ECSTASY

Estudos *in vitro* da hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina e dos seus metabolitos

Márcia Cláudia Dias de Carvalho



Faculdade de Farmácia
Universidade do Porto
2004

Estudos *in vitro* da hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina ("ecstasy") e dos seus metabolitos

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

Orientador: Professor Doutor Félix Dias Carvalho

Márcia Cláudia Dias de Carvalho

Faculdade de Farmácia

Universidade do Porto

2004

Esta dissertação é dedicada,
com todo o meu amor,
aos meus PAIS,
à minha irmã SÓNIA
e ao meu marido LUÍS

DECLARAÇÃO

Ao abrigo do nº 2 do artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, declara-se que fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados:

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

I. Carvalho M, Carvalho F, and Bastos ML (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.

II. Carvalho M, Hawksworth G, Milhazes N, Borges F, Monks TJ, Fernandes E, Carvalho F, and Bastos ML (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.

III. Carvalho M, Milhazes N, Remião F, Borges F, Fernandes E, Amado F, Monks TJ, Carvalho F, and Bastos ML (2004). "Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and α-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates". *Arch Toxicol* 78:16-24.

IV. Carvalho M, Remião F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Monteiro MC, Gonçalves MJ, Seabra V, Amado F, Carvalho F, and Bastos ML (2004). "Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro". *Chem Res Toxicol* 17:623-632.

V. Carvalho M, Remião F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Carvalho F, and Bastos ML (2004). "The toxicity of N-methyl-α-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine". *Toxicology* 200:193-203.

Comunicações em actas de encontros científicos com arbitragem científica

I. Carvalho M, Carvalho F, and Bastos ML (2000). "Hyperthermia exposes freshly isolated mouse hepatocytes to MDMA (ecstasy) toxicity". *Toxicol Lett* 116 (Suppl 1): 30.

II. Carvalho M, Hawksworth G, Milhazes N, Borges F, Monks T, Fernandes E, Carvalho F, and Bastos ML (2002). "Metabolism as a determinant of MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity in primary cultures of rat and human proximal tubular cells". *Toxicol Lett* 135 (Suppl 1): S89.

III. Carvalho M, Remião F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Carvalho F, and Bastos ML (2003). "Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro". *Toxicol Lett* 144 (Suppl 1): S91.

IV. Carvalho M, Milhazes N, Remião F, Borges F, Fernandes E, Monks TJ, Carvalho F, and Bastos ML (2003). "Hepatotoxic effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine and α-methyldopamine in freshly isolated rat hepatocytes". *Toxicol Lett* 144 (Suppl 1): S98-S99.

V. Carvalho M, Milhazes N, Remião F, Borges F, Fernandes E, Carvalho F, and Bastos ML (2003). "The metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) into N-methyl-α-methyldopamine drastically increases its in vitro toxicity". *Toxicol Lett* 144 (Suppl 1): S99.

VI. Carvalho M, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML, Milhazes N, Borges F, Hawksworth G and Monks T (2004). "In vitro nephrotoxicity of 5-(glutathion-S-yl)-α-methyldopamine is potentiated by inhibition of γ-glutamyl transpeptidase and aminopeptidase M". *Fundam Clin Pharmacol* 18 (Suppl 1): 97.

VII. Carvalho M, Remião F, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML, Milhazes N, Borges F and Amado F (2004). "Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and its major metabolites in isolated rat hepatocytes". *Fundam Clin Pharmacol* 18 (Suppl 1): 97.

VIII. Carvalho M, Remião F, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML, Milhazes N, Borges F, Monteiro MC, Gonçalves MJ and Amado F (2004). "In vitro cardiotoxicity of ecstasy metabolites". *Fundam Clin Pharmacol* 18 (Suppl 1): 97.

IX. Carvalho M, Remião F, Milhazes N, Borges F, Fernandes E, Carvalho F and Bastos ML (2004). "In vitro hepatotoxicity of N-methyl-α-methyldopamine. Protective effect by antioxidants". *Toxicol Appl Pharmacol* 197:333-334.

Em cumprimento do disposto no referido Decreto-Lei, o autor declara que participou activamente na recolha e estudo do material incluído em todos os trabalhos, tendo redigido os textos com a activa colaboração dos outros autores.

AGRADECIMENTOS

Os trabalhos experimentais apresentados nesta dissertação foram realizados no Centro de Estudos de Química/Serviço de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e no Departamento de Medicina e Terapêutica da Universidade de Aberdeen.

Agradeço o importante apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), pela atribuição de uma Bolsa de Doutoramento (PRAXIS XXI/BD/20087/99), do Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional (FEDER) (POCTI/36099/FCB/2000) e do Fundo Social Europeu (FSE) no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

Quero agradecer de um modo especial às pessoas que mais me marcaram ao longo destes últimos anos e que tornaram possível este trabalho:

- À Professora Maria de Lourdes Bastos, pela oportunidade de integração no Laboratório de Toxicologia como bolseira de doutoramento da FCT e ainda pela sua amizade e apoio científico. A sua profunda experiência e o seu constante estímulo pelo estudo da área da Toxicologia muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.
- Ao Professor Félix Dias Carvalho, orientador desta dissertação, pelos valiosos ensinamentos prestados durante a realização deste trabalho e ainda por todo o entusiasmo, confiança, apoio e profunda sabedoria que sempre demonstrou durante estes anos de trabalho em conjunto. A ele devo o meu início na investigação e o gosto pela Toxicologia.
- To Professor Gabrielle Hawksworth for receiving me in her lab, her kindness and precious contribution to my work in the field of isolation and culture of human and rat proximal tubular cells. I can't forget how she made me fill welcome in Aberdeen. To the people in her lab, I thank for their friendship and joy.
- À Professora Maria Fernanda Borges e ao Dr. Nuno Milhazes, pela síntese da 3,4-metilenodioximetanfetamina, 3,4-metilenodioxianfetamina, α-metildopamina e N-metil-α-metildopamina realizada no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e, acima de tudo, pela grande amizade que sempre demonstraram.

- To Professor Terrence Monks for giving me some precious grams of 5-(glutathion-S-yl)-α-MeDA and 2,5-bis(glutathion-S-yl)-α-MeDA and for his precious contribution to my work.
- Ao Professor Fernando Remião, pelo ensinamento da técnica de isolamento de cardiomiócitos de rato e manuseamento do aparelho de HPLC. Agradeço ainda a sua amizade, disponibilidade e apoio incondicional a nível científico.
- À Engenheira Maria Elisa Soares, pelo apoio sempre presente nas "incessáveis" horas de ensaios e pelo seu contributo para o excelente ambiente humano no Laboratório de Toxicologia.
- À Dra. Helena Carmo, pelo apoio e companheirismo no Laboratório de Toxicologia.
- Ao Professor Francisco Amado, pela pronta disponibilidade e precioso contributo na identificação de compostos por Espectrometria de Massa.
- Aos Professores Eduarda Fernandes, Maria do Céu Monteiro, Vítor Seabra e à Dra. Maria José Gonçalves, pela amizade e colaboração nos estudos realizados e apresentados nesta dissertação.
- Às Técnicas Júlia Caramez e Graziela Fernandes, pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstraram no Laboratório de Toxicologia.

- Por fim, o meu mais sincero agradecimento aos meus PAIS, aos meus irmãos SÓNIA e MARCO, e ao meu marido LUÍS, pelo constante incentivo, inesgotável paciência e amor.

Índice

Resumo ..... *xv*

Abstract ..... *xxi*

Résumé ..... *xxv*

Abreviaturas ..... *xxxi*

Enquadramento e Estrutura da Dissertação ..... *xxxv*

PARTE I. INTRODUÇÃO: "ECSTASY", UMA DROGA DE ABUSO

1. Aspectos Históricos e Impacto na Sociedade Actual **1**

2. Relação Estrutura-Actividade **5**

3. Mecanismo de Acção Farmacológica **8**

4. Efeitos Farmacológicos **10**

5. Farmacocinética **14**

6. Efeitos Tóxicos **20**

6.1. Toxicidade no Sistema Nervoso Central **20**

6.2. Toxicidade Hepática **32**

6.3. Toxicidade no Sistema Cardiovascular **42**

6.4. Rabdomiólise **47**

6.5. Toxicidade Renal **49**

6.6. Hipertermia **51**

6.7. Hiponatrémia **54**

6.8. Toxicidade a nível do Desenvolvimento Embrionário **55**

6.9. Toxicidade no Sistema Imunológico **57**

7. Dependência **60**

8. Tratamento da Intoxicação **61**

PARTE II. TRABALHO EXPERIMENTAL

9. Objectivos da Dissertação **65**

10. Ensaios *In Vitro* da Hepatotoxicidade da 3,4-Metilenodioximetanfetamina e dos seus Metabolitos **67**

Trabalho I. **69**

"Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes"

Trabalho II. **77**

"Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and α-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates"

Trabalho III. **89**

"The toxicity of N-methyl-α-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine"

11. Ensaios *In Vitro* da Nefrotoxicidade da 3,4-Metilenodioximetanfetamina e dos seus Metabolitos **103**

Trabalho IV. **105**

"Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells"

12. Ensaios *In Vitro* da Cardiotoxicidade da 3,4-Metilenodioximetanfetamina e dos seus Metabolitos **115**

Trabalho V. **117**

"Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro"

PARTE III. DISCUSSÃO GERAL E REFERÊNCIAS

13. Discussão Geral e Conclusões **131**

14. Referências **147**

Resumo

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), vulgarmente conhecida por "ecstasy", é uma droga recreacional bastante popular entre os jovens na Europa e nos Estados Unidos da América, sendo consumida especialmente nas chamadas festas "rave". O número crescente de casos relativos aos seus efeitos tóxicos e até letais no fígado, rim e coração inspiraram a investigação dos mecanismos subjacentes à toxicidade desta droga nestes órgãos.

É bem conhecido que a administração de MDMA a animais de experiência e humanos leva a um aumento da temperatura corporal, o qual pode contribuir para a lesão celular induzida pela MDMA. Um dos objectivos deste trabalho foi a avaliação dos efeitos tóxicos da MDMA em hepatócitos isolados de ratinho a duas temperaturas de incubação, 37°C e 41°C, de forma a simular condições normotérmicas e hipertérmicas, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a hipertermia *per se* foi uma importante causa de citotoxicidade. O aumento na temperatura de incubação de 37°C para 41°C originou stresse oxidativo em hepatócitos isolados de ratinho, traduzido por indução de peroxidação lipídica e consequente perda de viabilidade celular. A MDMA induziu a depleção de glutationa (GSH) a 37°C, que foi potenciada a 41°C. Mais ainda, foi demonstrado que, a 41°C, a MDMA induz peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular em hepatócitos isolados de ratinho.

Além da hipertermia, outros factores, tais como o metabolismo da MDMA, poderão desempenhar um papel no mecanismo biológico de toxicidade desta droga. Outro objectivo deste trabalho foi o de investigar os efeitos tóxicos directos da MDMA e dos seus principais metabolitos 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), α-metildopamina (α-MeDA), N-metil-α-MeDA (N-Me-α-MeDA), 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA. Nesse sentido, os efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotóxicos causados por estes compostos foram avaliados usando como modelos *in vitro* as suspensões de hepatócitos isolados de rato, as culturas primárias de células tubulares proximais (PTCs) renais de rato e humanas, e as suspensões de cardiomiócitos isolados de rato.

A toxicidade induzida pela MDMA e MDA em hepatócitos isolados de rato caracterizou-se por uma depleção de GSH, de forma dependente do tempo e da concentração, mas teve um efeito negligenciável na viabilidade celular ou na actividade das enzimas glutationa redutase (GR), glutationa peroxidase (GPX) e glutationa S-transferase (GST). Pelo contrário, os seus metabolitos catecólicos N-Me-α-MeDA e a α-MeDA, respectivamente, induziram uma depleção de GSH mais marcada, que foi acompanhada por

uma perda de viabilidade celular e diminuição na actividade da GR, GPX e GST. A depleção em GSH deveu-se fundamentalmente à formação de aductos com GSH, uma vez que não se observou um aumento nos níveis de glutationa oxidada (GSSG), e a 2-(glutation-S-il)-α-MeDA e a 5-(glutation-S-il)-α-MeDA foram identificadas por HPLC-DAD/EC em hepatócitos isolados de rato incubados com a MDA ou a α-MeDA. Outro resultado importante deste estudo foi a prevenção da morte celular e da depleção de GSH induzida pela N-Me-α-MeDA na presença dos antioxidantes ácido ascórbico e N-acetilcisteína.

Demonstrou-se que a MDMA e a MDA não são directamente tóxicas para as PTCs de rato ou humanas, mas os seus metabolitos α-MeDA e, sobretudo, os conjugados com a GSH 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA demonstraram ser nefrotóxicos potentes. A pré-incubação com a acivicina, um inibidor da γ-glutamiltranspeptidase (γ-GT), ou com a bestatina, um inibidor da aminopeptidase M, resultou num aumento da toxicidade da 5-(glutation-S-il)-α-MeDA, o que indica que o metabolismo do conjugado com a GSH pela γ-GT e aminopeptidase M constitui uma via de destoxificação.

Finalmente, verificou-se que a MDMA e a MDA não são tóxicas para cardiomiócitos isolados de rato, mas que a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA induzem toxicidade significativa nessas células. Os efeitos tóxicos destes metabolitos caracterizam-se por uma perda da homeostasia da GSH (muito provavelmente devido à conjugação da N-Me-α-MeDA e α-MeDA com a GSH), depleção de trifosfato de adenosina (ATP), aumento sustentado dos níveis de cálcio intracelular, diminuição na actividade da GR, GPX e GST, e perda da morfologia celular normal.

Em síntese, pode ser postulado que o metabolismo da MDMA, resultando na formação de metabolitos altamente reactivos, como a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA, capazes de se conjugar com a GSH, é um factor crucial nos danos celulares induzidos pela MDMA no fígado. O stresse oxidativo resultante da oxidação dos metabolitos catecólicos parece estar envolvido, uma vez que os sistemas celulares de defesa antioxidante (GSH juntamente com as enzimas antioxidantes) são significativamente depletados, podendo-se obter protecção através do tratamento com antioxidantes. Foi também evidenciado que o metabolismo da MDMA é necessário para a expressão da nefrotoxicidade e da cardiotoxicidade induzida pela MDMA *in vitro*. Outra conclusão importante é que a

hipertermia potencia a toxicidade induzida pela MDMA em hepatócitos isolados de ratinho. Uma vez que a hipertermia e o metabolismo da MDMA ocorrem *in vivo*, parece razoável assumir que estes factores são potencialmente letais e que, muito certamente, contribuem para a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade que têm sido descritas em consumidores de "ecstasy".

Abstract

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), commonly known as "ecstasy", is a popular recreationally used drug among young people in Europe and North America, especially during so-called "rave" parties. The increasing reports of its toxic and even lethal effects at the liver, kidney and heart have inspired the research into the mechanisms by which the drug may cause toxicity in these organs.

It is well known that the administration of MDMA to laboratory animals and humans causes a rise in body temperature, which may contribute to MDMA-induced cellular injury. One of the aims of this work was to evaluate the toxic effects of MDMA in freshly isolated mouse hepatocytes at two different incubation temperatures, 37°C and 41°C, in an attempt to reproduce normothermic and hyperthermic conditions, respectively. The results obtained in this study showed that hyperthermia, by itself, was an important cause of cell toxicity. A rise in incubation temperature from 37°C to 41°C caused oxidative stress in freshly isolated mouse hepatocytes, reflected by induction of lipid peroxidation and consequent loss of cell viability. MDMA induced glutathione (GSH) depletion at 37°C that was potentiated at 41°C. Furthermore, it was shown that, at 41°C, MDMA induces lipid peroxidation and loss of cell viability in isolated mouse hepatocytes.

Besides hyperthermia, other factors, like the metabolism of MDMA, may play a role in the biological mechanism of toxicity of this drug. Another aim of this work was to investigate the direct toxic effects of MDMA and its major metabolites 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), α-methyldopamine (α-MeDA), N-methyl-α-MeDA (N-Me-α-MeDA), 5-(glutathion-S-yl)-α-MeDA and 2,5-bis(glutathion-S-yl)-α-MeDA. For this purpose, freshly isolated rat hepatocytes, primary cultures of rat and human renal proximal tubular cells (PTCs), and freshly isolated rat cardiomyocytes were used as *in vitro* models for the evaluation of the hepatotoxic, nephrotoxic and cardiotoxic effects elicited by these compounds.

MDMA- and MDA-induced toxicity to isolated rat hepatocytes was characterized by a concentration- and time-dependent GSH depletion but had a negligible effect on cell viability, or on the activities of glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX), and glutathione S-transferase (GST). In contrast, their catechol metabolites, respectively N-Me-α-MeDA and α-MeDA, induced a more marked depletion of GSH that was accompanied by loss of cell viability and decreases in GR, GPX and GST activity. GSH depletion was mostly due to the formation of GSH adducts since it was not observed increases in glutathione disulfide (GSSG) levels, and 2-(glutathion-S-yl)-α-MeDA and 5-

(glutathion-S-yl)-α-MeDA were identified by HPLC-DAD/EC within hepatocytes incubated with either MDA or α-MeDA. Another important result of this study was the prevention of N-Me-α-MeDA-induced GSH depletion and cell death, elicited by pre-incubation of the cells with the antioxidants ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine.

Neither MDMA nor MDA were found to be directly toxic either to rat or human PTCs, but their metabolites, α-MeDA and particularly the GSH-conjugates 5-(glutathion-S-yl)-α-MeDA and 2,5-bis(glutathion-S-yl)-α-MeDA, were found to be potent nephrotoxicants. Pre-incubation with either acivicin, an inhibitor of γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT), or bestatin, an inhibitor of aminopeptidase M, resulted in increased toxicity of 5-(glutathion-S-yl)-α-MeDA, which indicates that metabolism of the GSH-conjugate by γ-GT and aminopeptidase M constitutes a detoxification pathway.

Lastly, MDMA and MDA were not found to be toxic to isolated rat cardiomyocytes, but N-Me-α-MeDA and α-MeDA induced significant toxicity to those cells. The toxic effects of these metabolites are characterized by a loss of GSH homeostasis (most probably due to conjugation of GSH with N-Me-α-MeDA and α-MeDA), adenosine triphosphate (ATP) depletion, sustained increase of intracellular calcium levels, decreases in GR, GPX and GST activity, and loss of normal cell morphology.

In conclusion, it can be postulated that the metabolism of MDMA, resulting in the formation of highly reactive metabolites such as N-Me-α-MeDA and α-MeDA, which conjugate with GSH, is a crucial factor for cellular damage induced by MDMA in the liver. Oxidative stress resulting from the oxidation of catechol metabolites seems to be involved since cellular antioxidant defense systems (GSH along with antioxidant enzymes) are impaired and protection can be derived from treatment with antioxidants. It was also evidenced that metabolism of MDMA is required for the expression of MDMA-induced nephro- and cardiotoxicity *in vitro*. Another important conclusion is that hyperthermia potentiates MDMA-induced toxicity in isolated mouse hepatocytes. Since hyperthermia and MDMA metabolism occur *in vivo*, it seems reasonable to surmise that these situations are potentially lethal and most certainly contribute to the hepatotoxicity, nephrotoxicity and cardiotoxicity that has been reported in "ecstasy" users.

Résumé

3,4-Méthylènedioxymétamphétamine (MDMA), généralement connue comme "ecstasy", est une drogue récréative assez populaire chez les jeunes européens et américains et est consommée en particulier dans les "rave parties". Le nombre croissant de cas relatifs aux effets toxiques et même létaux de celle-ci dans le foie, le rein et le coeur aspirent à la recherche de mécanismes subjacents à la toxicité de cette drogue dans ces organes.

Nous savons tous que l'administration du MDMA chez les animaux de laboratoire et chez l'homme provoque une augmentation de la température corporelle qui peut amener à une lésion cellulaire induite par MDMA. Un des objectifs de ce travail est l'évaluation des effets toxiques du MDMA au niveau d'hépatocytes isolés de jeune rat à deux temperatures d'incubation, 37°C et 41°C, de façon à simuler respectivement des conditions normothermiques et hyperthermiques. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont démontré que l'hyperthermie *per se* fût une importante cause de toxicité. L'augmentation de la température d'incubation de 37°C à 41°C entraîné à un stress oxydatif dans les hépatocytes isolés de jeune rat, traduit par une induction de péroxydation lipidique et une perte de viabilité cellulaire conséquente. MDMA a induit une déplétion de glutatione (GSH) à 37°C qui a été potentialisés à 41°C. Plus encore, il a été démontré que à 41°C MDMA induit une péroxydation lipidique et une perte de viabilité cellulaire dans les hépatocytes isolés de jeune rat.

Outre l'hyperthermie, d'autres facteurs comme le métabolisme du MDMA peuvent jouer un rôle important dans le mécanisme biologique de la toxicité de cette drogue. Un autre objectif de ce travail á été la recherche des effets toxiques directs du MDMA et de ses principaux métabolites 3,4-méthylènedioxyamphétamine (MDA), α-méthyldopamine (α-MeDA), N-méthyl-α-MeDA (N-Me-α-MeDA), 5-(glutation-S-il)-α-MeDA et 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA. Ainsi, les effets hépatotoxiques, nefrotoxiques et cardiotoxiques causés par ces composés ont été évalués sur des modèles *in vitro* hépatocytes isolés de rat, cultures primaires de cellules tubulaires proximales (PTCs) rénales de rat et d'humains, et cardiomiocytes isolés de rat.

La toxicité induite par MDMA et MDA dans les hépatocytes isolés de rat s'est caractérisée par la déplétion de GSH, en fonction du temps et de la concentration, cependant elle est négligeable en ce qui concerne la viabilité cellulaire ou dans l'activité de glutatione-réductase (GR), glutatione-peroxidase (GPX) et glutatione S-transferase (GST). Bien au contraire, ses métabolites catéchols, respectivement, le N-Me-α-MeDA et α-MeDA, ont induit une déplétion de GSH plus marquée qui fût accompagnée d'une perte de

viabilité cellulaire et une diminution dans l'activité des enzymes GR, GPX et GST. La déplétion de GSH est fondamentalement dûe à la formation d'adducteurs avec GSH étant donné qu'une augmentation des niveaux de glutatione oxydée (GSSG) n'a pas été observée, et que le 2-(glutation-S-il)-α-MeDA et 5-(glutation-S-il)-α-MeDA ont été identifiés par HPLC-DAD/EC dans les hépatocytes incubées avec MDA ou α-MeDA. Un autre résultat important de cette étude fût la prévention de la mort cellulaire et la déplétion de GSH induite par N-Me-α-MeDA en présence des antioxydants acide ascorbique et N-acetylcysteine.

On a vérifié que MDMA et MDA ne sont pas directement toxiques pour les PTCs de rat ou de l'homme, mais ses métabolites α-MeDA et surtout ceux conjugués avec GSH 5-(glutation-S-il)-α-MeDA et 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA démontrent qu'ils peuvent être de puissants nefrotoxiques. La pré-incubation avec acivicine, un inhibiteur de γ-glutamyl transpéptidase (γ-GT), ou avec la bestatine, un inhibiteur de l'aminopeptidase M, a résulté en une augmentation de la toxicité de 5-(glutation-S-il)-α-MeDA ce qui indique que le métabolisme de ce conjugué avec GSH par γ-GT et aminopeptidase M constitue une voie de détoxification.

Finalement, on a vérifié que MDMA et MDA ne sont pas toxiques pour les cardiomyocytes isolés de rat, mais que N-Me-α-MeDA et α-MeDA induisent une toxicité significative dans ces cellules. Les effets toxiques de ces métabolites se sont caractérisés par une perte d'homeostasie du GSH (très probablement dû à la conjugaison de N-Me-α-MeDA et α-MeDA avec GSH), une déplétion d'adenosine triphosphate (ATP), une augmentation soutenue des niveaux de calcium intracellulaire, une diminution dans l'activité de GR, GPX et GST, et une perte de la morphologie cellulaire normale.

En bref, ont peut assurer que le métabolisme du MDMA, résultant en formation de métabolites hautement réactifs comme le N-Me-α-MeDA et α-MeDA, capables de conjugaison avec GSH, est une des principales causes des dommages provoqués par MDMA dans le foie. Le stress oxydatif résultant de l'oxydation des métabolites catéchols semble y avoir pris part étant donné que les systèmes cellulaires de défense antioxydante (GSH avec enzymes antioxydants) se trouvent diminués et qu'on peut obtenir protection au moyen d'un traitement d'antioxydants. On a aussi mis en évidence que le métabolisme du MDMA est nécessaire pour l'expression de nefrotoxicité et cardiotoxicité induite par MDMA *in vitro*. Une autre conclusion importante est que l'hyperthermie potentialise la

toxicité induite par MDMA dans les hépatocytes isolés de jeune rat. Dû l'hyperthermie et le métabolisme de MDMA se passent *in vivo*, il est possible de penser que ces facteurs sont potenciellement létaux et que très probablement ils contribuent à l'hépatotoxicité, néfrotoxité et cardiotoxité décrites chez les consommateurs d'"ecstasy".

ABREVIATURAS

ADH	Hormona antidiurética
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hemato-encefálica
CID	Coagulação intravascular disseminada
CK	Creatina fosfocínase
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DAD	Detector de fotodíodos
DHMI	5,6-Diidroxi-1-metilindole
DL_{50}	Dose letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Electroquímico
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
γ-GT	γ-Glutamiltranspeptidase
HMA	4-Hidroxi-3-metoxianfetamina
HMMA	4-Hidroxi-3-metoximetanfetamina
$HO^{\cdot}$	Radical hidroxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
Hsp	Proteínas de choque térmico
5-HT	5-Hidroxitriptamina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
IL	Interleucina
MAO	Monoamina oxidase

MDA	3,4-Metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina
α-MeDA	α-Metildopamina
N-Me-α-MeDA	N-metil-α-metildopamina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
NK	"Natural Killer"
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Monóxido de azoto
NOS	Sintetase do monóxido de azoto
$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
$ONOO^-$	Anião peroxinitrito
PTCs	Células tubulares proximais
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SIADH	Secreção inapropriada de hormona antidiurética
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
THA	2,4,5-Triidroxianfetamina
THMA	2,4,5-Triidroximetanfetamina
UCP	Proteína dissociadora mitocondrial

Para algumas abreviaturas foi mantida a nomenclatura anglo-saxónica dado o seu carácter universal, facilitando o seu reconhecimento.

ENQUADRAMENTO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Tem-se assistido, nas últimas décadas, ao aumento do consumo abusivo e generalizado de estimulantes de estrutura anfetamínica, principalmente no seio das classes etárias mais jovens. Este recrudescimento deve-se muito provavelmente ao aparecimento das chamadas "drogas de desenho" que não são mais que derivados sintéticos da anfetamina, obtidos por ligeiras modificações na estrutura de uma substância ilícita controlada por lei, na tentativa de ladear a legislação, por parte dos produtores clandestinos (Barish and Tintinalli, 1990). Entre estas, destaca-se a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; "ecstasy") por ser a segunda droga recreacional mais popular entre os jovens europeus, logo a seguir à "cannabis" (OEDT, 2003). A sua popularidade deve-se essencialmente à capacidade de aumentar a autoconfiança e autoestima e de induzir sentimentos de empatia (Schwartz and Miller, 1997). Os ritmos de produção e a amplitude do tráfico de "ecstasy" têm vindo a aumentar consideravelmente dado a sua produção ser relativamente simples e as matérias-primas necessárias ao seu fabrico serem baratas e amplamente disponíveis. É curioso notar a facilidade de acesso pela Internet ao seu processo de síntese.

