, P. and Khan, S. (1999) Maintenance of steroid metabolism and hormone responsiveness in cryopreserved dog, monkey and human hepatocytes. Chem Biol Interact 121, 65-76.

Skibba, J.L., Powers, R.H., Stadnicka, A., Cullinane, D.W., Almagro, U.A. and Kalbfleisch, J.H. (1991) Oxidative stress as a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. Int J Hyperthermia 7, 749-761.

Slikker, W.J., Holson, R.R., Ali, S.F., Kolta, M.G., Paule, M.G., Scallet, A.C., McMillan, D.E., Bailey, J.R., Hong, J.S. and Scalzo, F.M. (1989) Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent and nonhuman primate. Neurotoxicology 10, 529-542.

Smilkstein, M.J., Smolinske, S.C. and Rumack, B.H. (1987) A case of MAO inhibitor/MDMA interaction: agony after ecstasy. J Toxicol Clin Toxicol 25, 149-159.

Soares, M.E., Carvalho, M., Carmo, H., Remiao, F., Carvalho, F. and Bastos, M.L. (2004) Simultaneous determination of amphetamine derivatives in human urine after SPE extraction and HPLC-UV analysis. Biomed Chromatogr 18, 125-131.

Sotaniemi, E.A., Arranto, A.J., Pelkonen, O. and Pasanen, M. (1997) Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. Clin Pharmacol Ther 61, 331-339.

Sporer, K.A. (1995) The serotonin syndrome. Implicated drugs, pathophysiology and management. Drug Saf 13, 94-104.

Sprague, J.E., Banks, M.L., Cook, V.J. and Mills, E.M. (2003) Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and sympathetic nervous system involvement in hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). J Pharmacol Exp Ther 305, 159-166.

Sprague, J.E., Everman, S.L. and Nichols, D.E. (1998) An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. Neurotoxicology 19, 427-441.

Sprague, J.E. and Nichols, D.E. (1995) The monoamine oxidase-B inhibitor L-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. J Pharmacol Exp Ther 273, 667-673.

Staack, R.F. and Maurer, H.H. (2005) Metabolism of designer drugs of abuse. Curr Drug Metab 6, 259-274.

Steen, V.M., Lovlie, R., MacEwan, T. and McCreadie, R.G. (1997) Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients. Mol Psychiatry 2, 139-145.

Steinberg, P., Fischer, T., Kiulies, S., Biefang, K., Platt, K.-L., Oesch, F., Böttger, T., Bulitta, C., Kempf, P. and Hengstler, J.G. (1999) Drug metabolizing capacity of cryopreserved human, rat and mouse liver parenchymal cells in suspension. Drug Metab Dispos 27, 1415-1422.

Sticht, G., Pluisch, F., Bierhoff, E. and Kaferstein, H. (2003) Fatal outcome of Ecstasy overdose. Arch Kriminol 211, 73-80.

Stone, D.M., Hanson, G.R. and Gibb, J.W. (1987) Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. Neuropharmacology 26, 1657-1661.

Stone, D.M., Johnson, M., Hanson, G.R. and 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.

Stumm, G., Schlegel, J., Schafer, T., Wurz, C., Mennel, H.D., Krieg, J.C. and Vedder, H. (1999) Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. FASEB J 13, 1065-1072.

Suarez, R.V. and Riemersma, R. (1988) "Ecstasy" and sudden cardiac death. Am J Forensic Med Pathol 9, 339-341.

Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. and Negishi, M. (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. J Biol Chem 274, 6043-6046.

Svensson, I., Artursson, E., Leanderson, P., Berglind, R. and Lindgren, F. (1997) Toxicity in vitro of some silicon carbides and silicon nitrides: whiskers and powders. Am J Ind Med 31, 335-343.

Sweeney, B.P. (2004) Watson and Crick 50 years on. From double helix to pharmacogenomics. Anaesthesia 59, 150-165.

Szabo, Z., Scheffel, U., Suehiro, M., Dannals, D.F., Kim, S.E., Ravert, H.T., Ricaurte, G.A. and Wagner, H.N.J. (1995) Positron emission tomography of 5-HT transporter sites in the baboon brain with [11C]McN5652. J Cereb Blood Flow Metab 15, 798-805.

Tagliaro, F., De Battisti, Z., Groppi, A., Nakahara, Y., Scarcella, D., Valentini, R. and Marigo, M. (1999) High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylene-dioxyethylamphetamine) by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 723, 195-202.

Tappia, P.S., Hata, T., Hozaima, L., Sandhu, M.S., Panagia, V. and Dhalla, N.S. (2001) Role of oxidative stress in catecholamine-induced changes in cardiac sarcolemmal Ca2+ transport. Arch Biochem Biophys 387, 85-92.

Taraska, T. and Finnegan, K.T. (1997) Nitric oxide and the neurotoxic effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. J Pharmacol Exp Ther 280, 941-947.

Taylor, W.A. and Sulser, F. (1973) Effects of amphetamine and its hydroxylated metabolites on central noradrenergic mechanisms. J Pharmacol Exp Ther 185, 620-632.