Também no nosso país o consumo de "ecstasy" se tornou numa realidade, como nos é transmitido através da informação veiculada pelos órgãos de comunicação social. Esta situação é alarmante porque, apesar de algumas informações disponíveis para o público descreverem a MDMA como um composto inócuo, ela não é desprovida de toxicidade. De facto, têm sido descritos na literatura vários efeitos tóxicos, nomeadamente cardiomiopatias (Milroy *et al.*, 1996), hipertermia (Walubo and Seger, 1999), rabdomiólise (Kunitz *et al.*, 2003), hiponatrémia grave (Budisavljevic *et al.*, 2003), coagulação intravascular disseminada (CID) (Barrett and Taylor, 1993), hepatotoxicidade (Henry *et al.*, 1992), nefrotoxicidade (Walubo and Seger, 1999), neurotoxicidade (Lyles and Cadet, 2003), convulsões e morte (Coore, 1996; White *et al.*, 1997), principalmente em jovens.

Apesar dos efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotóxicos serem repetidas vezes referidos na literatura científica associados ao consumo de "ecstasy", os mecanismos moleculares são ainda desconhecidos e foram aprofundados nos trabalhos realizados no âmbito desta dissertação.

Esta dissertação encontra-se dividida em 3 partes:

- **Parte I. Introdução: "Ecstasy", uma droga de abuso**

Na primeira parte da dissertação fez-se uma revisão histórica da MDMA, desde a sua

síntese até ao seu uso inicial como auxiliar em psicoterapia e, mais recentemente, como droga de abuso. São ainda referidos outros aspectos importantes como: i) a relação estrutura-actividade, ii) a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), iii) o mecanismo de acção farmacológica, iv) os efeitos tóxicos a vários níveis, nomeadamente neuronal, cardiovascular, muscular, renal, hepático e imunológico, v) o fenómeno da dependência e vi) as possibilidades terapêuticas no tratamento de intoxicações agudas. Tendo em conta o vasto número de publicações referentes à MDMA (cerca de 1500 referidas na base "PubMed", apenas nos últimos 10 anos), essa abordagem teve de ser objectiva, excluindo ou apenas fazendo breves referências a assuntos importantes, como é o caso dos "métodos de identificação e doseamento da MDMA e seus metabolitos em matrizes biológicas" empregados frequentemente em Toxicologia Clínica e Forense, que podem ser encontrados em revisões de excelente qualidade (como exemplos pode-se citar Kraemer and Maurer, 1998; Moeller *et al.*, 1998; Kintz and Samyn, 1999; Maurer *et al.*, 2000).

- **Parte II. Trabalho Experimental**

Nesta segunda parte apresentam-se os objectivos do trabalho experimental e os artigos publicados referentes aos ensaios realizados no âmbito desta dissertação. Estas publicações contêm os protocolos experimentais e o tratamento estatístico utilizado, assim como os resultados obtidos e respectivas discussões.

- **Parte III. Discussão Geral e Referências**

Nesta parte apresenta-se uma discussão geral e as conclusões finais do trabalho, bem como todas as referências utilizadas na feitura desta dissertação.

Parte I

Introdução

"ECSTASY", UMA DROGA DE ABUSO

1. ASPECTOS HISTÓRICOS E IMPACTO NA SOCIEDADE ACTUAL

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) foi sintetizada pela primeira vez em 1912 pela firma química alemã Merck, tendo sido patenteada em 1914 como anoréctica. No entanto, nunca chegou a ser comercializada como tal e caiu no esquecimento (Hegadoren *et al.*, 1999; Milroy, 1999). Nos anos 50, foi utilizada pelo exército dos Estados Unidos da América em experiências destinadas a encontrar uma "droga da verdade" para os interrogatórios em tempo de Guerra. Os resultados destes ensaios foram infrutíferos e tornou a cair no esquecimento (Hegadoren *et al.*, 1999; Milroy, 1999). Só voltou a surgir mais tarde, em 1965, quando o químico californiano Alexander Shulgin a sintetizou no seu laboratório. Shulgin era, nessa altura, um químico promissor da "Dow Chemicals", que havia descoberto um insecticida lucrativo. A companhia, na esperança de outras descobertas lucrativas, montou-lhe um laboratório próprio, embora Shulgin se interessasse mais por substâncias psicoactivas do que por insecticidas. A firma despediu-o quando teve conhecimento de que sintetizava drogas de abuso no seu laboratório. No entanto, Shulgin continuou os seus estudos e na sua obra "Phenetylamines I have known and loved" descreve a composição química e o efeito de 179 drogas psicoactivas, entre as quais a MDMA. Posteriormente, e com a ajuda de um amigo psiquiatra, divulgou o potencial da MDMA como adjuvante na psicoterapia (Walder and Amendt, 1999). Durante os anos 70 e início dos anos 80 a MDMA gozou de alguma popularidade entre a comunidade psiquiátrica. Os seus defensores afirmam que a sua utilização num esquema terapêutico controlado aumenta a capacidade de introspecção e induz sentimentos de confiança e empatia entre pacientes e terapeutas (Grob *et al.*, 1992; Karch, 1993; Burnat *et al.*, 1996; Velea *et al.*, 1999). Estas propriedades levaram a que Nichols e colaboradores (1986) sugerissem uma nova classe farmacológica para a MDMA e compostos análogos: os "entactogénios". O conceito, derivado do grego, significa que estas drogas permitem um "contacto com o íntimo".

No final da década de 70, o seu consumo como droga de abuso encontrava-se generalizado nos Estados Unidos da América (Burnat *et al.*, 1996; Hegadoren *et al.*, 1999; Rochester and Kirchner, 1999). A neurotoxicidade observada em animais de experiência após a administração de um composto relacionado, a metilenodioxianfetamina (MDA),

levou a que a "Drug Enforcement Administration" (DEA), em 1985, classificasse a MDMA como substância de grau I (substâncias com elevado potencial de abuso, sem utilizações clínicas reconhecidas e sem segurança aceitável mesmo sob supervisão médica). No entanto, a grande controvérsia gerada à volta do seu valor terapêutico levou a que a jurisprudência decidisse aceitar a MDMA para uso sob supervisão médica, tendo sido colocada numa classe menos restritiva de grau III. Esta reclassificação foi apenas temporária e, em Março de 1988, foi novamente classificada como substância de grau I (Liester *et al.*, 1992; Burnat *et al.*, 1996; Burgess *et al.*, 2000).

Apesar destas restrições, a MDMA propagou-se muito rapidamente como droga recreacional, sendo mais vulgarmente conhecida por "ecstasy" (outras designações são "XTC", "E", "Adam" ou "droga do amor"). Tornou-se bastante popular, principalmente no Reino Unido e nos Estados Unidos da América, sendo consumida de forma despreocupada pelos jovens nas chamadas festas "rave" (McCann and Ricaurte, 1994; Schwartz and Miller, 1997; Rochester and Kirchner, 1999). A "ecstasy" é usualmente vendida na forma de comprimidos de várias cores, formatos e tamanhos, que são decorados com uma vasta variedade de desenhos ou logotipos (ver www.drugscope.org.uk; www.ecstasy.org; www.erowid.org). Dado que se trata de uma droga sintetizada clandestinamente, a dose e pureza variam consideravelmente, mas geralmente cada comprimido contém pelo menos 50 a 150 mg de MDMA (Green *et al.*, 2003). Os principais efeitos observados (que justificam a sua popularidade) são a euforia, a sensação de bem-estar, o aumento do estado de vigília e alerta, sentimentos de confiança e empatia com as pessoas ao redor, redução dos pensamentos negativos e diminuição das inibições (Green *et al.*, 2003).

Segundo o relatório publicado pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT), datado de 2003, a "ecstasy" e outras anfetaminas são as drogas ilícitas mais frequentemente consumidas nos países da União Europeia a seguir à "cannabis". Este relatório revela ainda que 0,5% a 5% da população adulta europeia e 1% a 6% da população jovem havia consumido "ecstasy". Estas taxas são significativamente mais elevadas no Reino Unido, onde se estima que cerca de 31% da população, com idades compreendidas entre os 16 e 25 anos, já consumiram "ecstasy" (Hegadoren *et al.*, 1999; Green *et al.*, 2003) e que cerca de 500.000 jovens consomem actualmente a droga todos os fins-de-semana (Green *et al.*, 2003). Um estudo recente realizado no Reino Unido em 1151 indivíduos (recrutados através de anúncios numa revista popular de "dance music") revelou que 96% dos indivíduos havia ingerido "ecstasy" pelo menos uma vez. A duração média de

consumo foi de 4 a 5 anos, sendo que 8% dos indivíduos consumiram a droga por um período superior a 10 anos (Winstock *et al.*, 2001). Enquanto que o consumo de "ecstasy" parece ter estabilizado no Reino Unido, nos Estados Unidos da América, pelo contrário, parece estar a aumentar (Boyd *et al.*, 2003). Um estudo realizado recentemente para averiguar a prevalência de drogas ilícitas nas escolas secundárias dos Estados Unidos da América revelou um aumento do consumo de "ecstasy" de 2,8% em 1997 para 4,7% em 1999 (Strote *et al.*, 2002). Além do Reino Unido e Estados Unidos da América, o consumo de "ecstasy" tem vindo a aumentar gradualmente em muitos outros países, nomeadamente Espanha, Irlanda, Alemanha, Holanda, Noruega, Itália e Austrália (De la Fuente *et al.*, 1997; Lynskey *et al.*, 1999; Pedersen and Skrondal, 1999; Christophersen, 2000; OEDT, 2003). No nosso país, o consumo de "ecstasy" surgiu em inícios dos anos 90 e, à semelhança dos restantes países da Europa, esta droga ganhou rapidamente popularidade entre os jovens portugueses, como nos sugere a informação veiculada pelos órgãos de comunicação social (ver, a título de exemplo, revista "Visão" de 24 de Março de 1994; jornal "Público" de 7 de Novembro e 7 de Dezembro de 1995; jornal "Expresso" de 1 de Novembro de 1996; revista "A Capital" de 22 de Fevereiro de 2000; revista "Grande Reportagem" de Setembro de 2000; jornal "Público" de 9 de Junho de 2002; jornal "Diário de Noticias" de 16 de Julho de 2002 e 14 de Outubro de 2002). A "ecstasy" tornou-se uma "droga da moda" em Portugal, sendo consumida sobretudo aos fins-de-semana em festas de música "techno" e "raves". Para muito tem contribuído o facto do preço de comprimidos comercializados como "ecstasy" em Portugal ser o mais baixo entre os países da União Europeia (entre um e cinco euros) (OEDT, 2001). Segundo o relatório anual do Instituto Português da Droga e da Toxicodependência (IPDT, 2003), os resultados dos estudos realizados a nível nacional em 2001 na população do 3º Ciclo do Ensino Básico revelaram uma taxa de consumo de "ecstasy" de 4% em Portugal Continental, 6% nos Açores e de 3% na Madeira. Embora haja poucos dados concretos a nível nacional sobre a incidência do consumo na população, as apreensões de "ecstasy" feitas pelas autoridades policiais (quer em número, quer em quantidade) têm vindo a aumentar (por exemplo, verificou-se um aumento de 300% no ano de 2001 relativamente ao ano de 2000), o que parece indicar um aumento do consumo desta droga em Portugal (OEDT, 2001; IPDT, 2003).

É importante salientar que a "ecstasy" é geralmente tida como uma droga relativamente inócua pelos seus consumidores. No entanto, como dizia a campanha do Projecto Vida, "a ecstasy não é inocente" e são já vários os casos descritos na literatura em

que o seu consumo está associado a morbilidade e mortalidade, principalmente em jovens (Chadwick *et al.*, 1991; Henry *et al.*, 1992; Forrest *et al.*, 1994; Schifano *et al.*, 2003). Em Portugal, os primeiros casos fatais associados ao consumo de "ecstasy" começaram a surgir em 2001 (IPDT, 2003). No entanto, a ausência de registos anteriores pode ser justificada pelo facto dos óbitos por "overdose" não especificarem na maioria dos casos o tipo de droga envolvida.

2. RELAÇÃO ESTRUTURA-ACTIVIDADE

A MDMA é uma feniletilamina com estrutura química semelhante à da anfetamina e à da mescalina (Fig. 1), o que lhe confere propriedades estimulantes e alucinogénicas. No entanto, a MDMA não se enquadra plenamente em nenhuma destas categorias (Glennon, 1999). De facto, a molécula da MDMA possui uma actividade estimulante central moderada e os efeitos alucinogénicos associados são observados apenas para doses muito elevadas. Nichols e colaboradores (1986) com base nos resultados de estudos da relação estrutura-actividade concluiram que a MDMA possui propriedades particulares, que a tornam distinta dos compostos anfetamínicos e alucinogénios. Estes autores propuseram uma nova classe farmacológica, para incluir a MDMA, que designaram de "entactogénios", o que significa, como já foi referido, "contacto com o íntimo".

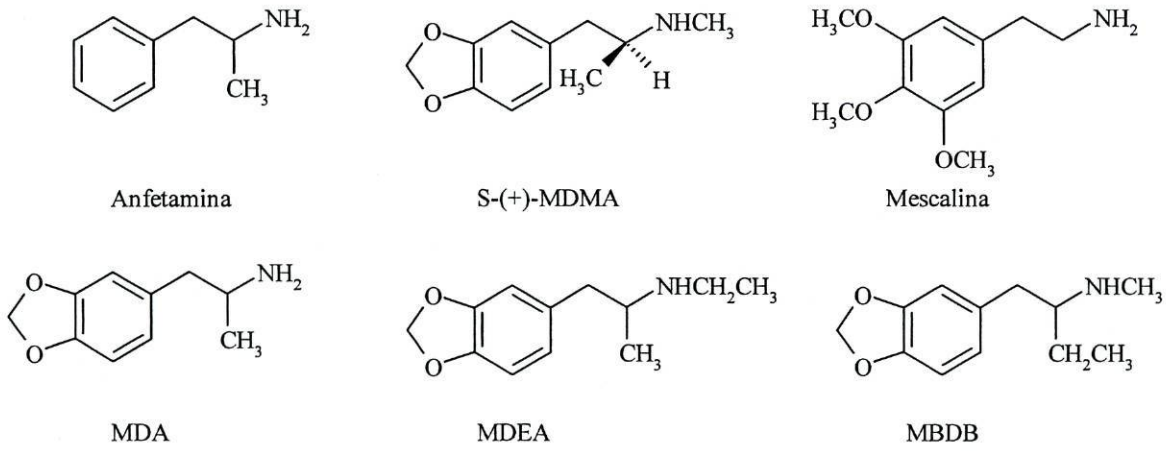


Figura 1. Estrutura química da anfetamina, mescalina e derivados 3,4-metilenodioxi da feniletilamina [MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina; MDEA: 3,4-metilenodioxietilanfetamina; MBDB: N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina]

O estudo da relação estrutura-actividade da MDMA permitiu as seguintes conclusões (Nichols and Oberlender, 1989; Dal Cason, 1990; Nichols and Oberlender, 1990; Parker *et al.*, 1998; Glennon, 1999):

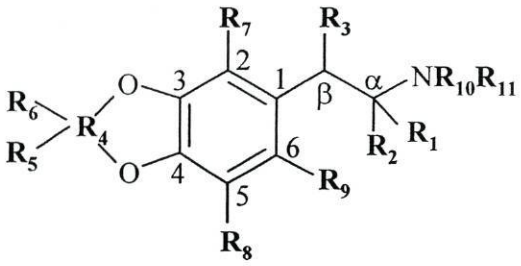


Figura 2. Estrutura da 3,4-metilenodioxifeniletilamina indicando os possíveis locais de substituição

- **Estereoquímica**

- O isómero S-(+)-MDMA (Fig. 1) é o alucinogénio mais activo. Regra geral, nos compostos de estrutura anfetamínica com actividade alucinogénica, o isómero R é o alucinogénio mais potente. A molécula da MDMA constitui assim uma excepção.

- **Substituição na cadeia alifática**

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

- **Substituição no grupo amina**

- A N-metilação da MDA (R_{10}=R_{11}=H) leva à obtenção da MDMA (R_{10}=H; R_{11}=CH_3) originando uma diminuição dos efeitos alucinogénicos do enantiómero R-MDMA, mantendo, no entanto, a actividade do enantiómero S-MDMA. É de salientar que a N-metilação de compostos de estrutura anfetamínica com propriedades alucinogénicas resulta numa diminuição significativa desta actividade.
- A presença do grupo N-metilo aumenta a lipofilia, facilitando a passagem da droga para o cérebro, o que leva a efeitos mais rápidos, potentes e prolongados.
- A substituição do grupo N-metilo pelo seu homólogo N-etilo (R_{10}=H; R_{11}=C_2H_5) ou por gupos substituintes volumosos origina uma diminuição da actividade estimulante e alucinogénica da MDMA.

- **Substituição no anel aromático**

- A introdução de um grupo metilo na posição 2 (R_7=CH_3) ou 5 (R_8=CH_3) do anel aromático não conduz à alteração da actividade alucinogénica, enquanto que a presença de um substituinte na posição 6 (R_9=CH_3) diminui esta actividade.
- A introdução de um grupo metoxilo nas posições 2 (R_7=OCH_3) ou 6 (R_9=OCH_3) não conduz à alteração da actividade alucinogénica, enquanto que na posição 5 (R_8=CH_3) diminui a actividade estimulante e alucinogénica.

- **Substituição no anel dioxol**

- A substituição do grupo metileno (R_4=CH_2) por um grupo etileno (R_4=CH_2CH_2) ou propileno (R_4=$CH_2CH_2CH_2$) origina uma diminuição da actividade estimulante e "entactogénica".
- A introdução de um grupo metilo no anel dioxol (R_5=CH_3; R_6=H) diminui a actividade e a introdução de dois grupos metilo (R_5=R_6=CH_3) inibe a actividade alucinogénica e "entactogénica" da MDMA.

3. MECANISMO DE ACÇÃO FARMACOLÓGICA

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

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

Em concentrações baixas, verifica-se que, para além deste processo, a MDMA possui uma acção inibidora da captação vesicular de 5-HT e facilita a sua libertação das vesículas por interacção directa com o transportador. Estes efeitos são estereoselectivos, sendo o enantiómero S-(+)-MDMA mais potente (Rudnick and Wall, 1992). Em concentrações elevadas, a MDMA pode penetrar nas vesículas sinápticas por difusão passiva e, sendo uma base fraca, promover o aumento do pH vesicular e, consequentemente, o efluxo de 5-HT, uma vez que esta amina é mantida no interior das vesículas através de um gradiente de iões H^+ regulado por uma bomba de protões dependente do ATP (Rudnick and Wall, 1992; Seiden *et al.*, 1993; Kuczenski and Segal, 1994).

A MDMA, além de promover a libertação de catecolaminas, inibe a sua recaptação neuronal (Kuczenski and Segal, 1994), aumentando desta forma o tempo de permanência destas aminas na fenda sináptica. Em adição, foi demonstrado que a MDMA induz a inibição competitiva da monoamina oxidase (MAO) especialmente do tipo A (que apresenta maior afinidade para a 5-HT) mas também do tipo B e, desta forma, diminui a degradação enzimática da serotonina e das catecolaminas (Leonardi and Azmitia, 1994), o que contribui para o prolongamento da estimulação simpática.

Por fim, a MDMA estimula a síntese de dopamina por um processo mediado por receptores 5-$HT_{2A/2C}$ localizados nos neurónios GABAérgicos. É importante aqui referir que foi já demonstrada uma acção agonista da MDMA nos receptores 5-HT_2 (Green *et al.*, 2003). Assim, a activação destes receptores pós-sinápticos pela MDMA ou pela 5-HT libertada é responsável pela diminuição dos níveis de GABA (Yamamoto *et al.*, 1995) e consequente estimulação da síntese e libertação de dopamina (Nash *et al.*, 1990). A administração de antagonistas dos receptores 5-HT_2 previne este processo (Nash *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991).

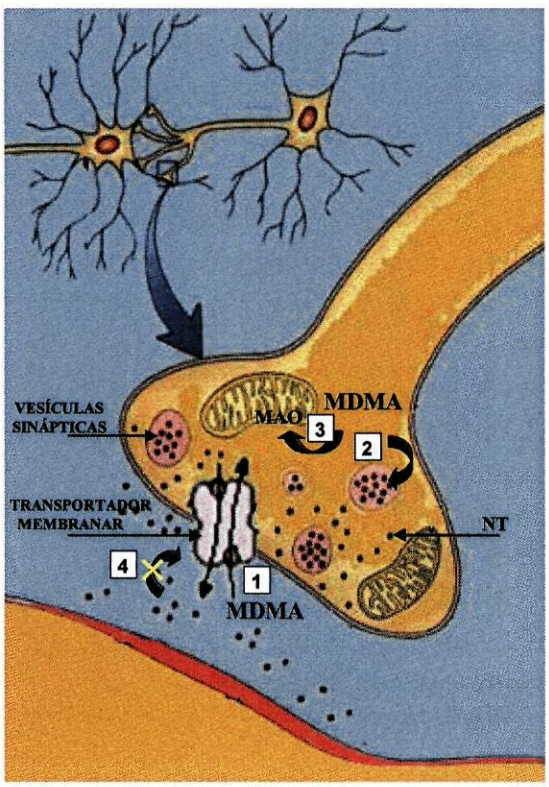


Figura 3. Mecanismo de acção farmacológica da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA). **(1)** A MDMA promove a libertação do neurotransmissor (NT) por permuta com este a nível do seu transportador. **(2)** Pode também deslocar o NT das vesículas sinápticas e **(3)** diminuir o seu metabolismo pela monoamina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

4. EFEITOS FARMACOLÓGICOS

As doses de MDMA normalmente consumidas para fins recreacionais variam de 100 a 200 mg (1,4-2,8 mg/kg), correspondente a 1 ou 2 comprimidos (Hegadoren *et al.*, 1999). Os efeitos dependem da dose, frequência e duração do consumo. Embora muitos consumidores de "ecstasy" tomem apenas 1 comprimido, repetindo a administração a intervalos de tempo diferentes de forma a prolongar os efeitos desejados da droga, outros consomem vários comprimidos numa única toma (Hammersley *et al.*, 1999). O início dos efeitos ocorre em 30 a 45 minutos. A duração do efeito é de aproximadamente 4 a 6 horas, mas uma diminuição evidente deste efeito ocorre em 2 a 3 horas (Hegadoren *et al.*, 1999).

A tolerância para os efeitos procurados desenvolve-se rapidamente com o uso regular e frequente de MDMA, sendo usual o aumento das doses para 5 a 10 comprimidos (Baudot *et al.*, 1998; García-Repetto *et al.*, 2003).

Efeitos periféricos

Os efeitos periféricos da MDMA resultam da sua acção simpaticomimética indirecta sobre os receptores adrenérgicos (essencialmente α e β) e serotoninérgicos. Nas Tabelas 1 e 2 descrevem-se, respectivamente, as respostas periféricas à estimulação adrenérgica e serotoninérgica, as quais poderão provavelmente ser originadas por estimulação indirecta pela MDMA. Para doses recreacionais, os efeitos normalmente observados são o aumento da pressão sanguínea sistólica e diastólica, aumento da frequência e do débito cardíaco, taquicardia, palpitações, dilatação das pupilas (midríase), tremor e broncodilatação (Henry *et al.*, 1992; Grob *et al.*, 1996; Vollenweider *et al.*, 1998; Hegadoren *et al.*, 1999).

Efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)

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

Estes efeitos parecem ser mediados pela estimulação dos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos induzida pela MDMA (Schechter, 1988). A estimulação dos receptores

dopaminérgicos centrais parece ser responsável pelos efeitos estimulantes no SNC. No entanto, outros sistemas de neurotransmissores também podem contribuir de forma significativa para o efeito final, quer modulando a acção dopaminérgica, quer originando acções que competem com os seus efeitos (Segal and Kuczenski, 1994). Os efeitos alucinogénicos parecem resultar da elevação no cérebro dos níveis extracelulares de 5-HT e activação dos respectivos receptores, entre os quais, o 5-HT_{2A} (Huether *et al.*, 1997).

A hiperactividade motora induzida pela MDMA parece resultar da estimulação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_1 (Callaway *et al.*, 1992; Burnat *et al.*, 1996; Bengel *et al.*, 1998). Esta acção é estereoselectiva, sendo o isómero S-(+)-MDMA o mais potente (Callaway *et al.*, 1992).

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

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

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

Órgão efector	Receptor	Resposta
Olho		
músculo radial da íris	α_1	Contracção (midríase) ++
músculo ciliar	β_2	Relaxamento para visão ao longe +
glândulas lacrimais	α	Secreção +
Coração		
nodo sino-auricular	β_1, β_2	Aumento do ritmo cardíaco ++
aurículas	β_1, β_2	Aumento da contractilidade e da velocidade de condução ++
nodo auriculo-ventricular	β_1, β_2	Aumento da automaticidade e da velocidade de condução ++
sistema His-Purkinje	β_1, β_2	Aumento da automaticidade e da velocidade de condução +++
ventrículos	β_1, β_2	Aumento da contractilidade, velocidade de condução, automaticidade e velocidade dos marcapassos +++
Arteríolas		
coronárias	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_2$	Constrição +; dilatação ++
da pele e mucosas	α_1, α_2	Constrição +++
do músculo esquelético	$\alpha; \beta_2$	Constrição ++; dilatação ++
cerebrais	α_1	Constrição (ligeira)
pulmonares	$\alpha_1; \beta_2$	Constrição +; dilatação
das vísceras abdominais	$\alpha_1; \beta_2$	Constrição +++; dilatação +
das glândulas salivares	α_1, α_2	Constrição +++
renais	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_1, \beta_2$	Constrição +++; dilatação +
Veias	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_2$	Constrição ++; dilatação ++
Pulmão		
músculo brônquico e traqueal	β_2	Relaxamento +
glândulas brônquicas	$\alpha_1; \beta_2$	Diminuição da secreção; aumento da secreção
Estômago		
motilidade e tónus	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_2$	Diminuição (normalmente) +
esfincters	α_1	Contracção (normalmente) +
secreção		Inibição (?)
Intestino		
motilidade e tónus	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_1, \beta_2$	Diminuição +
esfincters	α_1	Contracção (normalmente) +
secreção	α_2	Inibição
Vesícula e ductos biliares	β_2	Relaxamento +
Rim		
Secreção de renina	$\alpha_1; \beta_1$	Diminuição +; aumento ++
Bexiga		
detrusor	β_2	Relaxamento (normalmente) +
trígono e esfincter	α_1	Contracção ++
Uretra		
motilidade e tónus	α_1	Aumento
Útero	$\alpha_1; \beta_2$	Na grávida: contracção (α_1); Relaxamento (β_2); Não grávida: relaxamento (β_2)
Órgãos sexuais masculinos	α_1	Ejaculação ++
Pele		
músculos pilomotores	α_1	Contracção ++
glândulas sudoríferas	α_1	Secreção localizada +
Cápsula esplénica	$\alpha_1; \beta_2$	Contracção +++; relaxamento +
Músculo esquelético	β_2	Aumento da contractilidade, glicogenólise e captação de potássio
Fígado	$\alpha_1; \beta_2$	Glicogenólise e gluconeogénese +++
Pâncreas		
ácinos	α	Diminuição da secreção +
ilhas (células β)	$\alpha_2; \beta_2$	Diminuição da secreção +++; aumento da secreção +

Órgão efector	Receptor	Resposta
Adipócitos	α_2; β_1, β_2, β_3	Inibição da lipólise; lipólise +++ (termogénese)
Glândulas salivares	α_1; β	Secreção de potássio e de água +; secreção de amílase +
Glândula pineal	β	Síntese da melatonina
Hipófise posterior	β_1	Secreção de hormona anti-diurética

Tabela 1. Respostas de órgãos efectores à estimulação simpaticomimética (adaptado de Hoffman and Taylor, 2001). As respostas são representadas de 1+ a 3+ para indicar a importância aproximada da resposta adrenérgica no controlo dos vários órgãos e funções referidas

Órgão efector	Receptor	Resposta
Músculo liso da vasculatura renal, esplénica, pulmonar e cerebral	5-HT_2	Vasoconstrição
Pulmão	5-HT_2	Broncoconstrição
Estômago	5-HT_4, 5-HT_2	Aumento da motilidade gastroesofágica (normalmente)
Intestino	5-HT_4, 5-HT_2	Aumento da motilidade intestinal (normalmente)
Plaquetas	5-HT_2	Agregação plaquetária

Tabela 2. Respostas de órgãos efectores e plaquetas à estimulação serotoninérgica (Hoffman and Taylor, 2001)

5. FARMACOCINÉTICA

Absorção e Distribuição

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

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

De la Torre e colaboradores (2000a) realizaram um estudo em 14 voluntários que receberam uma dose única de MDMA compreendida entre 50 e 150 mg (50 n=2, 75 n=4, 100 n=2, 125 n=4, 150 n=2). Os níveis plasmáticos encontrados neste estudo estão de acordo com os anteriores, sendo de 236,4 μg/L para a dose de 125 mg e de 464,5 μg/L para a dose de 150 mg. Uma constatação importante deste estudo foi a inexistência de proporcionalidade directa entre a dose de MDMA ingerida e os níveis plasmáticos encontrados, sendo que doses mais elevadas produziram níveis plasmáticos desproporcionalmente mais elevados. Estes resultados sugerem que a farmacocinética da MDMA não é linear. Recentemente, Farré e colaboradores (2004) avaliaram a farmacocinética da MDMA no Homem após a adminstração repetida da droga (100 mg, 2 vezes, com intervalo de 24 horas) e verificaram que o nível plasmático de MDMA obtido após a administração da segunda dose era superior ao esperado. Uma explicação possível é a saturação do metabolismo ou do armazenamento tecidular da MDMA para doses elevadas. Alternativamente, pode haver inibição do metabolismo da MDMA (etapa da desmetilenação). Em concordância com esta hipótese, verificou-se recentemente, usando microssomas hepáticos de rato e humanos, que a MDMA actua como um inibidor competitivo da debrisoquina 4-hidroxilase (*CYP*2D6 ou citocromo P450 2D6), parecendo haver formação de um complexo metabolito-enzima responsável pela inibição do metabolismo (Wu *et al.*, 1997; Delaforge *et al.*, 1999). De facto, é conhecido que os

metabolitos da MDMA com grupos metoxi no anel aromático possuem uma elevada afinidade para a *CYP*2D6 comparativamente aos metabolitos O-desmetilenados (Green *et al.*, 2003).

Em conjunto, os estudos acima referidos indicam que a dose de MDMA usualmente consumida para fins recreacionais produz níveis plasmáticos de cerca de 0,1 a 0,5 mg/L. A maioria dos casos de intoxicações agudas pela MDMA descritos na literatura referem valores plasmáticos bastante superiores a estes, na ordem de 0,5 a 10 mg/L (cerca de 20 vezes superior às doses recreacionais usuais) (Brown and Osterloh, 1987; Henry *et al.*, 1992), e em alguns casos fatais os níveis determinados chegam a ser 70 vezes superiores aos valores referidos (Randall, 1992).

Não existem ainda dados sobre a percentagem de ligação às proteínas plasmáticas humanas. Por outro lado, são ainda escassos os dados sobre a distribuição da MDMA nos tecidos humanos. É bem conhecido o facto das fenilisopropilaminas se distribuirem largamente por todos os tecidos, passando facilmente a barreira hematoencefálica (Rohrig and Prouty, 1992). É, no entanto, importante salientar que relativamente à MDMA os estudos realizados até ao momento permitiram encontrar concentrações de MDMA em alguns órgãos ou tecidos, em particular no fígado, cérebro e pulmões, que chegam a ser cerca de 18 vezes superiores às plasmáticas (Chu *et al.*, 1996; García-Repetto *et al.*, 2003). Num caso descrito na literatura de intoxicação fatal, as concentrações de MDMA encontradas no sangue (coração), sangue (femoral), fígado e cérebro foram de 10,9, 2,8, 20,2 e 13,7 mg/L, respectivamente (Rohrig and Prouty, 1992). Num outro caso fatal ocorrido após ingestão de vários comprimidos de "ecstasy" os níveis de MDMA encontrados no fígado, rim e cérebro foram, respectivamente, 13,23, 9,81 e 12,97 mg/kg e no sangue foi de 0,18 mg/L (Fineschi and Masti, 1996).

Metabolismo e Excreção

Os primeiros estudos do metabolismo *in vivo* e *in vitro* da MDMA foram realizados no rato por Lim e Foltz, em 1988. Estes e outros estudos realizados posteriormente em animais (Lim and Foltz, 1988; Lim *et al.*, 1992) e no Homem (Lim and Foltz, 1989; Ensslin *et al.*, 1996; Helmlin *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 2000) permitiram identificar as principais etapas envolvidas no metabolismo da MDMA: O-desmetilenação, N-desmetilação, desaminação e conjugação (O-metilação, glucuronidação e sulfatação). As diferenças encontradas entre as espécies estudadas até ao momento são de ordem quantitativa.

As várias vias e enzimas envolvidas no metabolismo da MDMA no Homem são apresentadas na Figura 4. A MDMA sofre N-desmetilação com formação da MDA, sendo esta etapa catalisada predominantemente pela *CYP*2B6 no Homem, com contribuições da *CYP*2D6, *CYP*1A2 e *CYP*3A4, e pela *CYP*1A2 e *CYP*2D1 (em menor extensão) no rato (Kreth *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2000). A MDMA e a MDA sofrem O-desmetilenação, a qual por acção do sistema enzimático citocromo P450 promove a quebra do anel metilenodioxol, com formação dos catecóis N-metil-α-metildopamina (N-Me-α-MeDA; 3,4-diidroximetanfetamina) e α-metildopamina (α-MeDA; 3,4-diidroxianfetamina), respectivamente. Esta é a principal via metabólica no rato e no Homem (Maurer *et al.*, 2000). A etapa da desmetilenação da MDMA pode ser catalisada pelas isoenzimas *CYP*2D6 (elevada afinidade para concentrações baixas de substracto), *CYP*1A2 (elevada afinidade para concentrações elevadas de substracto), *CYP*2B6 e *CYP*3A4 no Homem e pela *CYP*2D1 e *CYP*3A2 no rato (Kreth *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2000). A desmetilenação da MDMA pode igualmente ser mediada por mecanismos independentes do citocromo P450, nomeadamente pelo radical hidroxilo (Kumagai *et al.*, 1991). A N-Me-α-MeDA e a α-MeDA são posteriormente O-metiladas pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) com formação predominante de 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) e de 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA), respectivamente. Estes 4 metabolitos, e em particular a HMMA e a HMA, são excretadas na urina na forma de conjugados com o ácido glucurónico ou com o ião sulfato (Lim and Foltz, 1988; Helmlin *et al.*, 1996).

Estudos *in vitro* realizados em preparações de microssomas de fígado humano e de rato revelaram que a N-Me-α-MeDA é um metabolito maioritário da MDMA (Hiramatsu *et al.*, 1990; Tucker *et al.*, 1994). Hiramatsu e colaboradores (1990) usando microssomas de fígado de rato demonstraram que a N-Me-α-MeDA é capaz de formar um conjugado com a glutationa (GSH). Apesar dos conjugados da N-Me-α-MeDA e α-MeDA (catecóis) com a GSH ou outros tióis não terem sido ainda identificados *in vivo*, não podemos excluir a hipótese da sua formação.

Recentemente, Segura e colaboradores (2001) demonstraram que no Homem a N-Me-α-MeDA e a HMMA (metabolito O-metilado da N-Me-α-MeDA) são metabolitos maioritários da MDMA *in vivo*. Neste estudo, as concentrações plasmática e urinária da N-Me-α-MeDA (na forma conjugada) foram similares às obtidas para a MDMA e as da HMMA (na forma conjugada) foram cerca de 2 vezes superiores às da MDMA. Por outro

lado, a MDA e a HMA (metabolito O-metilado da α-MeDA) foram identificados como metabolitos minoritários (Lim and Foltz, 1989; Helmlin *et al.*, 1996; Ortuño *et al.*, 1999; De la Torre *et al.*, 2000a), sugerindo que a desmetilenação é uma via maioritária do metabolismo da MDMA *in vivo*.

Paralelamente, os metabolitos N-desmetilados da MDMA podem sofrer desaminação com formação de fenilacetonas, que são, em seguida, oxidadas originando os respectivos ácidos benzóicos (Fig. 4). Estes são excretados na urina após conjugação com a glicina e formação dos respectivos hipuratos (Lim and Foltz, 1988; Maurer *et al.*, 2000).

Por fim, uma outra via de metabolização da MDMA identificada no rato é a hidroxilação aromática com formação da 6-hidroxi-MDMA e da 6-hidroxi-MDA, que após desmetilenação originam a 2,4,5-triidroximetanfetamina (THMA) e a 2,4,5-triidroxi-anfetamina (THA), respectivamente (Lim and Foltz, 1991a e b; Zhao *et al.*, 1992).

É importante salientar a existência de diferentes fenótipos para a *CYP*2D6. Esta enzima integra a superfamília de enzimas do sistema enzimático citocromo P450 e é a principal enzima envolvida na desmetilenação da MDMA (Tucker *et al.*, 1994). A actividade metabólica da *CYP*2D6 está diminuída em cerca de 7 a 10% da população caucasiana (Cascorbi, 2003). Estes indivíduos poderão ser mais susceptíveis aos efeitos agudos da MDMA, uma vez que esta não sofre metabolização, mas, em contrapartida, menos vulneráveis aos seus efeitos por administração repetida (por exemplo, neurotóxicos), uma vez que a produção de metabolitos tóxicos está diminuída (Kreth *et al.*, 2000). Este facto poderá explicar as diferenças observadas na susceptibilidade aos efeitos tóxicos da MDMA em diferentes indivíduos. No entanto, é importante referir que outras isoenzimas além da *CYP*2D6 podem catalisar a desmetilenação da MDMA, o que torna a predição da toxicidade, com base nas características metabólicas individuais, praticamente impossível (Kraemer and Maurer, 2002).

A MDMA é excretada essencialmente por via urinária, embora também tenha sido detectada em amostras de bílis, suor, saliva, humor vítreo e cabelo (Kintz and Samyn, 1999). Cerca de 65% da dose ingerida de MDMA é eliminada intacta pelos rins (Verebey *et al.*, 1988; Lapostolle *et al.*, 1997). A maior parte da dose ingerida é excretada nas primeiras 24 horas (Lapostolle *et al.*, 1997; Fallon *et al.*, 1999). Os metabolitos resultantes da desmetilenação são excretados predominantemente na forma de glucuronatos ou sulfatos. A HMMA (na forma conjugada) é o metabolito predominante na urina de rato e do Homem. A N-Me-α-MeDA (na forma conjugada) é também um metabolito maioritário, enquanto

que a MDA e a HMA são metabolitos minoritários (Helmlin *et al.*, 1996; Ortuño *et al.*, 1999; De la Torre *et al.*, 2000a; Segura *et al.*, 2001). De la Torre e colaboradores (2000a) observaram que a excreção urinária da N-Me-α-MeDA era constante independentemente da dose administrada, enquanto que para a MDMA era dose-dependente, o que sugere uma possível saturação ou inibição do metabolismo da MDMA (etapa da desmetilenação). A eliminação da MDMA do organismo é moderadamente lenta, sendo o tempo de semi-vida de cerca de 6 a 7 horas (Ramcharan *et al.*, 1998).

Por fim, é importante referir que a disposição da MDMA em ratos (Lim and Foltz, 1993; Meyer *et al.*, 2002) e no Homem (Moore *et al.*, 1996; Fallon *et al.*, 1999) é estereoselectiva. Nestes estudos verificou-se que o isómero farmacologicamente mais activo S-(+)-MDMA é metabolizado e eliminado mais rapidamente que o isómero R-(-)-MDMA. A concentração do isómero R-(-)-MDMA foi superior à do isómero S-(+)-MDMA em todos os tecidos e fluidos analisados. Por outro lado, os isómeros da MDMA diferem na velocidade com que são convertidos nos seus metabolitos. De facto, verificou-se que as concentrações plasmáticas e urinárias dos metabolitos S-(+)-MDA e S-(+)-HMMA são superiores às dos isómeros R-(-)-MDA e R-(-)-HMMA (Meyer *et al.*, 2002).

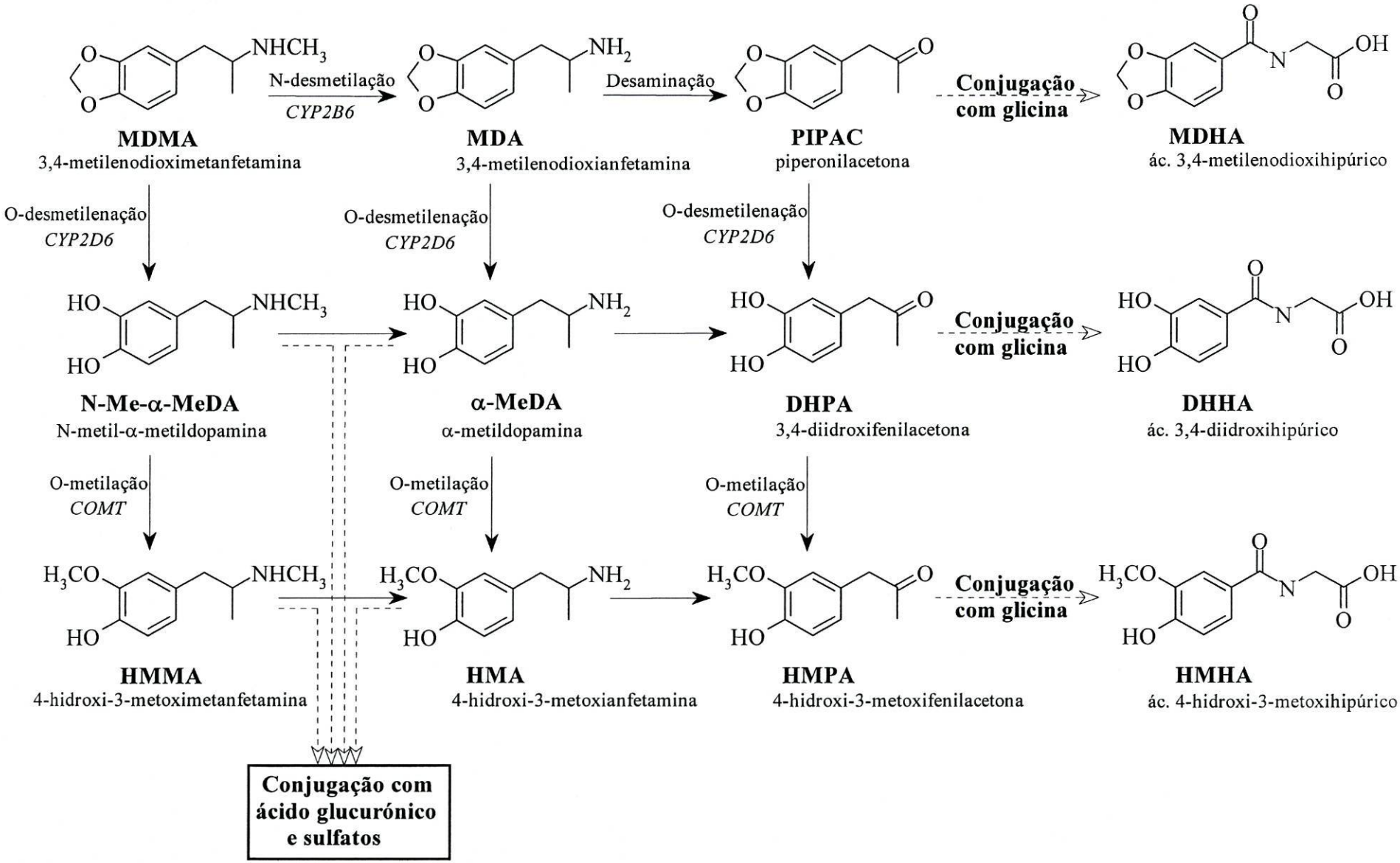


Figura 4. Metabolismo da MDMA no Homem (adaptado de Helmlin *et al.*, 1996 e Maurer *et al.*, 2000)

6. EFEITOS TÓXICOS

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

Uma vez que esta droga é sintetizada ilegalmente, a dose e a pureza podem variar consideravelmente, mas geralmente cada comprimido contém pelo menos 50 a 150 mg de MDMA (Green *et al.*, 2003). A dose tóxica de MDMA para o Homem é variável. É conhecido o caso de um indivíduo que após a ingestão 150 mg de MDMA, com uma concentração plasmática de 0,424 mg/L, desenvolveu hipertermia grave e morte, enquanto que num outro caso a ingestão de 42 comprimidos, com uma concentração plasmática de 7,72 mg/L, foi assintomática (Henry *et al.*, 1992). É de salientar que o nível plasmático encontrado em alguns indivíduos intoxicados com MDMA é próximo e, em muitos casos, excede o correspondente à dose DL_{50} para primatas não humanos (Rochester and Kirchner, 1999).

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

6.1. Toxicidade no Sistema Nervoso Central

Degeneração neuronal

O potencial neurotóxico da MDMA, e das anfetaminas em geral, tem sido alvo de estudo intenso nas últimas duas décadas. Este efeito tóxico parece ser comum a todos os compostos de estrutura anfetamínica, embora o perfil neurotóxico não seja idêntico. A MDMA quando usada em doses moderadas é selectiva para os neurónios serotoninérgicos,

enquanto que a metanfetamina é neurotóxica para ambos os neurónios dopaminérgicos e serotoninérgicos e a *d*-anfetamina moderadamente selectiva para os neurónios dopaminérgicos (Battaglia *et al.*, 1988a; Axt *et al.*, 1994; Ricaurte *et al.*, 1994). Os efeitos neurotóxicos da MDMA aparecem entre as 24 horas e uma semana após a sua administração (Schmidt, 1987). A toxicidade da MDMA é condicionada pela dose, via de administração e pelo regime de tratamento aplicado (Battaglia *et al.*, 1988a; Ricaurte *et al.*, 1988; McKenna and Peroutka, 1990; O´Shea *et al.*, 1998; Reneman *et al.*, 2001). Também a idade (Broening *et al.*, 1995; Broening *et al.*, 2001), o sexo (Liechti *et al.*, 2001; Reneman *et al.*, 2001) e a espécie (Stone *et al.*, 1987; McKenna and Peroutka, 1990) podem afectar as manifestações neurotóxicas da MDMA.

A administração em animais de experiência de uma dose única elevada (20 mg/kg) ou de múltiplas doses baixas de MDMA induz a depleção a longo-termo de marcadores neuronais serotoninérgicos, nomeadamente dos níveis de serotonina e da actividade da triptofano hidroxilase, que é a enzima limitante da síntese de serotonina, e perda dos locais de captação da serotonina (Commins *et al.*, 1987b; Battaglia *et al.*, 1988b; McKenna and Peroutka, 1990; Hewitt and Green, 1994; Ricaurte *et al.*, 2000b). Estes dados, juntamente com as evidências histológicas encontradas de degeneração dos terminais nervosos serotoninérgicos (Commins *et al.*, 1987b; O´Hearn *et al.*, 1988; Molliver *et al.*, 1990), permitiram concluir que a MDMA possui uma acção neurotóxica a nível do sistema serotoninérgico. Os efeitos tóxicos da MDMA a nível do sistema serotoninérgico têm sido extensivamente estudados em várias espécies animais, incluindo ratos (Commins *et al.*, 1987b; Malpass *et al.*, 1999; O´Loinsigh *et al.*, 2001), cobaios (Battaglia *et al.*, 1987), cães (Frith *et al.*, 1987; Nishisawa *et al.*, 1999) e primatas não humanos (Insel *et al.*, 1989; Ricaurte and McCann, 1992; Frederick *et al.*, 1995; Hatzidimitriou *et al.*, 1999). No entanto, os estudos realizados no ratinho demonstraram que a MDMA afecta essencialmente o sistema nigroestriado dopaminérgico (Stone *et al.*, 1987; Cadet *et al.*, 1995; Cadet *et al.*, 2001). Por outro lado, os efeitos neurotóxicos da MDMA nos primatas são mais pronunciados que em ratos. De facto, a depleção de 5-HT e a perda dos locais de captação de 5-HT no córtex cerebral do macaco ocorre após a administração de uma dose 10 vezes inferior à necessária para produzir neurotoxicidade em ratos (Ricaurte and McCann, 1992). A degeneração dos neurónios serotoninérgicos em primatas não humanos é ainda observável 7 anos após a administração de uma dose de 5 mg/kg de MDMA, duas vezes por dia, durante 4 dias consecutivos (Fig. 5) (Hatzidimitriou *et al.*, 1999). Pelo

contrário, os estudos bioquímicos realizados no rato revelaram a recuperação dos níveis de 5-HT e do número de locais de captação de 5-HT 4 a 12 meses após a administração de MDMA (Battaglia *et al.*, 1988b; Sabol *et al.*, 1996). Estes resultados são relevantes dado que o primata é o modelo animal cujo metabolismo mais se assemelha ao do Homem. Além disso, a dose neurotóxica de MDMA usada nos ensaios (5 mg/kg) é muito próxima da dose normalmente consumida para fins recreacionais, quando ajustada para considerar as diferenças inter-espécies (Ricaurte *et al.*, 2000b; Green *et al.*, 2003).

Apesar dos efeitos neurotóxicos da MDMA estarem bem descritos em animais de experiência, os estudos realizados para avaliação da degeneração neuronal no Homem são ainda escassos e controversos (ver Kish, 2002). Técnicas inovadoras na área da neuroimagiologia, nomeadamente a tomografia de emissão de positrões (PET) e a tomografia computorizada de emissão simples de fotões (SPECT), permitiram verificar a diminuição do número de transportadores serotoninérgicos ligados a um marcador específico em indivíduos consumidores crónicos de "ecstasy" (McCann *et al.*, 1998; Semple *et al.*, 1999; Ricaurte *et al.*, 2000a; Reneman, 2003). Kish e colaboradores (2000) verificaram num estudo *post mortem* de uma vítima do consumo de "ecstasy" uma redução severa dos níveis de serotonina (cerca de 50 a 80%). Estes resultados em conjunto com os obtidos em estudos prévios, nos quais se observou uma diminuição no líquido cefalorraquidiano de consumidores de MDMA da concentração de ácido 5-hidroxiindoleacético (metabolito da 5-HT) (McCann *et al.*, 1994; Bolla *et al.*, 1998; McCann *et al.*, 1999), constituem os primeiros indiciadores da neurotoxicidade da MDMA em humanos. É ainda importante salientar que muitas das alterações funcionais observadas em consumidores de "ecstasy", nomeadamente pertubações de memória, aumento da ansiedade e impulsividade, deficiência na aprendizagem e distúrbios do sono (ver "manifestações neuropsiquiátricas"), podem estar relacionadas com danos nos neurónios serotoninérgicos (McCann *et al.*, 2000; Morgan, 2000; Reneman *et al.*, 2000; Parrott, 2001; Kish, 2002).

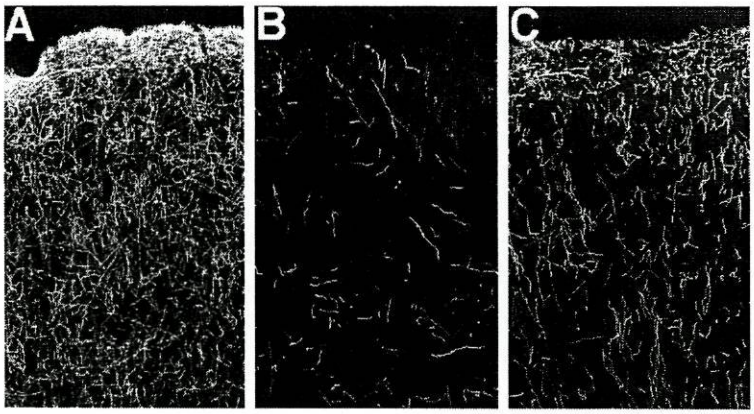


Figura 5. Neurónios serotoninérgicos do córtex cerebral de macaco **(A)** controlo, **(B)** 2 semanas após a administração de MDMA e **(C)** 7 anos após a administração de MDMA (5 mg/kg, 2 vezes por dia, durante 4 dias consecutivos). É evidente a redução na densidade dos axónios 2 semanas após exposição à MDMA e que persiste mesmo 7 anos após a exposição à MDMA. Reproduzido de Hatzidimitriou G., McCann U.D., and Ricaurte G.S., *The Journal of Neuroscience* 19:5096–5107. *Copyright* (1999) *with kind permission from Society for Neuroscience.*

Mecanismos envolvidos na neurotoxicidade da MDMA

Embora os efeitos nefastos da MDMA a nível do sistema serotoninérgico estejam bem definidos, os mecanismos responsáveis pela sua neurotoxicidade ainda não estão completamente esclarecidos. Em seguida, serão referidas algumas das teorias que têm sido propostas pelos diversos autores para explicar os efeitos neurotóxicos da MDMA (McKenna and Peroutka, 1990; Sprague *et al.*, 1998; Lyles and Cadet, 2003).

- Formação de um metabolito tóxico da dopamina

Nash e Brodkin (1991) constataram a existência de uma relação linear entre a libertação de dopamina após a administração de MDMA e a extensão da depleção a longo-termo dos marcadores neuronais serotoninérgicos. A depleção de dopamina por pré-tratamento com α-metil-*p*-tirosina (inibidor da tirosina hidroxilase) ou a destruição selectiva dos neurónios nigroestriados dopaminérgicos pela 6-hidroxidopamina atenuam a depleção a longo-termo dos níveis cerebrais de 5-HT e a subsequente degeneração serotoninérgica decorrente da administração de MDMA (Stone *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1990c; Brodkin *et al.*, 1993). Também a administração de antagonistas dos receptores 5-HT_{2A} previne a estimulação da síntese de dopamina induzida pela MDMA e a depleção a longo-termo dos níveis de 5-HT cerebrais (Nash *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1990a; Schmidt *et al.*, 1991). Por outro lado, a administração concomitante de MDMA e agonistas

dos receptores 5-HT_{2A} potenciou o efluxo de dopamina induzido pela MDMA e o efeito tóxico nos neurónios serotoninérgicos (Gudelsky *et al.*, 1994; White *et al.*, 1996).