Taylor, W.M., Reinhart, P.H. and Bygrave, F.L. (1983) Stimulation by alpha-adrenergic agonists of Ca2+ fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. Biochem J 212, 555-565.

Terada, Y., Shinohara, S., Matui, N. and Ida, T. (1988) Amphetamine-induced myoglobinuric acute renal failure. Jpn J Med 27, 305-308.

Teubner, W., Meinl, W. and Glatt, H. (2002) Stable expression of rat sulfotransferase 1B1 in V79 cells: activation of benzylic alcohols to mutagens. Carcinogenesis 23, 1877-1884.

Theobald, D.S., Fritschi, G. and Maurer, H.H. (2006) Studies on the toxicological detection of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxy-beta-phenethylamine (2C-B) in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci doi:10.1016/j.jchromb.2006.08.049.

Thummel, K.E. and Wilkinson, G.R. (1998) In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38.

Tsai, C.C., Liu, J.T., Shu, Y.R., Chan, P.H. and Lin, C.H. (2006) Optimization of the separation and on-line sample concentration of phenethylamine designer drugs with capillary electrophoresis-fluorescence detection. J Chromatogr A 1101, 319-323.

Tucker, G.T., Lennard, M.S., Ellis, S.W., Woods, H.F., Cho, A.K., Lin, L.Y., Hiratsuka, A., Schmitz, D.A. and Chu, T.Y. (1994) The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). Biochem Pharmacol 47, 1151-1156.

Tyndale, R., Aoyama, T., Broly, F., Matsunaga, T., Inaba, T., Kalow, W., Gelboin, H.V., Meyer, U.A. and Gonzalez, F.J. (1991) Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. Pharmacogenetics 1, 26-32.

Ujike, H., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Sekine, Y., Sora, I., Iyo, M., Katsu, T., Nomura, A., Nakata, K. and Ozaki, N. (2003) Nine- or fewer repeat alleles in VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene is a strong risk factor for prolonged methamphetamine psychosis. Pharmacogenomics J 3, 242-247.

Valentine, J.L. and Middleton, R. (2000) GC-MS identification of sympathomimetic amine drugs in urine: rapid methodology applicable for emergency clinical toxicology. J Anal Toxicol 24, 211-222.

van Bladeren, P.J. (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. Chem Biol Interact 129, 61-76.

van Schaik, R., van der Werf, M., van der Heiden, I.P., Dorrestein, S., Brosens, R., Thiadens, A., van Iperen, N., van Fessem, M., van Vliet, M., de Wildt, S.N., van den Anker, J. and Lindemans, J. (2003) CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 variant alleles in the dutch caucasian population. Clin Pharmacol Ther 73, P42.

van Tonningen, M.R., Garbis, H. and Reuvers, M. (1998) Ecstasy exposure during pregnancy. Teratology 58, 33.

Varela-Rey, M., Montiel-Duarte, C., Beitia, G., Cenarruzabeitia, E. and Iraburu, M.J. (1999) 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") stimulates the expression of alpha1(I) procollagen mRNA in hepatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 259, 678-682.

Velea, D., Hautefeuille, M., Vazeille, G. and Lantran-Davoux, C. (1999) Nouvelles drogues synthétiques empathogènes. L'Encéphale XXV, 508-514.

Venter, J.C., *et al.* (2001) The sequence of the human genome. Science 291, 1304-1351.

Verebey, K., Alrazi, J. and Jaffe, J.H. (1988) The complications of 'ecstasy' (MDMA). JAMA 259, 1649-1650.

Verrico, C.D., Miller, G.M. and Madras, B.K. (2005) MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. Psychopharmacology DOI 10.1007/s00213-005-0174-5, 1-15.

Villalobos, C.A., Bull, P., Saez, P., Cassels, B.K. and Huidobro-Toro, J.P. (2004) 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and structurally related phenylethylamines are potent 5-HT2A receptor antagonists in Xenopus laevis oocytes. Br J Pharmacol 141, 1167-1174.

Vollenweider, F.X., Gamma, A., Liechti, M. and Huber, T. (1998) Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naive healthy volunteers. Neuropsychopharmacology 19, 241-251.

von Sydow, K., Lieb, R., Pfister, H., Hofler, M. and Wittchen, H.U. (2002) Use, abuse and dependence of ecstasy and related drugs in adolescents and young adults-a transient phenomenon? Results from a longitudinal community study. Drug Alcohol Depend 66, 147-159.

Vuori, E., Henry, J.A., Ojanpera, I., Nieminen, R., Savolainen, T., Wahlsten, P. and Jantti, M. (2003) Death following ingestion of MDMA (ecstasy) and moclobemide. Addiction 98, 365-368.

Walubo, A. and Seger, D. (1999) Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "Ecstasy": case report and review of the literature. Human Exp Toxicol 18, 119-125.

Wang, J., Sonnerborg, A., Rane, A., Josephson, F., Lundgren, S., Stahle, L. and Ingelman-Sundberg, M. (2006) Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz. Pharmacogenet Genomics 16, 191-198.