A libertação de 5-HT induzida pela MDMA leva à activação dos receptores 5-$HT_{2A/2C}$ localizados nos neurónios GABAérgicos e, consequentemente, à diminuição dos níveis extracelulares de GABA com aumento dos níveis de dopamina (Yamamoto *et al.*, 1995). O mecanismo proposto por Sprague e colaboradores (1998) para a degeneração dos neurónios serotoninérgicos induzida pela MDMA envolve a captação da dopamina em excesso no espaço sináptico para o interior dos neurónios depletados em 5-HT. Os processos oxidativos no interior do terminal nervoso podem levar à formação de espécies reactivas com potencial citotóxico (Fig. 6) (Sprague and Nichols, 1995; Gudelsky and Nash, 1996; Huether *et al.*, 1997).

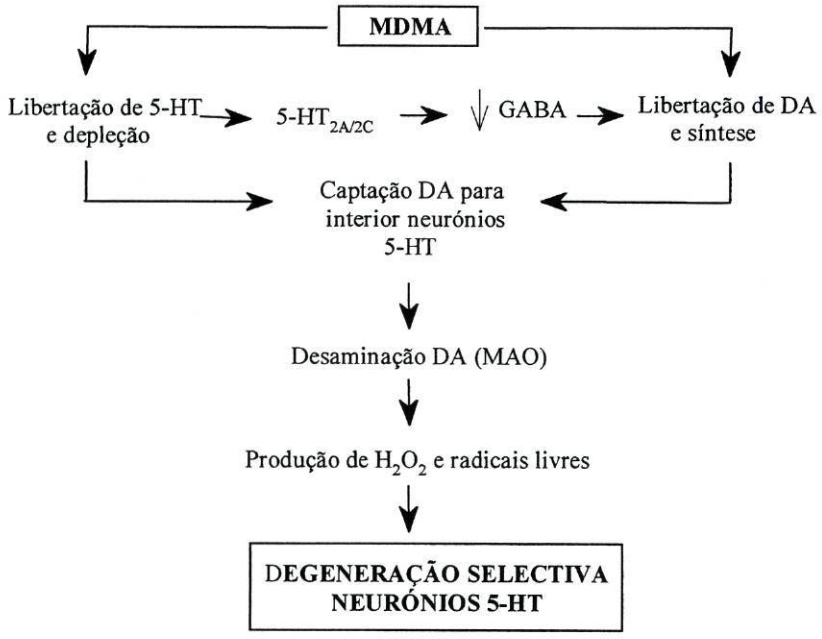


Figura 6. Mecanismo proposto para a degeneração dos neurónios serotoninérgicos pela MDMA (adaptado de Sprague *et al.*, 1998)

A desaminação oxidativa da dopamina pela monoamina oxidase B (MAO-B) localizada nos terminais nervosos serotoninérgicos leva à formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Fig. 7) (Sprague and Nichols, 1995; Sprague *et al.*, 1998; Hrometz *et al.*, 2004). O H_2O_2 é susceptível de originar radicais hidroxilo ($HO^{\cdot}$) altamente reactivos via

reacção de Fenton (Wink *et al.*, 1994). Assim, as elevadas quantidades de dopamina presentes no interior dos neurónios podem originar espécies reactivas suficientes para provocar o esgotamento dos mecanismos de defesa endógenos (antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos). Nestas condições, a dopamina é auto-oxidada, com formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), como H_2O_2, radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e $HO^{\cdot}$, e de quinonas e semi-quinonas altamente reactivas (Fig. 8). O $O_2^{\cdot -}$ pode ainda reagir com o monóxido de azoto (NO) levando à formação de espécies reactivas de azoto (RNS), nomeadamente o anião peroxinitrito ($ONOO^-$) com elevado potencial neurotóxico (Cadet and Brannock, 1998). Os radicais livres podem danificar componentes celulares como os lípidos, proteínas e DNA (Hastings *et al.*, 1996) e as quinonas podem reagir covalentemente com os locais nucleofílicos intracelulares (Tse *et al.*, 1976; Hastings *et al.*, 1996), formando tioéteres potencialmente citotóxicos (Monks and Lau, 1997). As semi-quinonas podem entrar num ciclo redox e ser re-oxidadas a quinonas, na presença de oxigénio molecular, contribuindo para a formação de quantidades acrescidas de anião superóxido e indução de stresse oxidativo (Baez and Segura-Aguilar, 1994; Schweigert *et al.*, 2001). As quinonas formadas podem ainda sofrer ciclização intramolecular (por ataque nucleofílico do grupo amina da cadeia lateral ao carbono 6 do anel) com formação de aminocromos extremamente reactivos (Fig. 8) (Smythies and Galzigna, 1998). Recentemente, Arriagada e colaboradores (2000) demonstraram que os aminocromos são tóxicos em culturas celulares de neurónios de ratinho.

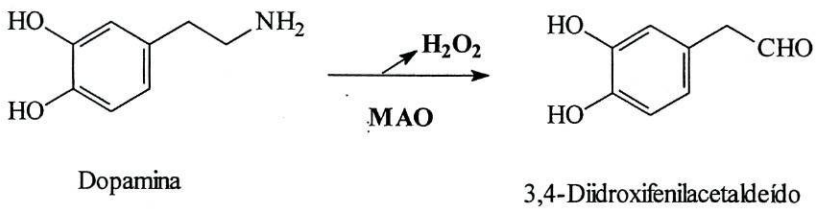


Figura 7. Desaminação oxidativa da dopamina pela monoamina oxidase (MAO)

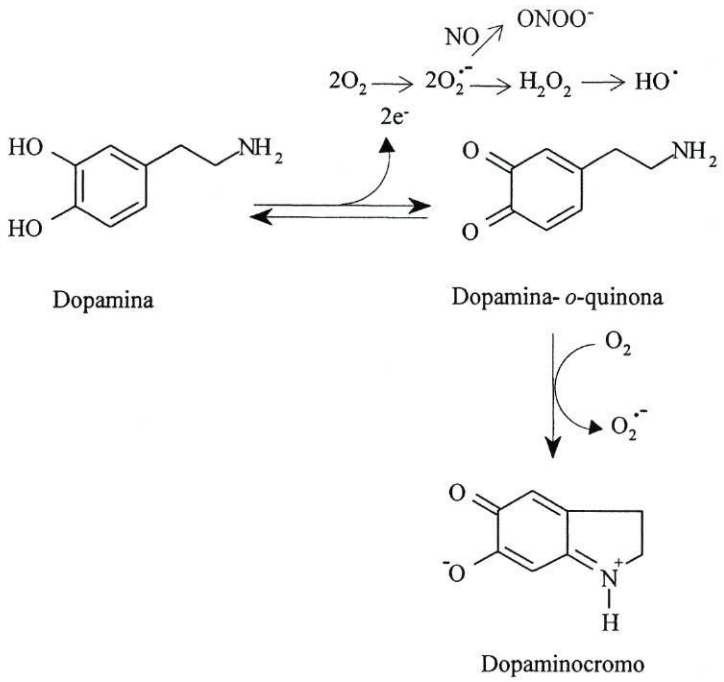


Figura 8. Mecanismo de degradação oxidativa da dopamina (adaptado de Rupp *et al.*, 1994 e Dhalla *et al.*, 1996)

Este mecanismo é suportado pelas evidências de stresse oxidativo e lesões mediadas por ROS (Stone *et al.*, 1988; Colado *et al.*, 1997b; Colado *et al.*, 1999c; Shankaran *et al.*, 1999a) e pelo efeito protector de antioxidantes e sequestradores de radicais livres (Colado and Green, 1995; Gudelsky, 1996). Cadet e colaboradores (1994) e mais recentemente Jahanthi e colaboradores (1999) verificaram que ratinhos transgénicos capazes de expressar a enzima CuZn-superóxido dismutase (CuZnSOD) humana são mais resistentes aos efeitos neurotóxicos da MDMA. Esta enzima intracelular humana constitui a primeira linha de defesa contra o radical superóxido. Sprague e Nichols (1995) verificaram que a administração de inibidores da MAO-B (*l*-deprenil) em ratos preveniu a peroxidação lipídica e a depleção a longo-termo de 5-HT induzida pela MDMA. Por outro lado, a administração de antioxidantes, nomeadamente a cisteína e o ácido ascórbico, ou de um sequestrador de radicais livres, como a α-fenil-N-*terc*-butilnitrona, atenua a neurotoxicidade induzida pela MDMA (Colado and Green, 1995; Gudelsky, 1996; Yeh, 1999; Shankaran *et al.*, 2001). Em adição, vários autores evidenciaram a formação *in vivo* de radicais hidroxilo após a administração intracerebroventricular de MDMA (Colado *et*

al., 1997b; Colado *et al.*, 1999b; Shankaran *et al.*, 1999a; Shankaran *et al.*, 1999b). Por fim, verificou-se que a MDMA reduz os níveis de ácido ascórbico e vitamina E no cérebro de rato (Shankaran *et al.*, 2001).

No entanto, estudos mais recentes contrariam a hipótese de que a dopamina esteja envolvida no mecanismo de neurotoxicidade da MDMA (Yuan *et al.*, 2001 e 2002). Yuan e colaboradores (2002) demonstraram que o tratamento com a reserpina não protege os neurónios serotoninérgicos da acção da MDMA se a temperatura corporal for mantida elevada.

- Formação de um metabolito tóxico da MDMA

Foi então proposto que a danificação oxidativa induzida pela MDMA possa resultar da formação de catecóis e quinonas reactivas por oxidação da própria molécula de MDMA e/ou do seu metabolito MDA (Tucker *et al.*, 1994; Colado *et al.*, 1995; Gudelsky and Nash, 1996; Monks and Lau, 1998).

A MDMA e a MDA quando injectadas intracerebroventricularmente não são neurotóxicas (Molliver *et al.*, 1986; Schmidt and Taylor, 1988), o que sugere que o metabolismo sistémico possa ter um papel determinante no desenvolvimento da neurotoxicidade. Como já referido, a MDMA e a MDA são metabolizadas a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA, respectivamente (Fig. 9). Estes metabolitos possuem um grupo catecol na sua estrutura e podem ser rapidamente oxidados a *o*-quinonas. Foi já demonstrado que estas quinonas reagem rapidamente com grupos tióis intracelulares (Hiramatsu *et al.*, 1990; Patel *et al.*, 1991). Os catecóis e as quinonas podem igualmente sofrer oxidação, na presença de oxigénio molecular, com formação de ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $HO^{\cdot}$), podendo resultar em peroxidação lipídica e degeneração neuronal.

Da mesma forma, a α-MeDA, a HMA (metabolito O-metilado da α-MeDA) e a N-Me-α-MeDA quando administradas directamente no cérebro não induzem toxicidade a longo-termo nos neurónios serotoninérgicos (McCann and Ricaurte, 1991; Steele *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1992). Outros dois metabolitos da MDMA, a THA e a THMA, demonstraram ser neurotóxicos quer para os neurónios serotoninérgicos quer para os neurónios dopaminérgicos (Elayan *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1992), o que revela que não exibem a neuroselectividade da MDMA.

Os trabalhos realizados nos últimos anos por Monks e colaboradores sugerem que os tioéteres formados por adição da glutationa são intervenientes importantes nos efeitos

neurotóxicos da MDMA (Monks and Lau, 1997; Bai *et al.*, 2001). De facto, sabe-se que estes compostos não são desprovidos de reactividade e por vezes esta reactividade é aumentada após conjugação com a GSH ou a cisteína. Os conjugados polifenólicos com a GSH podem ainda ser oxidados com formação de quinonas-tioéteres que dada a sua reactividade podem ligar-se a uma nova molécula de GSH (Fig. 9). Estes autores verificaram que os 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] quando injectados directamente no cérebro do rato induzem depleção a longo-termo dos níveis de serotonina cerebral mas não alteram as concentrações de dopamina ou noradrenalina (Miller *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 1999).

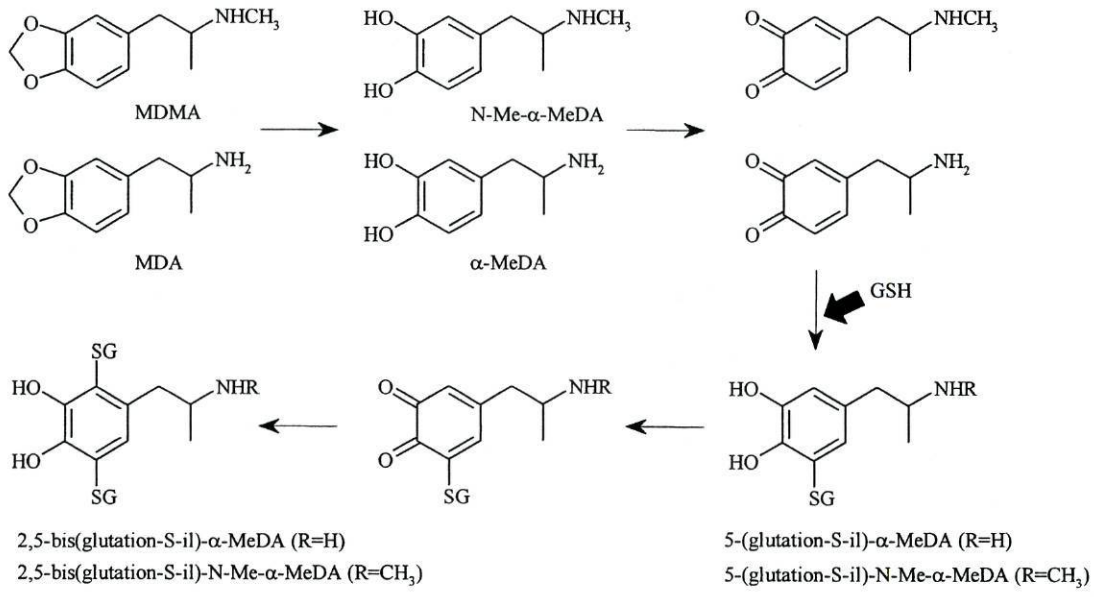


Figura 9. Mecanismo proposto para a formação de metabolitos neurotóxicos a partir da MDMA (adaptado de Bai *et al.*, 2001)

Os tioéteres são compostos hidrofílicos com pouca capacidade para atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE). Monks e Lau (1997) propuseram um mecanismo que permite a passagem do conjugado catecol-GSH através da BHE baseado no seu transporte por intermédio dos transportadores de GSH localizados na membrana endotelial. Uma vez no cérebro, este conjugado sofre acção da γ-glutamiltranspeptidase (γ-GT), presente em concentrações elevadas na membrana endotelial da BHE (Wolff *et al.*, 1992), e de dipeptidases originando o conjugado cisteína-polifenol, o qual é subsequentemente

convertido no conjugado N-acetilcisteína-polifenol potencialmente neurotóxico (Miller *et al.*, 1995; Monks and Lau, 1997). A 5-(N-acetilcistein-S-il)-α-MeDA, ao contrário dos seus precursores 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 5-(cistein-S-il)-α-MeDA, é eliminada muito mais lentamente e é mais tóxica dada a sua impossibilidade de ciclizar internamente (o grupo amina do resíduo cisteinil está bloqueado), o que lhe permite manter a sua actividade redox (Monks and Lau, 1997; Bai *et al.*, 1999). Embora com menor expressão do ponto de vista quantitativo, o conjugado com a cisteína formado no lúmen capilar pode ser transportado através das células endoteliais por intermédio de transportadores específicos para aminoácidos (Monks and Lau, 1997). A corroborar estes estudos verificou-se recentemente que a inibição da γ-GT potencia a depleção de 5-HT e do seu metabolito ácido 5-hidroxiindoleacético induzida pela administração de MDA ou MDMA (Bai *et al.*, 2001). Este efeito deve-se provavelmente à diminuição do metabolismo dos conjugados da α-MeDA ou da N-Me-α-MeDA com a GSH, presentes no lúmen dos capilares cerebrais, o que aumenta a quantidade de conjugados "intactos" capazes de serem transportados através das células endoteliais pelos transportadores de GSH. É importante salientar que os conjugados com a GSH de vários compostos polifenólicos diminuem a actividade da γ-GT (Monks and Lau, 1998), o que provavelmente contribui para um maior transporte destes conjugados para o cérebro.

- Influência da 5-HT ou dos seus metabolitos

Foi igualmente sugerido que a neurotoxicidade da MDMA poderá envolver a 5-HT ou a formação de um metabolito tóxico da 5-HT [por exemplo, a neurotoxina 5,6-diidroxitriptamina (Commins *et al.*, 1987a) ou a triptamina-4,5-diona (Crino *et al.*, 1989)] capaz de ser transportado pelo sistema transportador serotoninérgico. O facto de se ter verificado que os antagonistas dos receptores 5-HT_{2A} atenuam os efeitos neurotóxicos da MDMA sugere que estes receptores possam ter um papel no mecanismo de toxicidade. Kramer e colaboradores (1998) propuseram que a translocação e activação da proteína cínase C (PKC) associada ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio possa contribuir para o mecanismo de neurotoxicidade. Em concordância com um possível papel do cálcio nos efeitos da MDMA, verificou-se que a utilização de um bloqueador dos canais de cálcio (tipo L) protegeu da toxicidade induzida pela MDMA (Farfel *et al.*, 1992). No entanto, é

importante salientar que, como já foi referido anteriormente, os receptores 5-HT_{2A} também medeiam a libertação de dopamina.

Outro mecanismo foi proposto por Poblete e Azmitia (1995). Segundo este mecanismo, a 5-HT libertada por acção da MDMA activa os receptores 5-HT_{2A} e aumenta a actividade da fosforílase do glicogénio, que promove a quebra do glicogénio (principal fonte de energia do cérebro). A depleção das reservas energéticas sinápticas resultante da glicogenólise induzida pela MDMA pode contribuir para a degeneração neuronal (Darvesh *et al.*, 2002).

- Influência da temperatura

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

- Influência do glutamato e do NO

Os aminoácidos excitatórios, nomeadamente o glutamato, têm sido implicados na neurotoxicidade induzida pelas anfetaminas em geral, uma vez que a administração de antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) destes aminoácidos fornece protecção contra os seus efeitos neurotóxicos (Sonsalla *et al.*, 1991; Colado *et al.*, 1993; Hewitt and Green, 1994; Farfel and Seiden, 1995; Battaglia *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2002). O efluxo de dopamina induzido pela anfetamina e metanfetamina estimula a libertação de glutamato (Nash and Yamamoto, 1993; Stephans and Yamamoto, 1994; Del Arco *et al.*, 1999), cuja presença em quantidades excessivas na fenda sináptica leva à morte neuronal. No entanto, ao contrário destas anfetaminas, a MDMA não induz o aumento dos níveis deste aminoácido (Johnson *et al.*, 1989; White *et al.*, 1994). O efeito protector conferido por alguns antagonistas dos receptores NMDA contra a neurotoxicidade da

MDMA parece estar associado à hipotermia induzida por aqueles antagonistas (Farfel and Seiden, 1995; Colado *et al.*, 1998).

A formação de NO parece ter um papel fulcral na mediação dos efeitos neurotóxicos do glutamato. Gunasekar e colaboradores (1995) verificaram que o inibidor da sintetase do NO (NOS), o éster metílico N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), foi capaz de atenuar os efeitos citotóxicos do glutamato *in vitro*. Também Dawson e colaboradores (1996) verificaram uma atenuação da toxicidade exercida por agonistas dos receptores NMDA em culturas de neurónios corticais obtidos de ratinhos com deficiência neuronal de NOS. É geralmente aceite que a estimulação excessiva dos receptores NMDA resulta num influxo de cálcio e na subsequente estimulação da NOS dependente da calmodulina, com formação intracelular de NO (Dawson *et al.*, 1993; Luo and Vincent, 1994). A reacção do NO com o radical superóxido pode levar à formação do anião peroxinitrito ($ONOO^-$) e de vários outros compostos com elevado potencial neurotóxico (Moncada *et al.*, 1991).

A influência do NO na toxicidade induzida pela MDMA foi investigada recentemente em ratos (Taraska and Finnegan, 1997; Zheng and Laverty, 1998). Estes estudos demonstraram que a inibição da NOS protege dos efeitos neurotóxicos da MDMA. No entanto, este resultado parece estar associado à hipotermia induzida pelo inibidor da NOS usado. Por outro lado, Simantov e Tauber (1997) observaram que a citotoxicidade induzida pela MDMA em culturas de células serotoninérgicas humanas é atenuada pela presença de L-NAME. Assim, outros estudos são necessários para clarificar a relevância do NO no mecanismo de neurotoxicidade da MDMA.

Manifestações neuropsiquiátricas

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

As síndromes psiquiátricas associadas ao uso de MDMA incluem manifestações a curto-termo como confusão, ansiedade, insónia, distúrbios do sono (Allen *et al.*, 1993), ataques de pânico (Williamson *et al.*, 1997) e psicoses agudas (Creighton *et al.*, 1991), e manifestações a longo-termo como psicose paranóide crónica (Schifano, 1991), psicose paranóide aguda recorrente (ou "flashback") (Creighton *et al.*, 1991), pertubações de memória (Bolla *et al.*, 1998; Morgan, 1999; Zakzanis and Young, 2001), estados de pânico (McCann and Ricaurte, 1992; Pallanti and Mazzi, 1992) e depressões graves (Schifano *et al.*, 1998) muitas das quais com intenção suicida (Benazzi and Mazzoli, 1991; Cohen, 1996). É de salientar que estes efeitos adversos a longo-termo persistem mesmo após o término do consumo da droga e muitos casos requerem intervenção psiquiátrica com medicação antipsicótica (McCann and Ricaurte, 1994).

Estas síndromes estão frequentemente associadas ao uso repetido, e normalmente em doses elevadas, de MDMA e têm sido atribuídas a disfunções do sistema serotoninérgico (Ricaurte *et al.*, 1994; Huether *et al.*, 1997; Liechti *et al.*, 2000b; Taffe *et al.*, 2001).

6.2. Toxicidade Hepática

O consumo de MDMA como droga recreacional tem sido responsável pelo aparecimento de vários casos de falência hepática aguda em jovens. Os primeiros casos de hepatotoxicidade associada ao consumo de MDMA foram descritos em 1992 por Henry e colaboradores, aos quais se seguiram muitos outros que vieram comprovar esta associação (Jones *et al.*, 1994; Dykhuizen *et al.*, 1995; Coore, 1996; Fidler *et al.*, 1996; Roques *et al.*, 1998; Fineschi *et al.*, 1999; Greene *et al.*, 2003). A lesão hepática induzida pela MDMA abrange desde formas benignas análogas a hepatites víricas (Dykhuizen *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1996; Núñez *et al.*, 2002) a formas severas como falência hepática secundária a necrose hepática maciça (Henry *et al.*, 1992; Coore, 1996; Milroy *et al.*, 1996; Brauer *et al.*, 1997). Na literatura aparecem descritos vários casos de falência hepática fulminante induzida pelo consumo de "ecstasy" que foram fatais ou que necessitaram de transplante hepático (Chenard-Neu *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1996; Brauer *et al.*, 1997; Riordan and Williams, 1999; Ozden *et al.*, 2001; Caballero *et al.*, 2002; Núñez *et al.*, 2002).

Andreu e colaboradores (1998) descreveram 5 casos de hepatite induzida pela MDMA. Todos os pacientes apresentavam doença hepática grave, com icterícia, nível

sérico elevado de transamínases, hipoglicémia e reduzida actividade da protrombina mas sem ocorrência de encefalopatia hepática. A biópsia hepática de todos os pacientes revelou um padrão praticamente constante de necrose hepatocelular presente nas zonas midzonal e centrilobular do ácinus hepático. O tracto portal apresentava edema e infiltrados inflamatórios, com predomínio de eosinófilos em 2 dos casos. Foi também observado, em 3 dos casos, necrose hepatocelular focal e presença de microvesículas lipídicas nas áreas periportais. Este padrão histológico também foi observado em estudos *post mortem* de vítimas do consumo de "ecstasy" (Milroy *et al.*, 1996; Fineschi *et al.*, 1999).

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

Mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade da MDMA

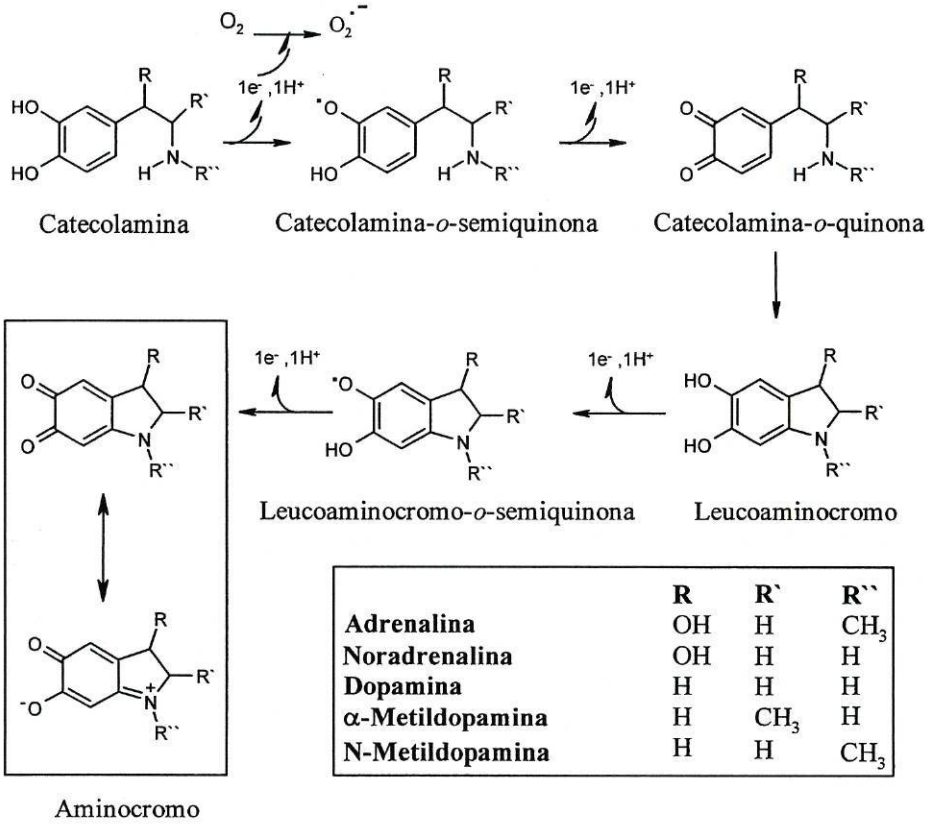
Os mecanismos envolvidos na lesão hepática induzida pela MDMA e anfetaminas em geral não estão ainda completamente esclarecidos. Alguns investigadores consideram que este efeito tóxico possa resultar de uma reacção idiossincrásica, dada a existência de vários casos em que o seu consumo não provoca lesão hepática (Henry *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 1996). No estudo realizado por Andreu e colaboradores (1998) constatou-se a presença de elevado número de eosinófilos no tracto portal, o que poderá estar relacionado com algum mecanismo de hipersensibilidade. No entanto, vários factores poderão influenciar a hepatotoxicidade da MDMA, nomeadamente o teor de catecolaminas, a oxidação das aminas biogénicas, as variações do fluxo sanguíneo hepático, a hipertermia, além de um possível efeito directo da MDMA e/ou dos seus metabolitos.

- Papel das aminas biogénicas

A activação dos receptores adrenérgicos localizados na artéria hepática pelas aminas biogénicas libertadas por acção da MDMA leva à vasoconstrição da artéria hepática. A hipóxia hepática secundária à vasoconstrição poderá contribuir para a lesão hepática (Losser and Payen, 1996). Por outro lado, é bem sabido que a activação dos receptores α-adrenérgicos localizados nos hepatócitos está relacionada com a depleção de GSH (James *et al.*, 1983; Sies and Graf, 1985), aumento da respiração mitocondrial e da concentração de cálcio intracelular livre (Taylor *et al.*, 1983), que são potencialmente tóxicos para a célula.

Outro mecanismo proposto para explicar a hepatotoxicidade da MDMA é a oxidação das aminas biogénicas libertadas por acção da MDMA. Como já foi referido anteriormente, a presença de níveis elevados de catecolaminas e serotonina pode resultar na saturação das enzimas que participam no seu metabolismo, nomeadamente da MAO e/ou COMT. Em adição, Leonardi e Azmitia (1994) demonstraram a inibição competitiva da MAO-A (preferencialmente) e MAO-B induzida pela MDMA. Nestas condições, as catecolaminas sofrem auto-oxidação com formação de ROS, RNS e de quinonas e aminocromos altamente reactivos.

O processo de oxidação das catecolaminas a aminocromos leva à formação de vários intermediários reactivos (Bindoli *et al.*, 1989). Numa primeira etapa as catecolaminas são oxidadas a *o*-semiquinonas, as quais originam rapidamente *o*-quinonas (Fig. 10). As catecolamina-*o*-quinonas são instáveis e após desprotonação do grupo amina pode ocorrer um ataque nucleofílico do átomo de azoto à posição 6 do anel quinónico, de onde resulta a ciclização 1,4-intramolecular irreversível da molécula. O leucoaminocromo assim formado é oxidado a *o*-semiquinona e esta, por sua vez, a aminocromo.



	R	R`	R``
Adrenalina	OH	H	CH_3
Noradrenalina	OH	H	H
Dopamina	H	H	H
α-Metildopamina	H	CH_3	H
N-Metildopamina	H	H	CH_3

Figura 10. Mecanismo proposto para a oxidação das catecolaminas a aminocromos (adaptado de Bindoli *et al.*, 1989 e Rupp *et al.*, 1994)

A velocidade de ciclização das catecolaminas depende dos seus grupos substituintes (Chavdarian *et al.*, 1978; Rupp *et al.*, 1994). A presença de grupos dadores de electrões (por exemplo, grupos metilo) nos carbonos α e β e sobretudo no átomo de azoto facilita a ciclização. No caso da adrenalina, o processo de ciclização intramolecular predomina, dando origem ao adrenocromo. Para a noradenalina, a ciclização é mais lenta, o que faz com que o ataque da forma quinónica a locais nucleofílicos intracelulares seja mais provável (Chavdarian *et al.*, 1978). Das três catecolaminas, a dopamina é a que apresenta menor tendência para a ciclização da respectiva quinona, fazendo com que a ligação covalente aos locais intracelulares, nomeadamente os grupos SH, OH e NH_2, seja predominante. Ter-se-á assim, em ordem crescente de velocidade de ciclização, a dopamina, a α-MeDA, a noradrenalina, N-MeDA e a adrenalina (Chavdarian *et al.*, 1978).

A auto-oxidação das catecolaminas é favorecida em meio alcalino, mas a pH fisiológico é extremamente lenta (Schweigert *et al.*, 2001). No entanto, em condições fisiológicas, o processo de oxidação das catecolaminas pode ser catalisado por enzimas, tais como a xantina oxidase (Foppoli *et al.*, 1997), lipoxigenase (Rosei *et al.*, 1994), várias catecol-oxidases contendo cobre (Bindoli *et al.*, 1992), pela mieloperoxidase dos leucócitos (Matthews *et al.*, 1985), pela citocromo-*c*-oxidase presente no músculo esquelético (Dhalla *et al.*, 2001), ou na presença de metais tais como cobre, manganês, ferro, cobalto, níquel e de vários quelatos de cobre e ferro (Bindoli *et al.*, 1992).

Um aspecto importante da oxidação das catecolaminas é a possibilidade dos produtos de oxidação das catecolaminas (como as quinonas e aminocromos) poderem entrar em ciclos redox levando à formação de ROS e RNS (Bindoli *et al.*, 1992; Dhalla *et al.*, 2001). O $O_2^{\cdot -}$ resultante da redução do oxigénio molecular, pode posteriormente, por acção da superóxido dismutase (SOD), originar o H_2O_2, o qual, na presença de metais de transição como o ferro e cobre, sofre redução originando o $HO^{\cdot}$ altamente reactivo (Halliwell and Gutteridge, 1999). O $HO^{\cdot}$ é considerado o radical livre mais tóxico para as células, levando à oxidação de componentes celulares, incluindo proteínas, DNA e lípidos. Por outro lado, o radical superóxido pode reagir com o NO levando à formação de RNS, nomeadamente o anião peroxinitrito com elevado potencial tóxico (Cadet and Brannock, 1998). Estas espécies reactivas de oxigénio e de azoto são potencialmente tóxicas via stresse oxidativo e podem catalisar elas próprias a oxidação das catecolaminas (Bindoli *et al.*, 1992).

Os aminocromos são substâncias instáveis de cor avermelhada, que podem sofrer alterações, tais como rearranjos, oxidações e reduções (Bindoli *et al.*, 1992). Os rearranjos intramoleculares dos aminocromos dão origem ao 5,6-diidroxiindole (1; Fig. 11) [5,6-diidroxi-1-metilindole (DHMI) se provier do adrenocromo] ou ao 5,6-diidroxiindoxilo (2; Fig. 11). O primeiro ocorre em aminocromos sem o substituinte hidroxilo na posição 3, ao passo que o segundo, também designado de aminolutina, corresponde a um tautómero dos aminocromos com o substituinte hidroxilo na posição 3. A polimerização destes compostos dá origem a pigmentos escuros insolúveis, de composição ainda não totalmente esclarecida, que são denominados de melaninas (Rupp *et al.*, 1994; Hegedus, 2000; Pattison *et al.*, 2002).

Os aminocromos podem também sofrer reduções, originando novamente os incolores leucoaminocromos (3; Fig. 11) (Bindoli *et al.*, 1992). Estas reacções de redução ocorrem na presença de antioxidantes, tais como ácido ascórbico, glutationa ou cisteína e levam à formação de um intermediário semi-quinónico altamente reactivo. A formação desta semiquinona pode ocorrer também via enzimática pela acção da NADPH-citocromo-b_5-redutase, da NADPH-citocromo-P450-redutase ou da cadeia respiratória na presença de NADH (Baez and Segura-Aguilar, 1994; Segura-Aguilar *et al.*, 1998). Enzimas presentes na superfície externa das membranas, tais como algumas flavoenzimas e a ferricianeto-redutase, são também capazes de reduzir com um electrão as quinonas e os aminocromos (Giulivi and Cadenas, 1998; Arriagada *et al.*, 2000). Adicionalmente, a redução dos aminocromos a leucoaminocromos pode ocorrer pela acção da flavoproteína DT-diaforase (presente no fígado e no cérebro) num processo de transferência simultânea de 2 electrões do NAD(P)H, evitando assim a formação de semiquinonas (Segura-Aguilar and Lind, 1989; Bindoli *et al.*, 1990; Segura-Aguilar *et al.*, 1998). Os leucoaminocromos sem substituinte hidroxilo na posição 3 desidratam espontaneamente a 5,6-diidroxiindole, o qual posteriormente se reduz à nova forma de leucoaminocromo (4; Fig. 11) (Bindoli *et al.*, 1992).

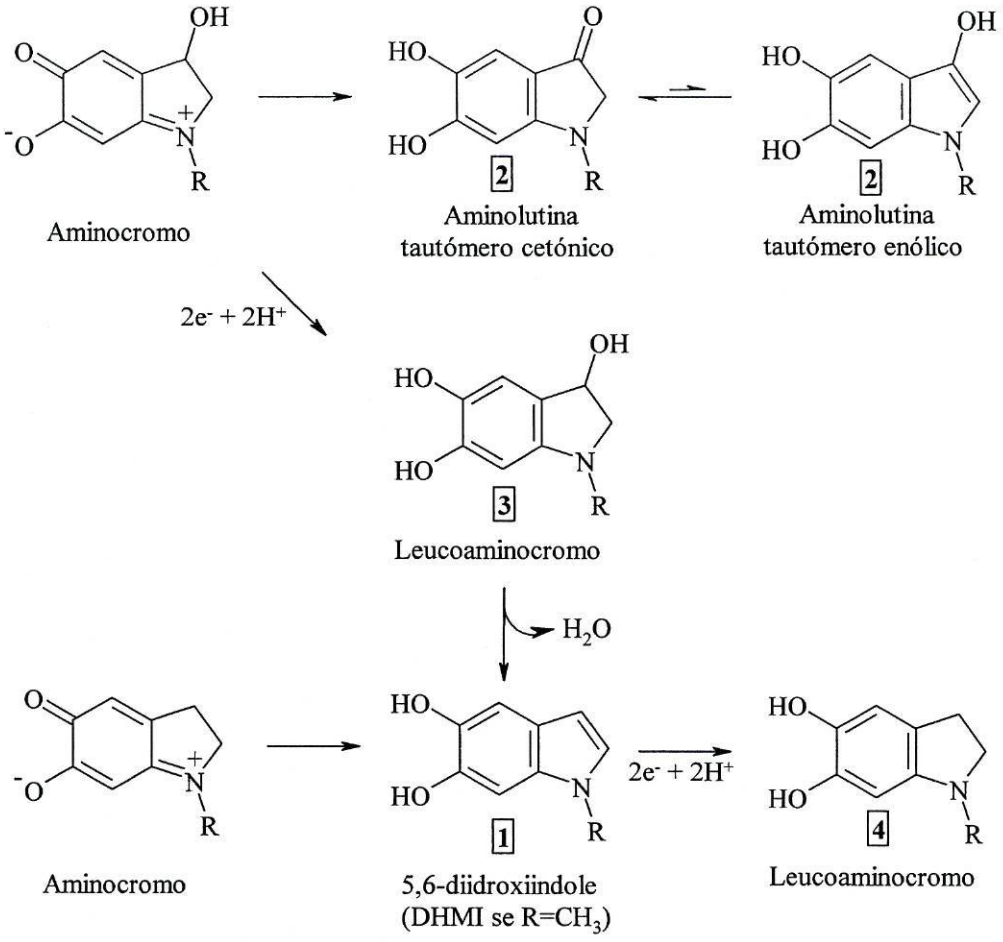


Figura 11. Mecanismos propostos para a reactividade dos aminocromos (adaptado de Palumbo *et al.*, 1989; Bindoli *et al.*, 1992; Rupp *et al.*, 1994)

As *o*-quinonas e os aminocromos são compostos electrofílicos altamente reactivos, podendo reagir com grupos amina e sulfidrilo presentes, por exemplo, em proteínas (Rupp *et al.*, 1994; Terland *et al.*, 1997; Bolton *et al.*, 2000). Podem ainda formar aductos estáveis com a glutationa e a cisteína, os quais expressam toxicidade com frequência (Monks and Lau, 1992; Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 1996; Bolton *et al.*, 2000; Pattison *et al.*, 2002). Estas reacções podem ocorrer por substituição ou por adição (Fig. 12). Num estudo realizado em hepatócitos isolados de rato, Nakagawa e Moldéus (1992) verificaram que vários compostos de natureza quinónica induzem morte celular, precedida da depleção de GSH, grupos tióis proteicos e ATP. A citotoxicidade observada foi prevenida pela administração de GSH e cisteína.

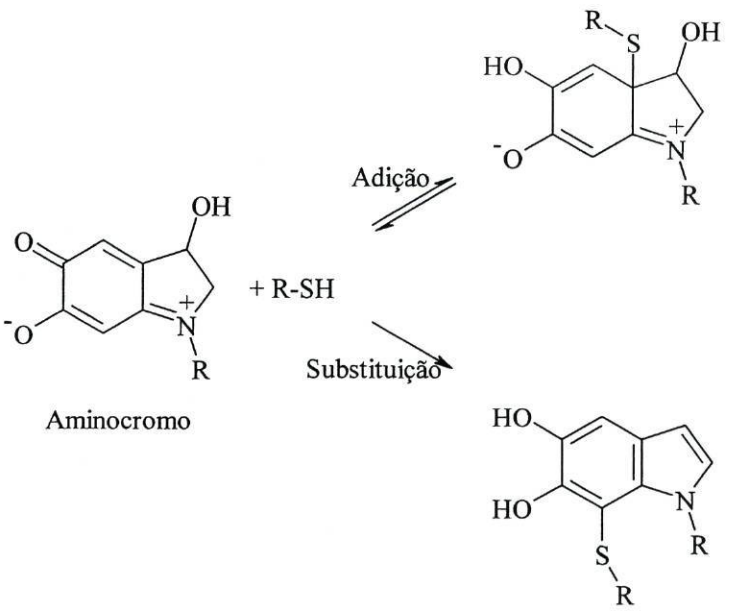


Figura 12. Reacção de substituição e de adição entre aminocromos e tióis (adaptado de Bindoli *et al.*, 1992)

Além dos grupos tióis, as quinonas podem reagir com grupos amina formando bases de Shiff (Fig. 13). Embora as aminas sejam nucleófilos mais fracos que os tióis, a sua alta concentração ao nível biológico pode tornar este processo significativo (Pattison *et al.*, 2002). Estas reacções levam à formação de aductos entre as quinonas e as proteínas, que, no entanto, não impede a continuação do processo oxidativo destas quinonas ligadas, como por exemplo, a ciclização da catecolamina-*o*-quinona em aminocromo (Pattison *et al.*, 2002).

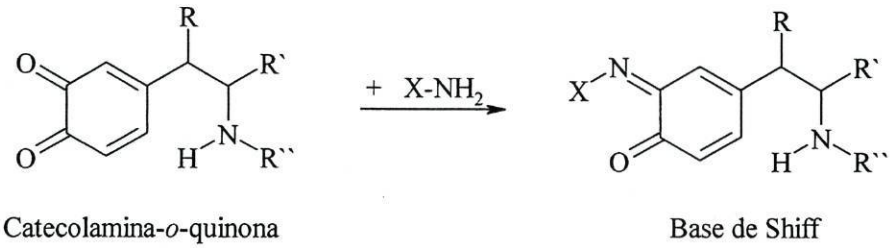


Figura 13. Formação de bases de Shiff a partir das catecolaminas-*o*-quinonas (adaptado de Pattison *et al.*, 2002)

- Metabolismo da MDMA e Polimorfismo da *CYP*2D6

Outro factor importante na indução da lesão hepática parece ser o metabolismo. Foi já demonstrado que a MDMA é metabolizada em microssomas de fígado de rato pelo sistema citocromo P450 a aductos com a glutationa (Fig. 14). O mecanismo da formação do aducto envolve a formação de um catecol, a N-Me-α-MeDA, o qual após oxidação a quinona, reage rapidamente com grupos tióis (Hiramatsu *et al.*, 1990; Monks and Lau, 1992). Paralelamente, a MDMA sofre N-desmetilação com formação da MDA, a qual origina conjugados com a glutationa pelo mesmo processo. A grande capacidade que as quinonas possuem para originar ciclos redox, induzir o stresse oxidativo e formar aductos com macromoléculas biológicas (por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos) pode resultar na destruição de moléculas essenciais para a sobrevivência celular. Assim, a reacção da GSH com as quinonas corresponde muito provavelmente a um mecanismo de defesa, uma vez que as quinonas são compostos oxidantes e electrofílicos (Monks and Lau, 1997). Existem, no entanto, alguns conjugados de polifenóis com a GSH que mantêm a reactividade e, por vezes, esta reactividade é ainda superior à do composto inicial (Monks and Lau, 1992 e 1997). Desta forma, os tioéteres formados pela adição de grupos SH poderão ser intervenientes importantes nos efeitos tóxicos resultantes. De realçar que estes tioéteres podem ainda sofrer oxidação a quinonas, as quais podem reagir com uma nova molécula de GSH.

Num estudo realizado em hepatócitos isolados de rato, Beitia e colaboradores (1999) observaram que a MDMA induz a depleção dos níveis intracelulares de GSH e de ATP. A depleção hepática de GSH foi igualmente observada nos estudos realizados *in vivo* em ratos (Beitia *et al.*, 2000) e, mais recentemente, em ratinhos (Carvalho *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002). A GSH tem um papel crucial nos processos de protecção celular contra espécies reactivas de oxigénio e contra a acção nefasta de vários xenobióticos electrofílicos (DeLeve and Kaplowitz, 1991). Assim, a depleção dos níveis de glutationa hepática poderá constituir um passo inicial para a acção hepatotóxica da MDMA. No entanto, permanece ainda por demonstrar se a depleção de GSH é suficiente para causar morte celular ou se expõe as células a outros efeitos tóxicos que acontecem ao mesmo tempo *in vivo*, como poderá ser o caso da hipertermia.

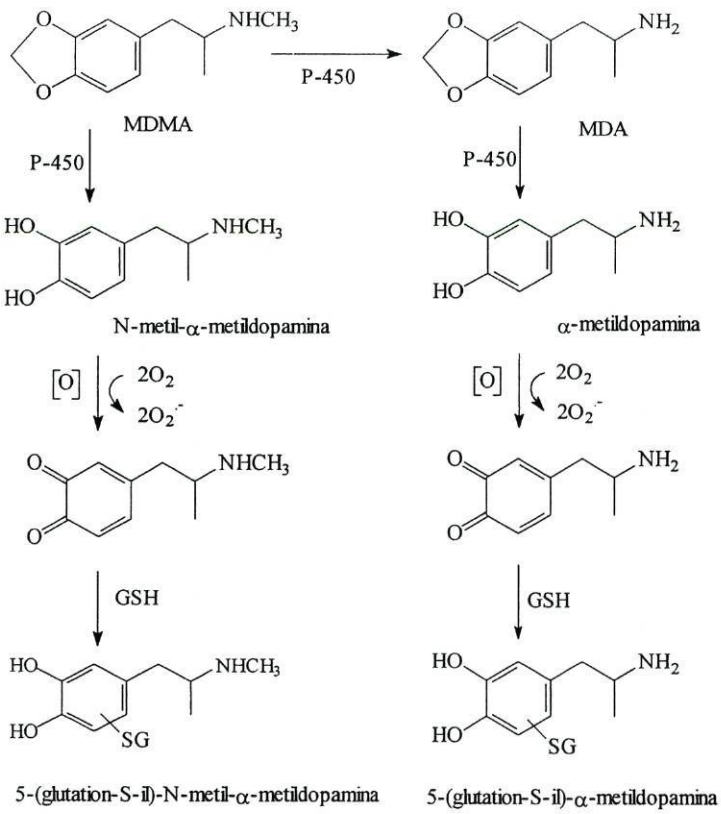


Figura 14. Mecanismo proposto para a formação do aducto da MDMA e do seu metabolito MDA com a glutationa (GSH) (adaptado de Monks and Lau, 1992)

A variabilidade interindividual na susceptibilidade à toxicidade hepática induzida pela MDMA pode ser explicada adicionalmente pela existência de um polimorfismo génico. A actividade metabólica da *CYP*2D6, enzima envolvida na desmetilenação da MDMA (principal via metabólica no Homem), está diminuída em cerca de 7 a 10% da população caucasiana (Tucker *et al.*, 1994). Estes indivíduos podem ser menos susceptíveis aos efeitos crónicos da MDMA (menor formação de metabolitos tóxicos) mas, em contrapartida, mais vulneráveis aos efeitos agudos da MDMA (níveis plasmáticos de MDMA mais elevados) (Malpass *et al.*, 1999).

- Hipertermia

A hipertermia induzida pela MDMA pode ser, pelo menos em parte, responsável pela hepatotoxicidade observada *in vivo*. Os danos hepatocelulares observados na hipertermia (Wills *et al.*, 1976) são semelhantes aos observados em vítimas do consumo de "ecstasy".

Nos estudos realizados por Carvalho e colaboradores (1997) com hepatócitos isolados de rato verificou-se que a elevação da temperatura de incubação de 37°C para 41°C, causou depleção de GSH, aumento de GSSG, peroxidação lipídica e morte celular. Também a perfusão de fígado isolado com soluções hipertérmicas pode induzir stresse oxidativo (Skibba *et al.*, 1991). O ataque oxidativo pode resultar em toxicidade se houver falência dos mecanismos de defesa celular (antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos).

- Indução da apoptose

Os estudos realizados recentemente por Montiel-Duarte e colaboradores (2002 e 2004) demonstraram que a MDMA tem uma acção pró-apoptótica em hepatócitos isolados de rato e em culturas de células Ito. Em ambos os tipos de células, a MDMA induziu uma redução nos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L, a libertação de citocromo *c* e a activação da caspase 3. Verificou-se igualmente que a apoptose induzida pela MDMA em culturas de células Ito foi acompanhada por uma diminuição dos níveis intracelulares de GSH e formação de ROS (Montiel-Duarte *et al.*, 2004). O pré-tratamento com o antioxidante ditiocarbamato de pirrolidina anulou a produção de ROS mas não preveniu a apoptose induzida pela MDMA, o que sugere um mecanismo apoptótico para a MDMA independente do stresse oxidativo. Outra constatação importante deste estudo foi a potenciação da acção apoptótica da MDMA por adição de GSH ou de N-acetilcisteína. Mais ainda, o pré-tratamento das células com quinina (inibidor do citocromo P450 2D6) diminuiu a extensão da apoptose induzida pela MDMA. Estes resultados sugerem que um metabolito da MDMA, possivelmente após conjugação com a GSH, possa contribuir para a apoptose induzida por esta droga. Serão, então, necessários outros estudos para avaliar o potencial apoptótico dos metabolitos da MDMA e relacionar estes resultados com os efeitos hepatotóxicos da MDMA *in vivo*.

Por fim, é importante salientar que muitos comprimidos vendidos como "ecstasy" não possuem apenas MDMA, podendo-se encontrar outros compostos, nomeadamente cafeína, efedrina, anfetamina, dietilamida do ácido lisérgico (LSD), MDA, 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina (MBDB) e 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (2C-B) (Winstock and King, 1996; Baudot *et al.*, 1998; Parrott, 2004). Assim, dado que se trata de uma droga sintetizada clandestinamente, é possível que um contaminante hepatotóxico se possa formar durante o

processo de fabrico ou possa ser adicionado ao produto final (Milroy *et al.*, 1996; Rochester and Kirchner, 1999).

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

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

6.3. Toxicidade no Sistema Cardiovascular

O consumo de "ecstasy" está frequentemente associado ao aparecimento de efeitos cardiovasculares moderados a severos, nomeadamente hipertensão (mais comum) ou hipotensão (García-Repetto *et al.*, 2003), palpitações, taquicardia (Hayner and McKinney, 1986; Henry *et al.*, 1992), arritmias (Dowling *et al.*, 1987; Burgess *et al.*, 2000), cardiomiopatias (Milroy *et al.*, 1996), enfarte do miocárdio (Frishman *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2003) e colapso circulatório (Murthy *et al.*, 1997a; Brody *et al.*, 1998; Vollenweider *et al.*, 1998), podendo a morte ocorrer por insuficiência cardíaca aguda (Dowling *et al.*, 1987; Suarez and Riemersma, 1988; Milroy *et al.*, 1996) ou por acidente vascular cerebral (AVC) (Harries and Silva, 1992). A análise patológica do miocárdio de vítimas do consumo de "ecstasy" revelou necrose miocárdica com miócitos em hipercontractura (Fineschi *et al.*, 1999).

O abuso de "ecstasy" pode levar ao desenvolvimento de AVC do tipo hemorrágico (Gledhill *et al.*, 1993) ou isquémico (Hanyu *et al.*, 1995) em jovens e deve, por isso, ser

investigado em casos de pacientes jovens apresentando quadro de AVC (Heye and Hankey, 1996; Auer *et al.*, 2002). Hanyu e colaboradores (1995) descreveram o caso de um jovem de 28 anos que desenvolveu AVC isquémico após a primeira dose de "ecstasy". A MDMA promove a libertação de serotonina, que é a amina vasoconstritora mais potente na circulação cerebral, especialmente nas artérias de grande e médio calibre. Esta vasoconstrição pode estar na origem de AVC isquémico. Em alguns pacientes com AVCs provocados por diferentes tipos de anfetaminas, a arteriografia cerebral revela vasoespasmo cerebral traduzido imagiologicamente por "colar de contas" (Delaney and Estes, 1980; Cahill *et al.*, 1981; Yen *et al.*, 1994).

Apesar dos vários casos clínicos indicarem uma forte associação entre o consumo de "ecstasy" e a toxicidade cardiovascular, as respostas cardiovasculares à MDMA não foram ainda completamente caracterizadas. A administração de uma dose única de MDMA no Homem aumenta a pressão sistólica e diastólica, o ritmo cardíaco e o consumo de oxigénio pelo miocárdio (Vollenweider *et al.*, 1998; Mas *et al.*, 1999; De la Torre *et al.*, 2000b; Lester *et al.*, 2000). Em ratos, a administração de MDMA induz taquicardias, arritmias e vasoconstrição (Gordon *et al.*, 1991; Fitzgerald and Reid, 1994). Os efeitos arritmogénicos da MDMA foram inibidos com o uso de β-bloqueadores (por exemplo, o propanolol) e de inibidores da captação neuronal (por exemplo, a desipramina) (Fitzgerald and Reid, 1994). Os efeitos pressores da MDMA em ratos parecem envolver a activação dos receptores α-adrenérgicos e serotoninérgicos do tipo 5-HT_2 (McDaid and Docherty, 2001). O'Cain e colaboradores demonstraram recentemente (2000) que a administração aguda de MDMA em ratos (0,01-3 mg/kg, i.v.) aumenta a pressão sanguínea de uma forma dependente da dose e induz bradicardia significativa após a administração da dose mais elevada. Também a administração de doses repetidas de MDMA em ratos induz alterações significativas na função cardiovascular e arritmias cardíacas (Delcarpio *et al.*, 1998; Varner *et al.*, 1998; Badon *et al.*, 2002). A análise patológica do miocárdio destes animais revelou necrose com bandas de contracção, inflamação, infiltração leucocitária, fibrose e alterações ultraestruturais.

Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade da MDMA

Os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade da MDMA não foram ainda completamente estudados. Como já referido, a MDMA promove o aumento dos níveis de catecolaminas e de 5-HT na fenda sináptica e na corrente sanguínea (Fitzgerald and Reid,

1990; Karch, 1993). Um dos mecanismos propostos sugere que a estimulação resultante pode ser responsável pela cardiotoxicidade desta droga. Como já é bem sabido, a presença de concentrações séricas elevadas de catecolaminas pode exercer efeitos cardiotóxicos diversos ao nível dos electrólitos, da estrutura, bioquímica e membrana das células, podendo ocorrer espasmos coronários, arritmias, disfunções contractéis, danos celulares e necrose do miocárdio (Downing and Chen, 1985; Simons and Downing, 1985; Jiang and Downing, 1990; Dhalla *et al.*, 1992; Rupp *et al.*, 1994). Vários estudos realizados em modelos animais (Zalis *et al.*, 1967; Pentel *et al.*, 1987) e no Homem (Smith *et al.*, 1976; O'Neill *et al.*, 1983) suportam a hipótese de que a cardiotoxicidade das anfetaminas seja mediada pelas catecolaminas. Em adição, os estudos patológicos realizados em vítimas do abuso de "ecstasy" revelaram uma cardiotoxicidade com padrão histológico indiferenciável do obtido com catecolaminas (Milroy *et al.*, 1996).