Watanabe, K., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, I. and Yoshimura, H. (1995) 3,4,5-Trimethoxyphenylacetaldehyde, an intermediate metabolite of mescaline, is a substrate for microsomal aldehyde oxygenase in the mouse liver. Biological and pharmaceutical bulletin 18, 696-699.

Webber, J. and Macdonald, I.A. (2000) Signalling in body-weight homeostasis: neuroendocrine efferent signals. Proc Nutr Soc 59, 397-404.

Weinshilboum, R. (2003) Genomic medicine: inheritance and drug response. N Engl J Med 348, 529-537.

Weinshilboum, R.M., Otterness, D.M. and Szumlanski, C.L. (1999) Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. Annu Rev Pharmacol Toxicol 39, 19-52.

Welder, A.A. (1992) A primary culture system of postnatal rat heart cells for the study of cocaine and methamphetamine toxicity. Toxicol Lett 60, 183-196.

Welfare, M.R., Aitkin, M., Bassendine, M.F. and Daly, A.K. (1999) Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians. Pharmacogenetics 9, 367-375.

White, S.R., Duffy, P. and Kalivas, P.W. (1994) Methylenedioxymethamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens in vivo. Neuroscience 62, 41-50.

White, S.R., Obradovic, T., Imel, K.M. and Wheaton, M.J. (1996) The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. Prog Neurobiol 49, 455-479.

WHO, World Health Organization (1992) The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Switzerland, pp. 69-70.

WHO, World Health Organization (1999) WHO Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-first report. World Health Organ Tech Rep Ser 887, World Health Organization, Geneva, pp. I-V, 1-23.

WHO, World Health Organization (2001) WHO Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-second report. World Health Organ Tech Rep Ser 903, World Health Organization, Geneva, pp. I-V, 1-26.

Wink, D.A., Nims, R.W., Saavedra, J.E., Utermahlen, W.E.J. and Ford, P.C. (1994) The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 6604-6608.

Winstock, A.R., Griffiths, P. and Stewart, D. (2001) Drugs and the dance music scene: a survey of current drug use patterns among a sample of dance music enthusiasts in the UK. Drug Alcohol Depend 64, 9-17.

Winstock, A.R., Wolff, K. and Ramsey, J. (2002) 4-MTA: a new synthetic drug on the dance scene. Drug Alcohol Depend 67, 111-115.

Wu, D., Otton, S.V., Inaba, T., Kalow, W. and Sellers, E.M. (1997) Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. Biochem Pharmacol 53, 1605-1612.

Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N.D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr 134, 489-492.

Yamada, H., Shiiyama, S., Soejima-Ohkuma, T., Honda, S., Kumagai, Y., Cho, A.K., Oguri, K. and Yoshimura, H. (1997) Deamination of amphetamines by cytochromes P450: studies on substrate specificity and regioselectivity with microsomes and purified CYP2C subfamily isozymes. J Toxicol Sci 22, 65-73.

Yamamoto, B.K., Nash, J.F. and Gudelsky, G.A. (1995) Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. J Pharmacol Exp Ther 273, 1063-1070.

Yang, J., Jamei, M., Heydari, A., Yeo, K.R., De la Torre, R., Farre, M., Tucker, G.T. and Rostami-Hodjegan, A. (2006) Implications of mechanism-based inhibition of CYP2D6 for the pharmacokinetics and toxicity of MDMA. J Psychopharmacol doi:10.1177/0269881106065907.

Yau, J.L., Noble, J. and Seckl, J.R. (1997) Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following 3,4-methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. Neuroscience 78, 111-121.

Yuan, J., Cord, B.J., McCann, U.D., Callahan, B.T. and Ricaurte, G.A. (2002) Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. J Neurochem 80, 960-969.

Zhang, F. and Dryhurst, G. (1994) Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. J Med Chem 37, 1084-1098.

Zhao, Z.Y., Castagnoli, N.J., Ricaurte, G.A., Steele, T. and Martello, M. (1992) Synthesis and neurotoxicological evaluation of putative metabolites of the serotonergic neurotoxin 2-(methylamino)-1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl] propane [(methylenedioxy)methamphetamine]. Chem Res Toxicol 5, 89-94.

Zheng, Y. and Laverty, R. (1998) Role of brain nitric oxide in (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity in rats. Brain Res 795, 257-263.

Zheng, Z., Park, J.Y., Guillemette, C., Schantz, S.P. and Lazarus, P. (2001) Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. J Natl Cancer Inst 93, 1411-1418.

Zhu, B.T. (2002) Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. Curr Drug Metab 3, 321-349.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

Estudo da Influência do Metabolismo na Toxicidade de Derivados Anfetamínicos: 4-MTA, 2C-B e MDMA
Helena Maria Ferreira da Costa Ferreira Carmo
F.S.594 | Ano: 2006 | 30 Exemplares (1ª Edição) | Produção Gráfica: AJNet | www.ajnet.net