Vários mecanismos de toxicidade das catecolaminas foram propostos, tais como hipóxia, insuficiência coronária e alterações hemodinâmicas e metabólicas. Mais recentemente, tem sido sugerido que o stresse oxidativo, resultante da formação de radicais durante a oxidação das catecolaminas, e os produtos dessa oxidação, tais como as quinonas e aminocromos, poderão ter um papel fundamental na toxicidade das catecolaminas (Dhalla *et al.*, 2001). Em seguida, aborda-se sucintamente os mecanismos envolvidos nos efeitos cardiotóxicos das catecolaminas.

- Hipóxia e alterações hemodinâmicas

As catecolaminas, pela activação dos receptores β-adrenérgicos, aumentam o ritmo cardíaco. Este facto origina um aumento drástico da necessidade miocárdica em oxigénio, o que pode induzir uma situação de hipóxia. Esta situação pode ser agravada pela redução do fornecimento de oxigénio pela vasoconstrição coronariana induzida pelas catecolaminas (Dhalla *et al.*, 2001).

- Efeitos metabólicos

Um outro mecanismo proposto para explicar a cardiotoxicidade das catecolaminas envolve alterações ao nível do consumo de oxigénio, produção energética e metabolismo lipídico.

A administração de catecolaminas aumenta o consumo de oxigénio, o qual só em parte se fica a dever a um aumento da sua utilização em resultado das alterações

hemodinâmicas e da função cardíaca. O restante oxigénio consumido justifica a designação de "desperdício de oxigénio" ("oxygen-wasting"), tendo sido sugerido que possa resultar, pelo menos em parte, do fenómeno de oxidação das catecolaminas (Dhalla *et al.*, 2001).

Um outro aspecto que parece estar envolvido na cardiotoxicidade das catecolaminas é o desacoplamento mitocondrial. Foi já observada uma boa correlação entre o aumento de conteúdo de catecolaminas no miocárdio e a diminuição da razão P/O mitocondrial [razão entre o difosfato de adenosina (ADP) adicionado à mitocôndria e o oxigénio consumido] (ver Dhalla *et al.*, 2001). Esta alteração da razão P/O foi atribuída à formação de aminocromos e outros metabolitos oxidativos. Assim, o desacoplamento mitocondrial pode contribuir para explicar o referido "desperdício de oxigénio" e a depleção das reservas energéticas do miocárdio que se observa por acção das catecolaminas (Behonick *et al.*, 2001).

As catecolaminas induzem também um fenómeno de lipólise, mediado pelos receptores β-adrenérgicos, nomeadamente β_1 e β_2 presentes no tecido adiposo branco e β_3 no tecido adiposo castanho (Webber and Macdonald, 2000). O desacoplamento mitocondrial pode ser, em parte, atribuído a alterações lipídicas originadas pela acção das catecolaminas, embora o aumento de ácidos gordos livres não pareça ser a primeira causa deste efeito (Dhalla *et al.*, 2001). Por outro lado, as alterações no metabolismo lipídico podem influenciar a composição das membranas celulares, ao aumentar o seu conteúdo em ácido araquidónico e, assim, afectar a actividade das proteínas membranares (Grynberg *et al.*, 1996). Adicionalmente, a peroxidação dos lípidos libertados pode igualmente contribuir para a necrose associada a estes compostos (Mohan and Bloom, 1999).

- Alterações electrolíticas e sobrecarga de Ca^{2+} intracelular

A alteração do conteúdo miocárdico de electrólitos, nomeadamente de K^+ e Mg^{2+}, é outro factor que parece contribuir para a falência irreversível das funções celulares. Tem sido sugerido que em situações de deficiência de oxigénio ou de energia ocorre a perda de K^+ e Mg^{2+} pelo miocárdio. A depleção de Mg^{2+} leva à inibição da acção de diversas enzimas importantes nas reacções de transferência de fosfatos, inclusivamente na utilização de ATP, e ao aumento da captação de Ca^{2+} pela mitocôndria, que poderá levar ao desacoplamento mitocondrial (ver Dhalla *et al.*, 2001).

Um outro catião envolvido na cardiotoxicidade das catecolaminas é o Ca^{2+}. Por acção das catecolaminas ao nível dos receptores β ocorre a formação de monofosfato de

adenosina cíclico (AMPc). O AMPc activa os canais de Ca^{2+} tipo L no sarcolema levando a um aumento drástico da concentração intracelular de Ca^{2+} livre (Dhalla *et al.*, 2001; Tappia *et al.*, 2001). A sobrecarga de Ca^{2+} poderá ser altamente tóxica para a célula, na medida em que induz a diminuição dos níveis energéticos, a alteração do citoesqueleto, a produção de ROS e a activação exacerbada das fosfatases, fosfolipases, proteases e endonucleases (Orrenius *et al.*, 1989).

- Stresse oxidativo

Um dos mecanismos descritos para a cardiotoxicidade das catecolaminas envolve o stresse oxidativo em resultado da sua oxidação. Uma das vias metabólicas das catecolaminas decorre da acção da MAO, que catalisa a desaminação oxidativa destes compostos. Existem indícios de que a cardiotoxicidade das catecolaminas pode resultar, em parte, da actividade desta enzima. O facto de ocorrer a formação de H_2O_2 na metabolização das catecolaminas pela MAO (Carvalho *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2004) e a cardiotoxicidade das catecolaminas ser reduzida pelo pré-tratamento com inibidores da MAO (ver Dhalla *et al.*, 2001), sugere que a acumulação de produtos metabólicos resultantes da acção desta enzima contribui para essa toxicidade.

Uma outra via de indução de stresse oxidativo decorre da oxidação das catecolaminas a quinonas e aminocromos (Bindoli *et al.*, 1989 e 1992; Behonick *et al.*, 2001; Dhalla *et al.*, 2001). A grande capacidade que estes compostos possuem para originar ciclos redox, induzir o stresse oxidativo e formar aductos com macromoléculas (Tse *et al.*, 1976; Hastings *et al.*, 1996) pode resultar na destruição de moléculas essenciais para a sobrevivência celular.

Os aminocromos estão envolvidos em vários processos tóxicos, nomeadamente oxidação de grupos sulfidrilo proteicos, desacoplamento mitocondrial, inibição enzimática da MAO, COMT, fosfatase alcalina e de várias outras enzimas (devido à capacidade de oxidar grupos sulfidrilo e/ou de desaminar aminas e aminoácidos) e alterações do fluxo de Ca^{2+}, como resultado das suas acções inibitórias ao nível da actividade da bomba de Ca^{2+} sarcoplasmática, da actividade do sistema antiporte Na^+/Ca^{2+}, da capacidade de acumulação de Ca^{2+} pela mitocôndria e da actividade da bomba Na^+/K^+ sarcoplasmática (Dhalla *et al.*, 1992; Rupp *et al.*, 1994; Dhalla *et al.*, 2001; Tappia *et al.*, 2001).

A posterior oxidação e polimerização dos aminocromos leva à formação de compostos insolúveis de cor escura denominados de melaninas, cuja estrutura não é ainda

completamente conhecida (Rupp *et al.*, 1994; Hegedus, 2000; Pattison *et al.*, 2002). As melaninas são também referidas como indutoras de cardiotoxicidade e associadas aos efeitos de diferentes patologias, tais como alcaptonúria, artrite, feocromocitoma, hipertensão primária, carcinogenicidade, doença renal crónica, diabetes *mellitus*, doença de Parkinson e de Alzheimer e até ao fenómeno de envelhecimento (Hegedus, 2000).

Assim, os metabolitos oxidativos das catecolaminas e os radicais livres formados durante o processo podem estar envolvidos na cardiotoxicidade induzida pelas catecolaminas.

Um outro mecanismo que poderá estar envolvido na cardiotoxicidade da MDMA é um possível efeito cardiotóxico directo da MDMA e/ou dos seus metabolitos. Em estudos realizados *in vitro*, verificou-se que um análogo da MDMA, a metanfetamina, induz toxicidade em culturas de cardiomiócitos (isentas de catecolaminas) (Welder, 1992; He, 1995). Em adição, factores comportamentais e ambientais associados ao consumo da MDMA, tais como exercício muscular vigoroso e exaustivo em ambientes quentes (o que pode levar à desregulação da temperatura corporal) e com níveis elevados de ruído (característicos das "raves"), podem aumentar o risco de complicações cardiovasculares. Recentemente, Gesi e colaboradores (2002a e b) demonstraram que a exposição a níveis elevados de ruído potencia as modificações ultraestruturais (particularmente mitocondriais) observadas no coração de ratos administrados com MDMA.

Além dos mecanismos citados, também a hipercalémia resultante da libertação de K^+ aquando da rabdomiólise induzida pela MDMA poderá ser responsável pelo aparecimento de arritmias (Paterson, 1996; Greene *et al.*, 2003).

Por fim, é importante salientar que indivíduos com condições patológicas pré-existentes, tais como cardiomiopatias, doença coronária e arritmias funcionais constituem um grupo de maior risco para os efeitos cardiotóxicos induzidos pela MDMA (Dowling *et al.*, 1987).

6.4. Rabdomiólise

Os casos de rabdomiólise associados ao consumo de "ecstasy" são frequentemente observados em jovens após exercício muscular vigoroso e exaustivo em ambientes quentes

e praticamente sem ventilação (característicos das "raves") (Henry *et al.*, 1992; Screaton *et al.*, 1992; Murthy *et al.*, 1997b; Williams and Unwin, 1997; Halachanova *et al.*, 2001; Greene *et al.*, 2003). Os indivíduos com rabdomiólise apresentam tipicamente dores musculares violentas, fraqueza muscular e urina de coloração acastanhada. A rabdomiólise caracteriza-se por lesão do músculo esquelético com libertação no plasma do conteúdo dos miócitos. São inúmeros os factores que podem causar rabdomiólise (Odeh, 1991); no caso da MDMA, e anfetaminas em geral, parece ser provocada por 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 de amostras de músculo obtidas *in vivo* ou *post mortem* de consumidores de "ecstasy" revelou edema com infiltrados inflamatórios, fibras num estado de hipercontracção e desarranjo da arquitectura celular (Fineschi *et al.*, 1999; Behan *et al.*, 2000). A rabdomiólise envolve frequentemente o miocárdio (Screaton *et al.*, 1992). Mais recentemente, Leão e colaboradores (2004) evidenciaram o alargamento do espaço intersticial e a presença de infiltrados leucocitários no músculo *soleus* de ratinhos administrados com MDMA (20 mg/kg, i.p.) e submetidos a exercício durante 24 horas.

Quando ocorre rabdomiólise há libertação de mioglobina, potássio, fósforo, creatinina, enzimas musculares, nomeadamente a creatina fosfocínase (CK) e transaminase glutâmica-oxoloacética (GOT) e ADP (Kendrick *et al.*, 1977; Cunningham, 1997; Williams and Unwin, 1997). Como já referido, a libertação de K^+ no músculo cardíaco pode levar ao aparecimento de arritmias (Dhalla *et al.*, 2001). A libertação muscular da CK, creatinina e provavelmente de ADP pode originar agregação plaquetária (Kendrick *et al.*, 1977). Também na origem da agregação plaquetária poderá estar a libertação da hormona antidiurética (ADH; vasopressina) e de catecolaminas induzida pela MDMA (Filep and Rosenkranz, 1987). Além disso, a libertação de um activador do plasminogénio muscular e a hipertermia podem provocar fibrinólise excessiva (Terada *et al.*, 1988; Chadwick *et al.*, 1991). O conjunto destes factores acaba por induzir um estado de coagulação intravascular disseminada, o qual contribui para a nefrotoxicidade (Fig. 15) (Barrett and Taylor, 1993). Os danos renais também aparecem quando a mioglobina, ou os produtos da sua decomposição, causam obstrução e degeneração tubular (Odeh, 1991; Karch, 1993). Estudos recentes sugerem que a mioglobina pode também causar lesão renal via stresse oxidativo (Holt and Moore, 2001; Ishigami *et al.*, 2003).

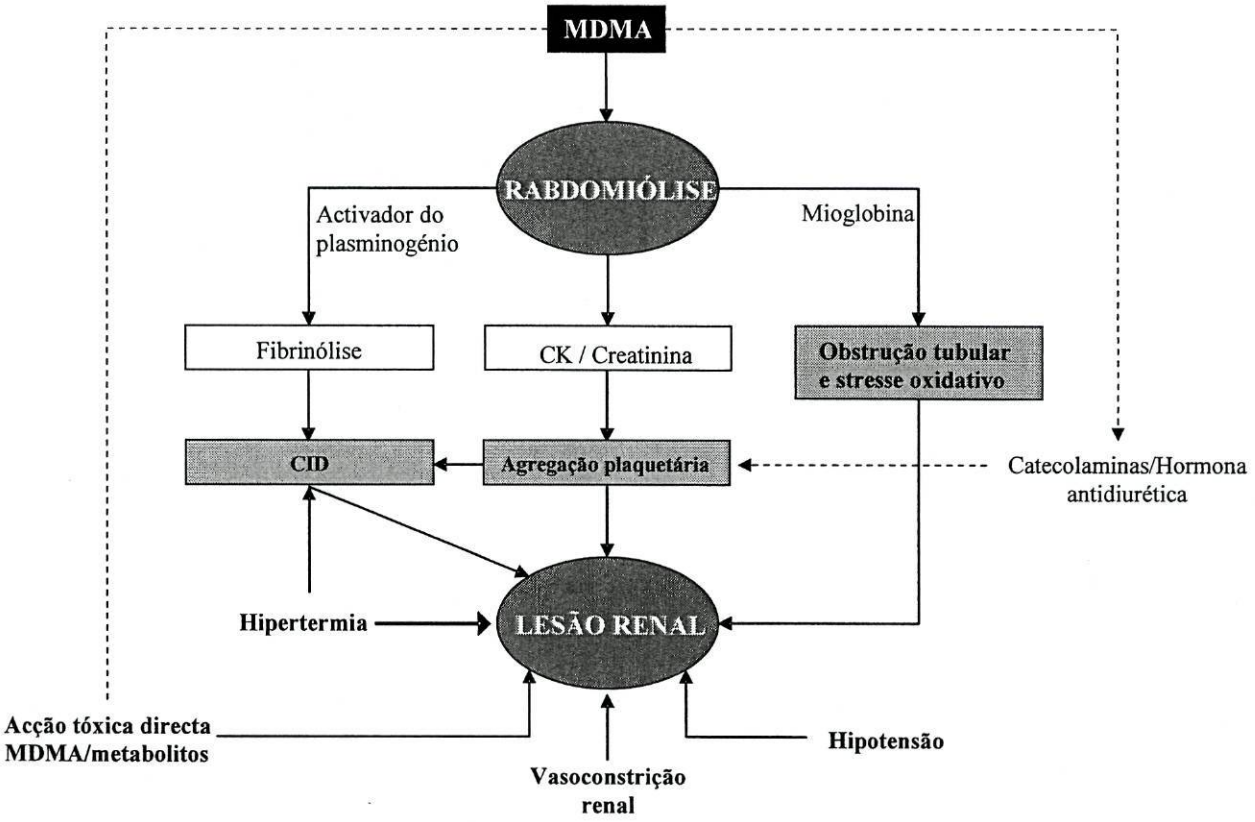


Figura 15. Representação esquemática dos mecanismos propostos para a rabdomiólise e lesão renal induzidas pela MDMA

6.5. Toxicidade Renal

Na literatura aparecem descritos vários casos de danos renais secundários ao consumo de "ecstasy", que incluem falência renal aguda ou crónica (Fahal *et al.*, 1992; Henry *et al.*, 1992; Woodrow *et al.*, 1995; Cunningham, 1997; Bingham *et al.*, 1998; Walubo and Seger, 1999), vasculite renal necrosante (Citron *et al.*, 1970) e lesão aguda dos túbulos proximais (Kwon *et al.*, 2003). No entanto, os mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade da MDMA não foram ainda elucidados. Inúmeros factores poderão contribuir para os danos renais verificados, nomeadamente a CID, a vasoconstrição renal, a hipotensão, a hipertermia e a rabdomiólise (Fig. 15) (Kendrick *et al.*, 1977; Terada *et al.*, 1988). Como referido anteriormente, a CID e a rabdomiólise são complicações observadas com frequência em

consumidores de "ecstasy" que podem causar obstrução da microvasculatura e degeneração tubular em consequência da deposição de agregados de plaquetas ou de mioglobina, respectivamente (Fahal *et al.*, 1992; Karch, 1993; Fineschi and Masti, 1996; Cunningham, 1997). Este processo pode levar a isquemia renal súbita e necrose tubular aguda. A análise *post mortem* de 3 consumidores de "ecstasy" revelou a presença de agregados de fibrina nos glomérulos renais em 2 dos casos e necrose tubular aguda no outro caso (Fineschi *et al.*, 1999). Verificou-se em todos eles a presença de mioglobina nos túbulos proximais.

Alguns casos descritos sugerem ainda uma possível acção tóxica directa da MDMA, ou dos seus metabolitos, no rim. Isto foi proposto por Foley e colaboradores (1984) após ter observado um caso clínico de nefrite intersticial aguda após consumo de "ecstasy", na ausência de lesão muscular e hiperpirexia.

A MDMA sofre metabolização no fígado com formação de aductos com a glutationa (Fig. 14). O posterior efluxo hepático e metabolismo de fase III dos conjugados da glutationa pela γ-GT (que existe em elevada quantidade no rim), dipeptidase e N-acetiltransferase resultam na formação de conjugados com a cisteína e N-acetilcisteína (Fig. 16). É importante salientar que os conjugados com a GSH, cisteína e N-acetilcisteína formados na metabolização da MDMA são potencialmente tóxicos para o rim e outros órgãos dado que o grupo catecol e a estrutura α-metilfeniletilamínica do composto de partida é mantida. Assim, os conjugados formados podem originar ciclos redox e induzir stresse oxidativo ou, alternativamente, atacar locais nucleofílicos intracelulares e causar necrose celular.

Os conjugados da GSH com vários polifenóis têm demonstrado ser nefrotóxicos em animais de experiência (para revisão, ver Lau, 1995; Monks *et al.*, 1996; Monks and Lau, 1997 e 1998). Esta nefrotoxicidade é uma consequência da actividade particularmente elevada de γ-GT na membrana apical das células tubulares proximais (PTCs) renais. As reacções de hidrólise ou de transpeptidação catalisadas por esta enzima têm lugar extracelularmente, e o produto final da reacção, o dipéptido cisteinilglicina é o substracto para as dipeptidases que têm também a mesma localização (Tate, 1980). Os conjugados com a cisteína são transportados através da membrana das células epiteliais do túbulo proximal pelo sistema de transporte de aminoácidos, acabando por exercer a sua toxicidade no interior da célula, normalmente por um mecanismo de ataque electrofílico a macromoléculas vitais (Monks and Lau, 1997). No interior da célula, o conjugado com a cisteína pode ainda ser convertido no respectivo ácido mercaptúrico pela enzima N-

acetiltransferase ou, alternativamente, pode sofrer a acção da enzima β-liase com formação de um tiol reactivo por um mecanismo de β-eliminação. Esta via metabólica catalisada pela β-liase tem sido implicada na nefrotoxicidade de vários conjugados com a GSH ou cisteína. O tiol formado pode ser inactivado pela enzima S-metiltransferase (Monks and Lau, 1987; van Bladeren, 2000).

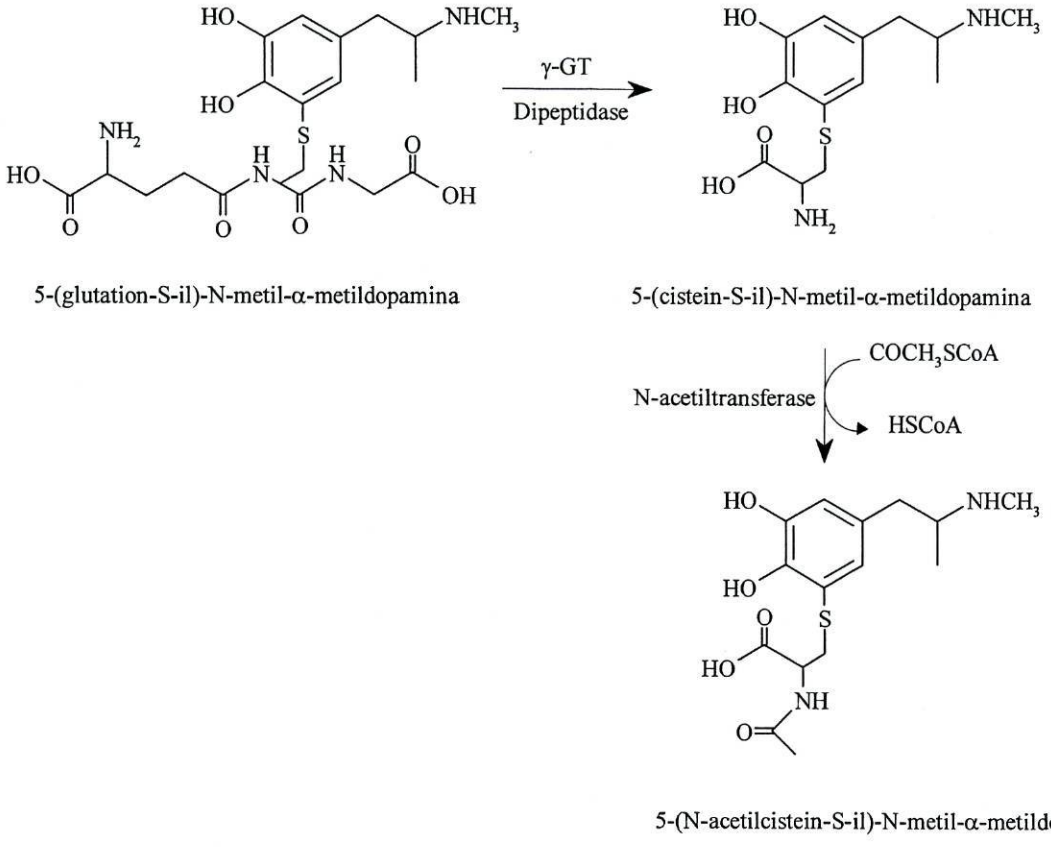


Figura 16. Metabolismo do conjugado da N-metil-α-metildopamina com a GSH (adaptado de Monks and Lau, 1997)

6.6. Hipertermia

A hipertermia é uma complicação grave observada frequentemente em indivíduos intoxicados com "ecstasy" (Brown and Osterloh, 1987; Henry *et al.*, 1992; Green *et al.*, 2003). Em alguns casos, a mortalidade associada ao consumo de "ecstasy" está claramente relacionada com a elevação da temperatura corporal até níveis letais, a qual pode atingir

temperaturas da ordem dos 43ºC (Henry *et al.*, 1992; Screaton *et al.*, 1992; Coore, 1996; Mallick and Bodenham, 1997; Walubo and Seger, 1999; Greene *et al.*, 2003; Kunitz *et al.*, 2003). Por outro lado, é provável que muitas das outras complicações observadas em consumidores de "ecstasy", particularmente a rabdomiólise, a CID e a falência renal aguda resultem ou possam ser agravadas pela acção hipertérmica da MDMA (Chadwick *et al.*, 1991; Dar and McBrien, 1996; Green *et al.*, 2003).

O efeito hipertérmico induzido pela MDMA nem sempre está relacionado com a quantidade de droga consumida. Na literatura encontra-se descrito um caso de ingestão de um único comprimido de "ecstasy" que resultou em hipertermia severa e morte (Dar and McBrien, 1996), enquanto num outro caso a ingestão de 42 comprimidos (concentração plasmática de 7,72 mg/L) foi assintomática (Henry *et al.*, 1992). Um factor que poderá contribuir para as diferenças observadas na susceptibilidade à toxicidade induzida pela MDMA é a existência do já referido polimorfismo para a debrisoquina 4-hidroxilase (enzima envolvida na desmetilenação da MDMA). Colado e colaboradores (1995) verificaram que a resposta hipertérmica à MDMA está aumentada em ratos fêmea Dark Agouti, os quais são deficientes na isoenzima *CYP*2D1 (que corresponde à *CYP*2D6 humana). Assim, indivíduos com actividade metabólica da *CYP*2D6 diminuída podem ser mais vulneráveis aos efeitos hipertérmicos da MDMA (Malpass *et al.*, 1999). Por outro lado, verificou-se que a disfunção do sistema termorregulador em animais de experiência que receberam MDMA é fortemente condicionada pela temperatura ambiente. De uma forma geral, a manutenção de animais tratados com MDMA em temperaturas ambiente baixas (4-15ºC) origina hipotermia, em temperaturas intermédias origina uma resposta bifásica de hipotermia seguida por hipertermia, enquanto que em temperaturas elevadas (28-30ºC) origina hipertermia severa (Gordon *et al.*, 1991; Dafters, 1995; Malberg and Seiden, 1998; Green *et al.*, 2004). Isto é importante visto a "ecstasy" ser normalmente consumida em locais de temperatura ambiente elevada, o que, conjuntamente com a hiperactividade motora e o estado de desidratação, poderá potenciar os seus efeitos no sistema termorregulador e levar a uma hipertermia fulminante (Henry *et al.*, 1992; Huether *et al.*, 1997).

Os mecanismos envolvidos na hipertermia induzida pela MDMA não foram ainda completamente esclarecidos, mas pensa-se que esta possa estar associada à estimulação serotoninérgica do centro da temperatura no hipotálamo (Gordon *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1995; Walubo and Seger, 1999). Estudos realizados em animais de experiência e no

Homem demonstraram que o efeito hipertérmico da MDMA pode ser prevenido por tratamento prévio com inibidores dos sistemas de captação de 5-HT ou com antagonistas dos receptores 5-HT_2 (Schmidt *et al.*, 1990b; Liechti *et al.*, 2000a; Liechti *et al.*, 2000b). No entanto, estudos mais recentes revelaram que o uso de antagonistas dos receptores dopaminérgicos D_1 diminui a acção hipertérmica da MDMA de forma dependente da dose, o que sugere a participação da dopamina na hipertermia induzida pela MDMA (Mechan *et al.*, 2002).

Além do efeito da MDMA a nível das funções termoreguladoras do SNC, vários outros factores parecem estar envolvidos, nomeadamente o aumento da actividade motora acompanhado por um estado hipermetabólico do músculo esquelético (Singarajah and Lavies, 1992; Woods and Henry, 1992), a estimulação da lipólise (Nonogaki, 2000) e da glicogenólise (Darvesh *et al.*, 2002), e a diminuição da perda de calor através da pele devido à vasoconstrição periférica induzida pelas catecolaminas (Gordon *et al.*, 1991; Pedersen and Blessing, 2001; Blessing *et al.*, 2003). Por outro lado, Denborough e Hopkinson (1997) demonstraram que a MDMA induz a libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático, causando contracção muscular sustentada, que contribui para a hipertermia. Este mecanismo aparece descrito na literatura como responsável pelo aparecimento de hipertermia maligna (McCoy *et al.*, 1994; Denborough and Hopkinson, 1997). Muito recentemente, Mills e colaboradores (2003) verificaram que ratinhos transgénicos deficientes na proteína dissociadora mitocondrial (UCP-3) tiveram uma resposta termogénica à MDMA substancialmente inferior, comparativamente à estirpe selvagem, que conferiu protecção contra os efeitos letais da droga. Esta proteína expressa-se predominantemente ao nível do músculo esquelético e parece estar associada à dissipação do gradiente electroquímico de protões, gerado na mitocôndria, sob a forma de calor (Lowell and Spiegelman, 2000). A UCP-3 pode ser induzida e activada pelo aumento intracelular de AMPc resultante da activação dos receptores β_3 adrenérgicos e pela hormona tiroideia (que se encontra aumentada após exposição à MDMA) (Gong *et al.*, 1997). Verificou-se ainda que a MDMA regula os níveis do RNA_m para a UCP-3 no músculo esquelético de rato (Sprague *et al.*, 2003). Estes dados sugerem que a UCP-3 pode estar envolvida na resposta termogénica induzida pela MDMA. A variabilidade nas respostas hipertérmicas observadas entre indivíduos consumidores de "ecstasy" pode então estar relacionada com diferenças interindividuais na actividade da UCP-3 presente no músculo esquelético.

O organismo reage à agressão da hipertermia com a síntese de proteínas de choque térmico (Hsp), sendo as mais comuns as Hsp70 (Benjamin and McMillan, 1998). Estas proteínas funcionam como agentes de protecção, tornando as células mais tolerantes à hipertermia severa e a outros agentes de stresse, embora os mecanismos subjacentes não estejam ainda completamente esclarecidos (Salminen *et al.*, 1997). Lu e Das (1993) verificaram que a administração da anfetamina em ratos induzia a expressão das Hsp70 nos vários órgãos, sendo esta indução mais expressiva no rim, moderada no coração e pulmão, e ausente no cérebro e fígado. Pelo contrário, Salminen e seus colaboradores (1997) verificaram a indução das Hsp70 e Hsp25 no fígado de ratinhos administrados com anfetamina. Num outro estudo realizado em ratos foi demonstrada a indução destas proteínas no córtex e cerebelo após administração de anfetamina, sendo que os níveis de Hsp70 no cerebelo eram superiores relativamente aos níveis no córtex cerebral (Miller *et al.*, 1991). Os resultados destes estudos indicam que a anfetamina induz o RNA_m das Hsp70 de uma forma diferencial nos vários órgãos e tipos de células, sugerindo que certos órgãos ou tipos de células possam ter maior capacidade de tolerância aos efeitos térmicos induzidos pelas anfetaminas (Jones and Simpson, 1999). Tanto quanto se sabe, ainda não foi estudado o efeito da MDMA na expressão destas proteínas.

6.7. Hiponatrémia

Uma complicação que foi apenas recentemente associada ao consumo da MDMA é a hiponatrémia. O primeiro caso foi descrito em 1993 por Maxwell e colaboradores, ao qual se seguiram vários outros que vieram confirmar esta associação (Holden and Jackson, 1996; Traub *et al.*, 2002; Budisavljevic *et al.*, 2003). A manifestação mais grave da hiponatrémia é o edema cerebral que pode levar à morte (Parr *et al.*, 1997; O´Connor *et al.*, 1999; Balmelli *et al.*, 2001; Caballero *et al.*, 2002).

A etiologia é ainda desconhecida mas pensa-se que possa ser secundária a dois mecanismos: a secreção inapropriada de hormona antidiurética (SIADH) e a ingestão excessiva de água e perda de sódio no suor (Zenenberg and Goldfarb, 2000; Hartung *et al.*, 2002; Traub *et al.*, 2002). A elevação da ADH foi demonstrada em estudos com voluntários humanos (Henry *et al.*, 1998; Forsling *et al.*, 2001; Fallon *et al.*, 2002) e num caso de hiponatrémia induzida pela MDMA (Holden and Jackson, 1996). A libertação de

serotonina induzida pela MDMA poderá estar envolvida na elevação da ADH pois foi já demonstrado que a libertação desta hormona é mediada por estimulação serotoninérgica (Brownfield *et al.*, 1988). No entanto, estudos recentes sugerem que um metabolito da MDMA possa ser responsável pela SIADH (Fallon *et al.*, 2002; Forsling *et al.*, 2002). Nestes estudos, verificou-se que a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) e a α-MeDA são mais potentes que a MDMA na indução da libertação desta hormona. Por outro lado, a hipertermia induzida pela MDMA, associada ao exercício físico intenso e à perda de água e electrólitos pelo suor, pode levar à ingestão de quantidades excessivas de água (pobre em iões), conforme constatado em indivíduos com hiponatrémia após consumo de "ecstasy" (Milroy *et al.*, 1996; Budisavljevic *et al.*, 2003).

6.8. Toxicidade a nível do Desenvolvimento Embrionário

O consumo de MDMA tem vindo a aumentar, principalmente no seio das classes mais jovens, sendo preocupante a sua utilização por mulheres em idade fértil (Ho *et al.*, 2001). É bem conhecido o potencial teratogénico de algumas anfetaminas, tendo sido documentada uma elevada frequência de partos prematuros, nado-mortos, atraso de crescimento intra-uterino, atrésia do ducto biliar e problemas cardiovasculares (Schardein, 1980; Eriksson *et al.*, 1994; Stewart and Meeker, 1997; Plessinger, 1998).

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

Até ao momento, não foram desenvolvidos muitos ensaios na investigação da acção teratogénica da MDMA. Alguns estudos realizados em animais de experiência sugerem que a exposição *in utero* à MDMA pode ter efeitos nefastos, nomeadamente uma diminuição da motilidade dos embriões (Bronson *et al.*, 1994b) e uma menor capacidade de aprendizagem e memória (Broening *et al.*, 2001). Curiosamente, a maioria dos estudos realizados em ratos para avaliar a acção neurotóxica da MDMA durante o desenvolvimento embrionário não evidenciaram este efeito (St Omer *et al.*, 1991; Bronson *et al.*, 1994a; Colado *et al.*, 1997a;

Aguirre *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 2002). Contudo, nestes estudos a exposição pré-natal à MDMA corresponde ao terceiro trimestre de gestação no Homem. Os estudos epidemiológicos demonstraram que no Homem a maioria dos casos de exposição *in utero* à MDMA ocorre quase exclusivamente durante o primeiro trimestre (McElhatton *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2001). Koprich e colaboradores (2003) demonstraram recentemente as primeiras evidências de alterações neuroquímicas e comportamentais a longo-termo em ratos expostos *in utero* à MDMA, num período equivalente ao primeiro trimestre no Homem.

Muitos esforços têm sido desenvolvidos nos últimos anos no sentido de tentar explicar os mecanismos envolvidos no efeito teratogénico das anfetaminas. Um dos mecanismos propostos foi a possível interferência das anfetaminas com a função transportadora da placenta (Ganapathy *et al.*, 1999). A placenta expressa grandes quantidades de transportadores de noradrenalina e serotonina (Balkovetz *et al.*, 1989; Ramamoorthy *et al.*, 1992), os quais constituem alvos de ligação para as anfetaminas. A função destes transportadores consiste no transporte destas aminas do sangue materno para o sinciciotrofoblasto, onde existe grandes quantidades de COMT e MAO-A (enzimas responsáveis pela degradação das catecolaminas). As anfetaminas podem interferir directamente com estes transportadores (Ramamoorthy *et al.*, 1995), bloqueando o transporte de noradrenalina e serotonina e sendo transportadas como substratos alternativos para dentro do sinciciotrofoblasto. Daqui resulta a presença de elevadas quantidades de noradrenalina e serotonina ao nível das vilosidades placentárias e consequente vasoconstrição das artérias uterinas, com diminuição do fluxo sanguíneo para a placenta, e contracção do miométrio uterino. Estes efeitos poderão ter sérias consequências na função placentária e no desenvolvimento do feto, uma vez que a diminuição do fluxo sanguíneo levará a uma diminuição do fornecimento de nutrientes e oxigénio e o aumento da contractilidade do miométrio levará a um aumento do risco de partos prematuros (Ganapathy *et al.*, 1999). Em concordância com este mecanismo, foi relatado o caso de uma mãe viciada em metanfetamina que gerou um nado-morto, cujo exame *post mortem* era consistente com anóxia intra-uterina (Stewart and Meeker, 1997).

A placenta possui também receptores sigma-1 (Ramamoorthy *et al.*, 1995), que parecem adquirir actividade imunossupressora quando ligados à progesterona, por inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), IL-6 e factor de necrose tumoral-α1 (TNF-α1), e aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10

(Ganapathy *et al.*, 1999). Esta imunossupressão ao nível da interface feto-materna parece ser importante para a não rejeição do feto e prosseguimento da gravidez. As anfetaminas poderão competir com a progesterona na ligação a este receptor, com os consequentes efeitos deletérios na implantação e gestação (Ganapathy *et al.*, 1999).

Embora a teratogenicidade provocada pela MDMA seja um facto reconhecido, são necessários mais estudos nesta área para a completa elucidação dos mecanismos envolvidos.

6.9. Toxicidade no Sistema Imunológico

Uma das possíveis consequências do consumo da MDMA é a modulação da actividade do sistema imune. O sistema imune encontra-se em equilíbrio dinâmico com os sistemas neuronal e endócrino. Certos factores do sistema imune, como as citocinas, parecem modular a actividade do SNC (Black, 1994b) e, em contrapartida, o SNC parece influenciar a resposta imunológica através dos sistemas nervoso simpático e neuroendócrino (Black, 1994a).

Mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune pela MDMA

A MDMA actua ao nível dos sistemas monoaminérgicos centrais, com libertação de dopamina e serotonina, que, por sua vez, vão condicionar, ao nível do hipotálamo, a libertação da hormona de libertação de corticotropina (CRH) e consequente activação do sistema hipotalâmico-pituitário-adrenal (Connor, 2004). Desta activação resulta um aumento da secreção da corticotropina ou hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e consequentemente de corticosterona (Budziszewska *et al.*, 1996; Yau *et al.*, 1997), que possui actividade imunossupressora. Paralelamente, a MDMA parece desempenhar um efeito imunomodulador por acção ao nível do sistema nervoso simpático, com libertação de catecolaminas. Foi demonstrado que a activação dos receptores β_2-adrenérgicos, presentes nos macrófagos e linfócitos, diminui as respostas imunológicas celulares e a actividade "Natural Killer" (NK) dos linfócitos (Irwin *et al.*, 1990; Freire-Garabal *et al.*, 1992).

Para além desta acção indirecta sobre os sistemas nervoso simpático e neuroendócrino, a MDMA poderá influenciar igualmente o sistema imunológico por acção directa sobre as células alvo. Os linfócitos possuem na sua membrana transportadores com

elevada afinidade para a serotonina (Faraj *et al.*, 1994), o que poderá facilitar a captação de MDMA para o interior destas células, possibilitando uma intervenção directa na função linfocitária.

Em estudos realizados *in vitro* (House *et al.*, 1994 e 1995; Pacifici *et al.*, 1999) verificou-se que a exposição de linfócitos T de ratinho à MDMA leva a um aumento significativo da produção de IL-2, na presença de concentrações baixas (0,0001 μM), mas a uma diminuição desta citocina para concentrações elevadas (100 μM). Paralelamente, também se observou a supressão da indução de linfócitos T citotóxicos (para a concentração de 100 μM) e um ligeiro aumento na actividade dos linfócitos NK (para concentrações entre 0,0001 e 1 μM). Nestes estudos não se verificaram alterações significativas ao nível dos linfócitos B.

Os estudos *in vivo* do efeito da MDMA nas respostas imunológicas foram realizados em ratos e mais recentemente no Homem. A administração a ratos de uma dose igual ou superior a 7,5 mg/kg de MDMA levou a uma redução significativa do número de linfócitos circulantes, concomitante com o aumento da concentração plasmática de corticosterona (Connor *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 1999). Uma explicação possível para este efeito parece ser o fenómeno da marginalização linfocitária (isto é, os linfócitos migram do sangue periférico para outros compartimentos, como gânglios linfáticos, baço, medula óssea, placas de Peyer) e o fenómeno da apoptose linfocitária, ambos induzidos pela corticosterona. Não se observou qualquer alteração na contagem absoluta de neutrófilos e monócitos. Nestes estudos verificou-se igualmente um decréscimo na proliferação linfocitária em resposta à estimulação mitogénica com fitohemaglutinina, independentemente da dose de MDMA administrada e dos níveis plasmáticos de corticosterona. Estes resultados sugerem que esta diminuição da proliferação linfocitária possa ser mediada por um mecanismo independente de glucocorticóides.

No Homem, a administração de uma dose única de 100 mg de MDMA causou uma diminuição do número de células T "helper" CD4, um aumento simultâneo das células NK e uma diminuição na resposta funcional dos linfócitos à estimulação mitogénica, apesar da contagem total de leucócitos permanecer inalterada (Pacifici *et al.*, 2000 e 2001b). A administração aguda de MDMA levou igualmente a um elevado aumento de citocinas imunosupressoras ("transforming growth factor-beta1" [TGF-β_1] e IL-10) e um desvio das citocinas tipo Th-1 (IL-2 e interferão-γ) para citocinas tipo Th-2 (IL-4 e IL-10). A correlação observada entre a farmacocinética da MDMA, a cinética da secreção de cortisol

induzida pela MDMA e o perfil da desregulação imunológica associada à MDMA suportam a hipótese da participação dos sistemas monoaminérgicos centrais na modulação da resposta imunológica. A corroborar o importante papel da serotonina libertada por acção da MDMA a nível do sistema imunológico, Pacifici e colaboradores (2004) demonstraram muito recentemente que o tratamento com a paroxetina (inibidor selectivo da recaptação de serotonina) inibe os efeitos agudos da MDMA no sistema imune em humanos. Demonstrou-se, mais especificamente, que o pré-tratamento com paroxetina anula por completo o efeito supressor da MDMA na proliferação linfocitária e na produção de IL-2, bloqueia a capacidade da MDMA de aumentar a produção das citocinas imunosupressoras IL-10 e TGF-β e inibe parcialmente a sua capacidade de suprimir a proliferação de células T "helper" CD4 e aumentar o número de células NK.

A administração de doses repetidas de MDMA a consumidores saudáveis de "ecstasy" causou uma disfunção do sistema imune similar à observada após administração aguda (Pacifici *et al.*, 2001a). No entanto, a sua administração repetida prolonga o período durante o qual a imunocompetência do indivíduo fica comprometida. Um outro estudo realizado por Pacifici e colaboradores (2002) numa população de consumidores crónicos de "ecstasy" revelou alterações em vários parâmetros imunológicos, nomeadamente uma redução drástica do número de células NK e uma tendência para valores baixos de linfócitos T e células T "helper". Neste estudo verificou-se uma redução significativa nos parâmetros imunológicos estudados durante um período de observação de 2 anos. Estas alterações permanentes do sistema imunológico podem aumentar a susceptibilidade do indivíduo a infecções e doenças de foro imunológico.

7. DEPENDÊNCIA

O uso frequente de MDMA provoca uma diminuição gradual dos efeitos desejados, o que leva a uma perda de interesse por parte dos consumidores. Isto poderá explicar a existência de poucos casos conhecidos de dependência de "ecstasy". Jansen (1999) descreveu 3 casos de indivíduos que desenvolveram um quadro de dependência após o consumo de quantidades elevadas de "ecstasy" durante vários meses. Estudos recentes indicam que o uso repetido e prolongado de "ecstasy" parece preencher alguns dos critérios de dependência definidos pela "American Psychiatric Association" (ver O´Brien, 1996), nomeadamente induzir tolerância, despertar um forte desejo de voltar a consumir a droga apesar de se conhecer os potenciais efeitos nefastos e provocar sintomas físicos de privação (Cottler *et al.*, 2001; Sydow *et al.*, 2002). Os sintomas de abstinência mais referidos pelos consumidores de "ecstasy" são o cansaço e fraqueza física, sonolência, alteração do apetite, depressão e problemas de concentração (Cottler *et al.*, 2001). É importante referir que vários factores de carácter social ou psicológico poderão ter um papel crucial no aparecimento de alguns casos de dependência.

8. TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO

Não existe um tratamento específico para a intoxicação provocada pela MDMA. O tratamento é muito semelhante ao utilizado em indivíduos intoxicados por outras anfetaminas e consiste essencialmente na estabilização das funções vitais e no tratamento de sintomas específicos (Lapostolle *et al.*, 1997; Rochester and Kirchner, 1999; Henry, 2000; Rieder, 2000; Koesters *et al.*, 2002). É peremptório proceder-se à avaliação do estado cardio-respiratório do indivíduo e à verificação da existência de eventuais arritmias ou crises hipertensivas. Sempre que possível deve-se obter um relatório detalhado das circunstâncias da intoxicação. Se a ingestão tiver ocorrido no intervalo precedente de 30 a 60 minutos, o tratamento de eleição consiste na lavagem gastrointestinal e posterior administração de carvão activado e sorbitol. É importante a colheita de sangue para a contagem diferencial de células e para a quantificação de vários parâmetros bioquímicos, nomeadamente marcadores de lise hepática, enzimas cardíacas (especialmente nos casos de angina ou disritmias), creatina cínase, entre outros. É igualmente importante o exame toxicológico ao sangue e urina, com quantificação de alcoolémia. Outros exames auxiliares de diagnóstico são a radiografia torácica e a tomografia axial computarizada (TAC) cerebral, este último no caso de pertubações mentais persistentes.

- Tratamento sintomático em fase aguda:

  - administração de oxigénio para o tratamento de depressão respiratória;
  - administração de fluidos endovenosos e eventualmente de substâncias inotrópicas (dopamina, norepinefrina ou dobutamina) para o tratamento de hipotensão;
  - benzodiazepinas ou butirofenonas para o tratamento de agitação e convulsões;
  - fentolamina ou nitroprussiato de sódio (bloqueadores α) para o tratamento de hipertensão;
  - lidocaína para o tratamento de arritmias ventriculares;
  - nitroglicerina para o tratamento de angina do miocárdio;
  - mantas hipotérmicas e banhos gelados para o tratamento de hipertermia. O uso de dantroleno (inibidor da libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático) também pode ser eficaz no tratamento da hipertermia (McCoy *et al.*, 1994; Mallick and Bodenham, 1997).

- manitol e bicarbonato para o tratamento de rabdomiólise. A diurese alcalina forçada com manitol e bicarbonato é recomendada dado promover a "clearance" da mioglobina e, desta forma, reduzir os seus efeitos tóxicos no rim (Better and Stein, 1990; Schwartz and Miller, 1997). A fluidoterapia deve compensar a perda de líquidos ocorrida na diurese.
- correcção de distúrbios electrolíticos (acidose metabólica);
- O tratamento da hiponatrémia aguda é ainda controverso (Ellis, 1995; Hartung *et al.*, 2002). A restrição de fluidos a <1L/dia é normalmente suficiente. O uso de manitol ou diuréticos de ansa deve ser considerado se houver sinais de edema cerebral.

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

- Tratamento após estabilização clínica:

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

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

PARTE II

TRABALHO EXPERIMENTAL

9. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação pretende contribuir para o esclarecimento dos efeitos e mecanismos de hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e nefrotoxicidade da MDMA e dos seus metabolitos MDA, α-MeDA, N-Me-α-MeDA, 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA. Assim, os estudos delineados tiveram como objectivos principais:

- Avaliar a actividade tóxica da MDMA e seus metabolitos em vários modelos *in vitro*, nomeadamente suspensões de hepatócitos isolados de ratinho e rato, suspensões de cardiomiócitos isolados de rato e culturas primárias de células tubulares proximais renais de rato e humanas;
- Estudar a influência da hipertermia na hepatotoxicidade induzida pela MDMA *in vitro*;
- Avaliar a contribuição de diferentes vias metabólicas na nefrotoxicidade induzida pelos conjugados 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA;
- Avaliar o efeito protector de antioxidantes na hepatotoxicidade induzida pela N-Me-α-MeDA.

10. ENSAIOS *IN VITRO* DA HEPATOTOXICIDADE DA 3,4-METILENO-DIOXIMETANFETAMINA E DOS SEUS METABOLITOS

A avaliação da acção hepatotóxica da MDMA e dos seus metabolitos, *in vitro*, foi realizada recorrendo aos seguintes parâmetros:

- Estudo da influência da hipertermia na hepatotoxicidade induzida pela MDMA *in vitro* (**Trabalho I**). Com esta finalidade usaram-se suspensões de hepatócitos isolados de ratinho Charles-River incubados a diferentes temperaturas, 37°C e 41°C, de forma a simular condições de normotermia e de hipertermia, respectivamente.
- Estudo da relação concentração-efeito para a MDMA e seus metabolitos (**Trabalhos II e III**). Para tal, procedeu-se à incubação de hepatócitos isolados de rato Wistar com MDMA, MDA, α-MeDA e N-Me-α-MeDA nas concentrações finais de 0,1 a 1,6 mM, durante 3 horas. Os biomarcadores de efeito determinados foram a viabilidade celular, a peroxidação lipídica, os níveis de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), ATP e a actividade das enzimas antioxidantes GSSG redutase (GR), GSH S-transferase (GST) e GSH peroxidase (GPX).
- Identificação dos conjugados com a GSH formados nos hepatócitos isolados expostos à MDA ou α-MeDA por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detector de fotodíodos (DAD) e electroquímico (EC) (**Trabalho II**).
- Avaliação do efeito protector dos antioxidantes ácido ascórbico e N-acetilcisteína na hepatotoxicidade induzida pela N-Me-α-MeDA (**Trabalho III**). Para tal, procedeu-se à incubação de hepatócitos isolados de rato Wistar com a N-Me-α-MeDA na presença de ácido ascórbico ou N-acetilcisteína. Os biomarcadores de efeito avaliados foram a viabilidade celular e os níveis celulares de GSH e GSSG.

TRABALHO I

Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes

Reprinted from Archives of Toxicology 74: 789-793

Copyright (2001) with kind permission from Springer-Verlag

Arch Toxicol (2001) 74: 789–793
DOI 10.1007/s002040000200

ORGAN TOXICITY AND MECHANISMS

Márcia Carvalho · Félix Carvalho
Maria Lourdes Bastos

Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes

Received: 11 September 2000 / Accepted: 16 November 2000 / Published online: 17 January 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract The consumption of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy; MDMA) may cause hepatocellular damage in humans, a toxic effect that has been increasing in frequency in the last few years, although the underlying mechanisms are still unknown. The metabolism of MDMA involves the production of reactive metabolites which form adducts with intracellular nucleophilic sites, as is the case with glutathione (GSH). Also, MDMA administration elicits hyperthermia, a potentially deleterious condition that may aggravate its direct toxic effects. Thus, the objective of this study was to evaluate the extent of MDMA-induced depletion of GSH, induction of lipid peroxidation and loss of cell viability in freshly isolated mouse hepatocytes under normothermic conditions (37 °C) and to compare the results with the effects obtained under hyperthermic conditions (41 °C). By itself, hyperthermia was an important cause of cell toxicity. A rise in incubation temperature from 37 °C to 41 °C caused oxidative stress in freshly isolated mouse hepatocytes, reflected as a time-dependent induction of lipid peroxidation and consequent loss of cell viability (up to 40–45%), although the variations in GSH and GSSG levels were similar to those under normothermic conditions. MDMA (100, 200, 400, 800 and 1600 μM) induced a concentration- and time-dependent GSH depletion at 37 °C but had a negligible effect on lipid peroxidation and cell viability at this temperature. It is particularly noteworthy that hyperthermia (41 °C) potentiated MDMA-induced depletion of GSH, production of lipid peroxidation and loss of cell viability (up to 90–100%). It is therefore concluded that hyperthermia potentiates MDMA-induced toxicity in freshly isolated mouse hepatocytes.

Key words MDMA · Hyperthermia · Freshly isolated mouse hepatocytes · Hepatotoxicity

This paper is dedicated by the authors to Professor Margarida Alice Ferreira on the occasion of her retirement in recognition of her contribution to the development of the pharmaceutical sciences.

M. Carvalho · F. Carvalho (✉) · M. L. Bastos
CEQUP, Toxicology Department,
Faculty of Pharmacy, Porto University,
Rua Aníbal Cunha, 164. 4050-047 Porto,
Portugal
e-mail: felixdc@ff.up.pt
Fax: 351-22-2003977

Introduction

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) is a phenylethylamine derivative with structural similarities to both mescaline and amphetamine. MDMA has acquired notoriety as a potential tool for the treatment of psychiatric disorders, but has achieved popularity as a drug of abuse by virtue of its euphoria-inducing and stimulant properties (Karch 1993). Although some misinformation available to the public describes this drug as relatively harmless, reports of its toxicity have been increasing in frequency during the last decade, notably hepatocellular damage in humans (for a review see Jones and Simpson 1999). However, in spite of these reports, little is known about the respective biological mechanisms involved, probably due to its complexity, which involve various factors, namely its metabolism, the increase in neurotransmitters efflux, the oxidation of biogenic amines, and hyperthermia.

It is well known that the administration of MDMA to laboratory animals causes a rise in body temperature, and it must be stressed that hyperthermia is a pro-oxidant aggressive condition, which leads to irreversible hepatocellular injury in vitro (Carvalho et al. 1997; Skibba et al. 1991). On the other hand, MDMA is biotransformed into a reactive intermediate that conjugates with glutathione (GSH) (Hiramatsu et al. 1990), which may cause its depletion, a situation known to expose cells to the aggression of pro-oxidant toxicants. Taking into account the concomitant appearance of GSH depletion and hyperthermia as a consequence of MDMA consumption, it seems plausible that they may have

synergistic deleterious effects. Thus, the aim of this study was to evaluate and compare the extent of MDMA-induced depletion of GSH, lipid peroxidation and loss of cell viability in freshly isolated mouse hepatocytes under normothermic and hyperthermic conditions (37 °C and 41 °C, respectively).

Materials and methods

Chemicals

All reagents were of analytical grade. Collagenase (grade I), bovine serum albumin (fraction V), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetraacetic acid (EGTA), reduced glutathione (GSH), reduced nicotinamide adenine dinucleotide [NAD(H)], pyruvic acid and 2-thiobarbituric acid, were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.). Chloroacetic acid, methanol (gradient grade), perchloric acid and all other chemicals were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Water for HPLC was deionized (μs/cm μ0.055) (Seral Water Purification Systems, Munich, Germany). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine was a generous gift from the United Nations Drug Control Program (Vienna, Austria).

Animals

Charles-River mice, weighing 25–30 g, were used as the source of hepatocytes. The mice were acclimatized in polyethylene cages lined with wood shavings with wire mesh at the top at an ambient temperature of 20 ± 2 °C, under a humidity between 40% and 60% and under a 12/12-h light/dark cycle. The animals had free access to standard rat chow and drinking water, and were kept in our animal house for at least 2 weeks prior to use. Surgical procedures, which were performed under diethyl ether anesthesia, were always carried out between 9:00 a.m. and 10:00 a.m.

Isolation and incubation of hepatocytes

Hepatocyte isolation was performed by collagenase perfusion as described by Moldéus et al. (1978), with the necessary adaptations for the animal species used (Mouse). The foremost adaptations were a smaller cannula diameter (0.8 × 25 mm), a lower collagenase concentration (0.038%) and the fact that the perfusion was performed in situ. Cell viability at the beginning of the experiments was between 85% and 97%.

Incubations were performed in a shaking water bath (90 oscillations/min) at 37 °C, using 10^6 cells/ml in Krebs-Henseleit buffer supplemented with 25 m*M* HEPES (pH 7.4), and gassed continuously with an air stream of humidified carbogen. The isolated hepatocytes were always preincubated for 30 min at 37 °C before the beginning of the experiments. Cells were then incubated with MDMA chloride (0, 100, 200, 400, 800 and 1600 μ*M*). These experiments were performed both at 37 °C and at 41 °C. Sample aliquots were taken at time 0 and after each 60 min during 3 h of incubation for evaluation of cell viability, lipid peroxidation, and reduced and oxidized glutathione.

Cell viability was determined after isolation by the trypan blue exclusion test. During the course of the experiments cell viability was determined by the LDH leakage method, which was randomly confirmed by the trypan blue exclusion test. GSH and GSSG measurement was performed by HPLC with a dual-electrode coulometric detection (Remião et al. 2000). Briefly, cell suspension aliquots (500 μl) were precipitated with 500 μl perchloric acid (5% final acid concentration) and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm in a refrigerated centrifuge. Aliquots of the samples were then injected into the HPLC system with dual-electrode coulometric detection. The extent of lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay at 535 nm as described previously (Carvalho et al. 1997).

Statistical analysis

Results are given as means ± SEM ($n = 5$) (each experiment was performed with cells obtained from a different mouse). Statistical comparisons were made with one-way ANOVA followed by Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD) test. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

The increase in incubation temperature from 37 °C to 41 °C caused oxidative stress in the freshly isolated mouse hepatocytes, reflected as a time-dependent induction of lipid peroxidation (Fig. 1A) and consequent loss of cell viability (up to 40–45%) (Fig. 1B), although the variations in GSH and GSSG levels were similar to those observed under normothermic conditions (data not shown). On the other hand, MDMA (100, 200, 400, 800 and 1600 μ*M*) induced a concentration- and time-

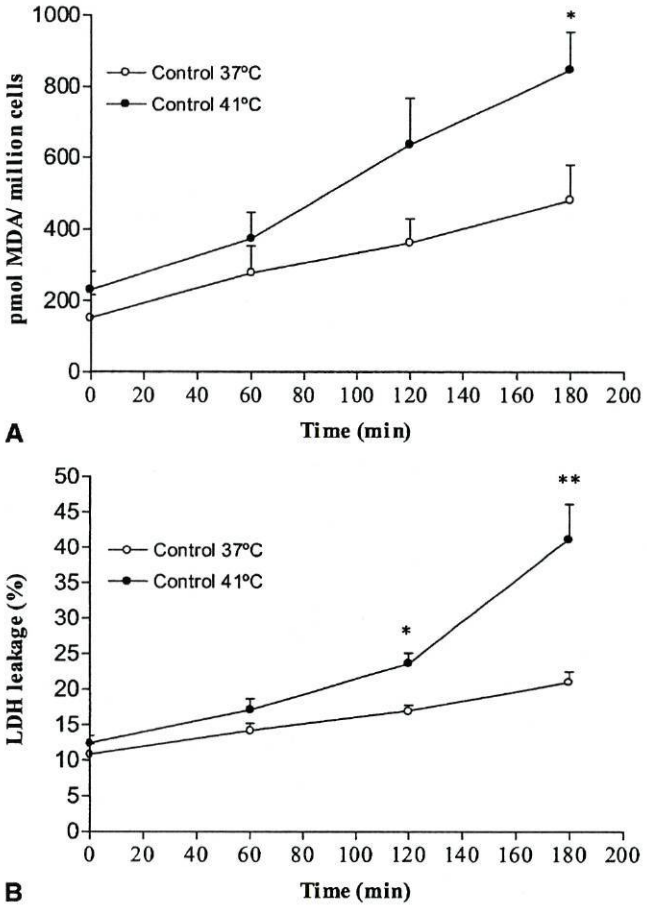


Fig. 1A, B Effect of different temperatures (37°C or 41°C) on TBARS formation (**A**) and LDH leakage (**B**) in freshly isolated mouse hepatocytes. Values are means ± SEM from five different experiments (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$)

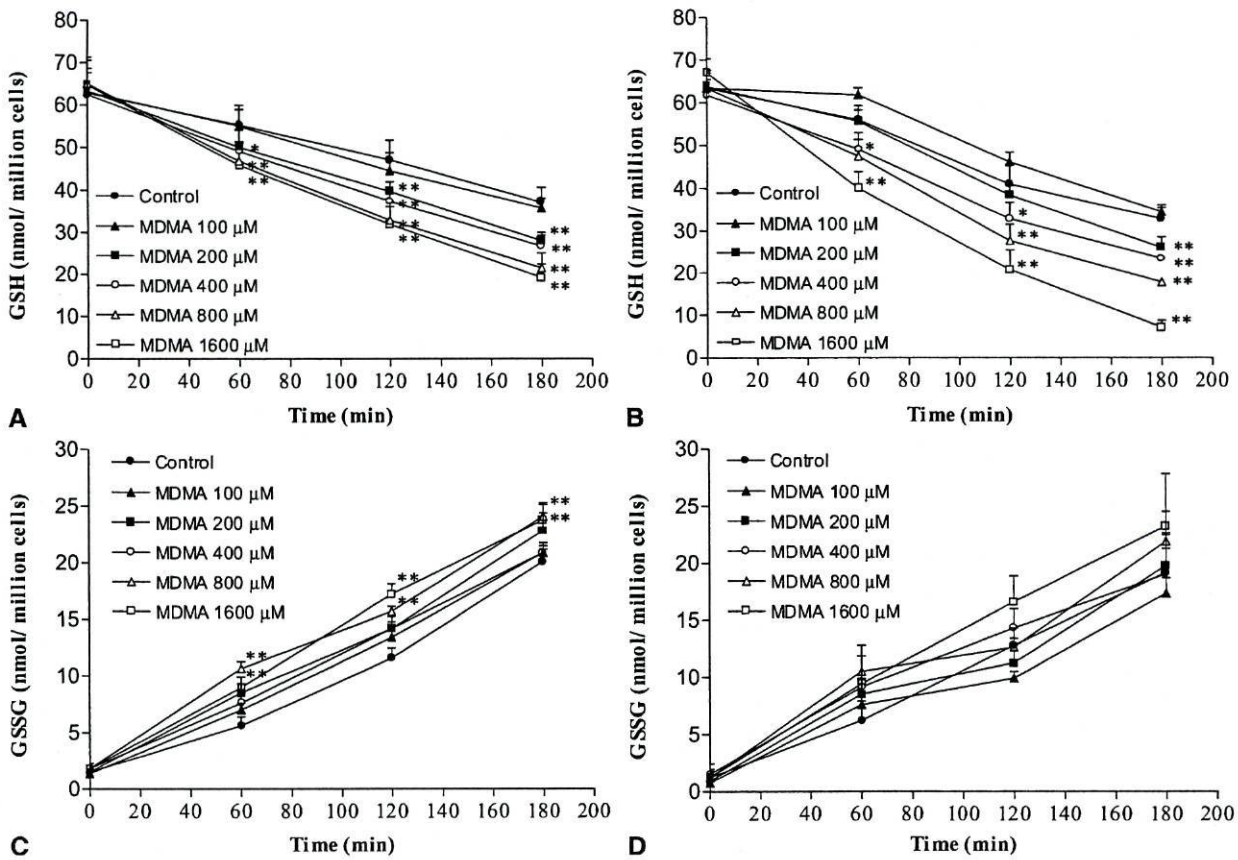
dependent GSH depletion at 37 °C (Fig. 2A) but had a negligible effect on lipid peroxidation (Fig. 3A) or cell viability (Fig. 4A) at this temperature. It is noteworthy that hyperthermic conditions (41 °C) heightened MDMA-induced depletion of GSH (Fig. 2B), production of lipid peroxidation (Fig. 3B) and loss of cell viability (Fig. 4B) (up to 90–100%). It is also important to note that the GSH depletion induced by MDMA was not due to GSH oxidation and that the observed potentiation of MDMA-induced GSH depletion by hyperthermia was still not due to an increase of GSSG formation (Fig. 2A–D). Unquestionably, the dramatic damage observed in the cells exposed to the drug at 41 °C gives a clear picture of the potentiation of MDMA toxicity by hyperthermia.

Discussion

The observed synergistic toxicity of MDMA and hyperthermia against isolated mouse hepatocytes has never been reported before, despite the fact that it may help to understand why this drug of abuse is hepatotoxic to some abusers. MDMA causes hyperthermia in both animals and humans. However, while the MDMA-induced hyperthermia in experimental animals is dose-related and dependent on ambient temperature (O'Shea et al. 1998), in humans, this effect is not always related to the amount of ingested drug (Henry et al. 1992). If someone takes MDMA in sufficient amounts, an increase in body temperature is usually observed (Fineshi and Masti 1996; Walubo and Seger 1999). Although the mechanism of MDMA-induced hyperthermia is still a matter of debate, anecdotal evidence indicates that it is augmented by high environmental temperatures, dehydration and excessive physical exertion (e.g. at rave parties) (Walubo and Seger 1999), which may explain the different susceptibility among humans.

MDMA-induced hyperthermia is provoked by an increase in brain serotonin levels, thus exciting the thermal control regions in the anterior hypothalamus/preoptic area, possibly by increasing the temperature set point, which stimulates the sympathetic center and increases sympathetic discharge. Catecholamines are released and these stimulate alpha or beta adrenergic receptors (depending on the particular tissue's receptor reserve), which increases mitochondrial metabolism and heat generation. Also, muscular contractions and peripheral vasoconstriction contribute to body temperature elevation (Walubo and Seger 1999). A pre-existing metabolic myopathy or genetic predisposition similar to that seen in patients with malignant hyperthermia

Fig. 2A–D Effect of MDMA on GSH and GSSG levels in freshly isolated mouse hepatocytes. Cells were incubated at 37°C (**A**, **C**) or 41°C (**B**, **D**) with MDMA (100, 200, 400, 800 and 1600 μ*M*). Values are means ± SEM from five different experiments (**P* < 0.05, ***P* < 0.01)



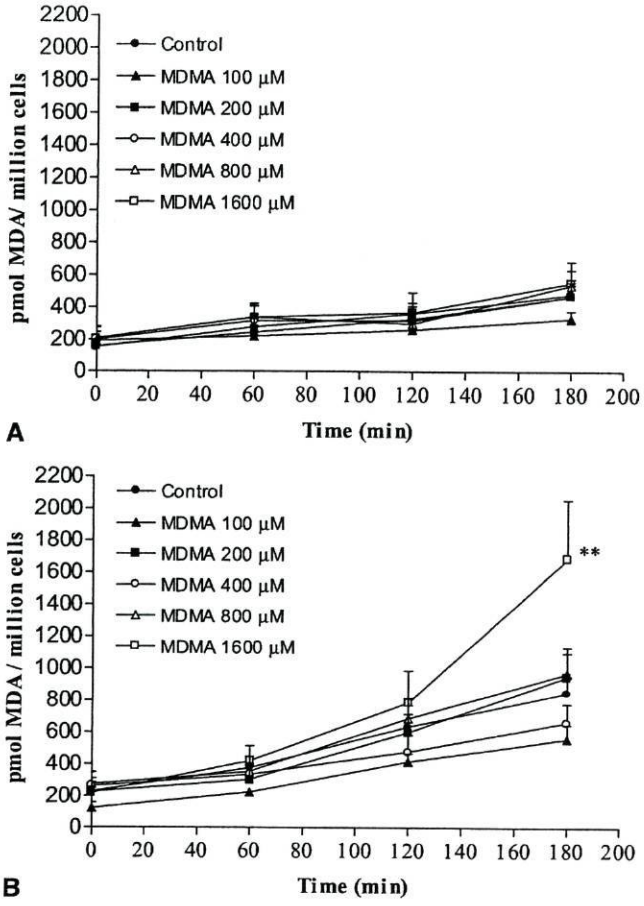


Fig. 3A, B Effect of MDMA on TBARS formation in freshly isolated mouse hepatocytes. Cells were incubated at 37°C (**A**) or 41°C (**B**) with MDMA (100, 200, 400, 800 and 1600 μ*M*). Values are means ± SEM from five different experiments (**P* < 0.05, ***P* < 0.01)

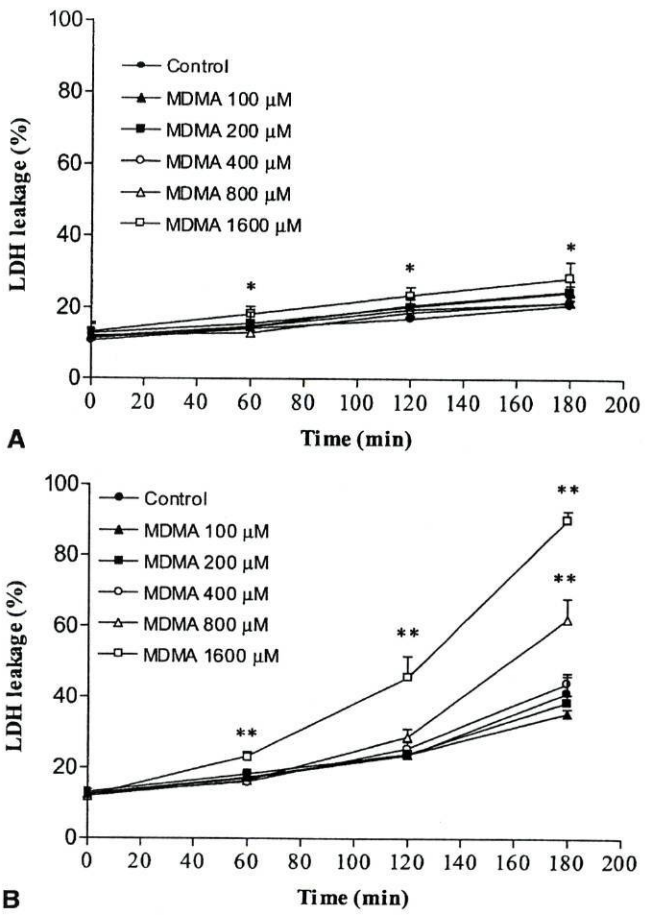


Fig. 4A, B Effect of MDMA on LDH leakage from freshly isolated mouse hepatocytes. Hepatocytes were incubated at 37°C (**A**) or 41°C (**B**) with MDMA (100, 200, 400, 800 and 1600 μ*M*). Values are means ± SEM from five different experiments (**P* < 0.05, ***P* < 0.01)

remains a possibility. Survivors of MDMA toxicity need to be evaluated for this if our understanding of this phenomenon is to be increased (Dar and McBrien 1996). Interestingly, in a reported case of 3,4-methylenedioxyethamphetamine-induced hyperthermia, subsequent in vitro testing for malignant hyperthermia proved to be negative (Tehan et al. 1993).

It has been shown that hyperthermia causes lipid peroxidative damage in perfused rat liver (Skibba et al. 1991) and in freshly isolated rat hepatocytes (Carvalho et al. 1997). The mechanisms responsible for the oxidative stress resulting from hyperthermia are still under study, but it is known that they involve oxygen-centered free radical formation, namely superoxide (Powers et al. 1992) and hydroxyl radicals (Flanagan et al. 1998). These radicals can be generated after the hyperthermia-induced conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in the presence of free iron (released from ferritin by superoxide radical) as the catalyst in the Fenton reaction (Powers et al. 1992). In the present work, lipid peroxidation occurred despite the maintenance of GSH content within the normothermia control levels. Strikingly, in a previous work, the same hyperthermic conditions applied to freshly isolated rat hepatocytes not only increased lipid peroxidation and cell mortality but also caused severe GSH oxidation (Carvalho et al. 1997). The reason for this different effect on GSH may be due to a better capacity to recover to basal GSH levels in mouse hepatocytes, or to a different intracellular localization of the reactive oxygen species (ROS) formation (e.g. within the lipidic domain). This interspecies variability in response to MDMA exposure is interesting and leads to the suggestion that the putative different toxicological pathways in rat and mouse hepatocytes should be studied in detail and compared with those in human hepatocytes in order to find the best animal model from which results may be extrapolated to humans.

The metabolic activation to a reactive metabolite capable of conjugating with GSH has been shown for 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Hiramatsu et al. 1990). The resulting GSH depletion has already been demonstrated in isolated rat hepatocytes (Beitia et al. 1999) and was confirmed in the present study with a different rodent species. Since GSH has an important

protective role involving its oxidant neutralizing and its lipid peroxidase and/or tocopheryl radical-regenerating activities (Di Mascio et al. 1991), its depletion may render the cells more exposed to the deleterious effects of the ROS being formed within the cells. Thus, in a heatstroke caused by MDMA, the depletion of GSH may have primordial importance in the susceptibility of cells to oxidative injury. This putative toxicological mechanism is reinforced by the results obtained in the present study.

The metabolism of MDMA involves its conversion to α-methyldopamine (α-MeDA) by cytochromes P450 2D, 2B and 3A (Bai et al. 1999; Kreth et al. 2000). α-MeDA undergoes oxidation to the corresponding *o*-quinone, which is efficiently scavenged by GSH to form 5-(glutathion-S-yl)-α-methyldopamine (Hiramatsu et al. 1990). It is noteworthy that the conjugate can still be converted into a glutathione-*o*-quinone (Miller et al. 1997). The observed potentiation of MDMA-induced GSH depletion by hyperthermia may be due to an increase in metabolism, although this needs further study. The reactive *o*-quinone intermediates are Michael acceptors, and cellular damage can occur through alkylation of crucial cellular proteins and/or DNA. Alternatively, quinones are highly redox-active molecules which can enter a redox cycle with their semiquinone radicals, leading to the formation of ROS, including superoxide, hydrogen peroxide, and ultimately the hydroxyl radical (see Bolton et al. 2000). Thus, the metabolism of MDMA leads to the formation of highly aggressive agents that may cause irreversible cell damage, which will be potentiated by the depletion of antioxidant defense levels. This weakened state can be brought about by hyperthermia.

In the present study, the concomitant aggression of freshly isolated mouse hepatocytes by MDMA and hyperthermia proved to be synergistically toxic. Since hyperthermia and MDMA metabolism occur in vivo, it seems reasonable to surmise that these situations are potentially lethal and most certainly contribute to the hepatotoxicity that has been reported in humans. Although the concomitant effect of MDMA in people taking it, namely (1) an increase in body temperature and (2) a direct effect of the drug on GSH levels by the formation of adducts has not yet been reported, it is most likely that these effects occur in humans since they express the enzymes involved in the above-mentioned metabolism (Kreth et al. 2000).

Acknowledgements This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia – Portugal (FCT project 36099/99). The experiments are declared to comply with the current laws of Germany.

References

Bai F, Lau SS, Monks TS (1999) Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of α-methyldopamine produce serotoninergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. Chem Res Toxicol 12: 1150–1157

Beitia G, Cobreros A, Sainz L, Cenarruzabeitia E (1999) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced hepatotoxicity: effect on cytosolic calcium signals in isolated hepatocytes. Liver 19: 234–241

Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol 13: 135–160

Carvalho F, Remião F, Soares ME, Catarino R, Queiroz G, Bastos ML (1997) d-Amphetamine induced hepatotoxicity – a possible contribution of catecholamines and hyperthermia for this effect studied in isolated rat hepatocytes. Arch Toxicol 71: 429–436

Dar KJ, McBrien ME (1996) MDMA induced hyperthermia: report of a fatality and review of current therapy. Intensive Care Med 22: 995–996

Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am J Nutr 53: 194S–200S

Fineschi V, Masti A (1996) Fatal poisoning by MDMA (ecstasy) and MDEA: a case report. Int J Legal Med 108: 272–275

Flanagan SW, Moseley PL, Buettner GR (1998) Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. FEBS Lett 431: 285–286

Henry JA, Jeffreys KJ, Dawling S (1992) Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). Lancet 340: 384–387

Hiramatsu M, Kumagai Y, Unger SE, Cho AK (1990) Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. J Pharmacol Exp Ther 254: 521–527

Jones AL, Simpson KJ (1999) Review article: mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications. Aliment Pharmacol Ther 13: 129–133

Karch SB (1993) The pathology of drug abuse. CRC Press, Boca Raton, pp 156–218

Kreth KP, Kovar KA, Schwab M, Zanger UM (2000) Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "ecstasy"-related designer drugs. Biochem Pharmacol 59: 1563–1571

Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1997) 2,5-Bis-(glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine, a putative metabolite of (+/–)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. Eur J Pharmacol 323(2–3): 173–180

Moldéus P, Högberg J, Orrenius S (1978) Isolation and use of liver cells. Methods Enzymol 52: 60–71

O'Shea E, Granados R, Esteban B, Colado MI, Green AR (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

Powers RH, Stadnicka A, Kalbfleish JH, Skibba JL (1992) Involvement of xanthine oxidase in oxidative stress and iron release during hyperthermic rat liver perfusion. Cancer Res 52: 1699–1703

Remião R, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML (2000) Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in freshly isolated rat hepatocytes and cardiomyocytes by HPLC with electrochemical detection. Biomed Chromatogr 14: 468–473

Skibba JL, Powers RH, Stadnicka A, Cullinane DW, Almagro UA, Kalbfleisch JH (1991) Oxidative stress as a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. Int J Hyperthermia 5: 749–761

Tehan B, Hardern R, Bodenham A (1993) Hyperthermia associated with 3,4-methylenedioxyethamphetamine ("eve"). Anaesthesia 48(6): 507–510

Walubo A, Seger D (1999) Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "ecstasy": case report and review of the literature. Hum Exp Toxicol 18: 119–125

TRABALHO II

Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and α-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates

Reprinted from Archives of Toxicology 78: 16-24

Copyright (2004) with kind permission from Springer-Verlag

Arch Toxicol (2004) 78: 16–24
DOI 10.1007/s00204-003-0510-7

ORGAN TOXICITY AND MECHANISMS

**Márcia Carvalho · Nuno Milhazes · Fernando Remião
Fernanda Borges · Eduarda Fernandes
Francisco Amado · Terrence J. Monks
Félix Carvalho · Maria Lourdes Bastos**

Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and α-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates

Received: 2 May 2003 / Accepted: 4 August 2003 / Published online: 28 October 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract The amphetamine designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") and its *N*-demethylated analogue 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA or "love") have been extensively used as recreational drugs of abuse. MDA itself is a main MDMA metabolite. MDMA abuse in humans has been associated with numerous reports of hepatocellular damage. Although MDMA undergoes extensive hepatic metabolism, the role of metabolites in MDMA-induced hepatotoxicity remains unclear. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of MDA and α-methyldopamine (α-MeDA), a major metabolite of MDA, in freshly isolated rat hepatocyte suspensions. The cells were incubated with MDA or α-MeDA at final concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, or 1.6 mM for 3 h. The toxic effects induced following incubation of hepatocyte suspensions with these metabolites were evaluated by measuring cell viability, the extent of lipid peroxidation, levels of glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG), the formation of GSH conjugates, and the activities of GSSG reductase (GR), GSH peroxidase (GPX), and GSH *S*-transferase (GST). MDA induced a concentration- and time-dependent GSH depletion, but had a negligible effect on lipid peroxidation, cell viability, or on the activities of GR, GPX, and GST. In contrast, α-MeDA (1.6 mM, 3 h) induced a marked depletion of GSH accompanied by a loss on cell viability, and decreases in GR, GPX and GST activities, although no significant effect on lipid peroxidation was found. For both metabolites, GSH depletion was not accompanied by increases in GSSG levels; rather, 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA were identified by HPLC-DAD/EC within cells incubated with MDA or α-MeDA. The results provide evidence that one of the early consequences of MDMA metabolism is a disruption of thiol homeostasis, which may result in loss of protein function and the initiation of a cascade of events leading to cellular damage.

Keywords 3,4-Methylenedioxyamphetamine · α-Methyldopamine · Rat hepatocytes · Glutathione conjugates

M. Carvalho (✉) · F. Remião · F. Carvalho · M. L. Bastos
REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050/047 Porto, Portugal
E-mail: marciacarvalho@ff.up.pt
Fax: +351-22-2003977

N. Milhazes · F. Borges
CEQOFFUP, Organic Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4050/047 Porto, Portugal

E. Fernandes
REQUIMTE, Physical-Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4050/047 Porto, Portugal

F. Amado
Department of Chemistry, University of Areiro, 3810/123 Areiro, Portugal

T. J. Monks
Center for Molecular and Cellular Toxicology, College of Pharmacy, University of Texas at Austin, Austin, TX 78712-1074, USA

Introduction

The amphetamine designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") and its *N*-demethylated analogue 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA or "love") have been used as recreational drugs of abuse, mainly among young people, due to their stimulant and hallucinogenic properties. However, MDMA and MDA produce a variety of systemic and organ-specific effects, including serotonergic neurotoxicity (Battaglia et al. 1987; Ricaurte et al. 2000), convulsions, hyperthermia, disseminated intravascular coagulation, rhabdomyolysis, and acute renal failure

(Simpson and Rumack 1981; Henry et al. 1992; Hegadoren et al. 1999; Walubo and Seger 1999). In the past decade, clinical evidence has increasingly shown that the liver is also a target of MDMA toxicity. Jaundice, hepatomegaly, centrilobular necrosis, hepatitis and fibrosis represent some of the adverse effects caused by MDMA in the liver (Henry et al. 1992; Dykhuizen et al. 1995; Khakoo et al. 1995; Ellis et al. 1996; Milroy et al. 1996; Fineschi et al. 1999; Varela-Rey et al. 1999). Various factors probably play a role in MDMA-induced liver toxicity, including the metabolism of MDMA, the increased efflux of neurotransmitters, the oxidation of biogenic amines, and hyperthermia. In fact, our group has shown recently that the toxic effects induced by MDMA in isolated mouse hepatocytes are exacerbated under hyperthermic conditions (Carvalho et al. 2001). However, in spite of the extensive hepatic metabolism of MDMA, the role of metabolites in MDMA-induced hepatotoxicity is still unclear. In view of this, the present work was performed to evaluate the effects of two main MDMA metabolites, MDA and α-methyldopamine (α-MeDA), in freshly isolated rat hepatocytes. MDA is not only a synthetic drug of abuse but it is also an important metabolite of MDMA (Cho et al. 1990). MDMA is metabolized to *N*-methyl-α-MeDA and α-MeDA (Lim and Foltz 1988; Kumagai et al. 1991), and MDA to α-MeDA (Marquardt et al. 1978). *N*-Methyl-α-MeDA and α-MeDA are catechols that can undergo oxidation to the corresponding *ortho*-quinones. Quinones are highly redox-active molecules, which can enter redox cycles through their semiquinone radicals, leading to the formation of reactive oxygen species (ROS), including the superoxide anion, hydrogen peroxide, and the hydroxyl radical. Alternatively, since the reactive *ortho*-quinone intermediates are Michael acceptors, they can promote cellular damage through an alkylation process with biomolecules such as crucial cellular proteins and/or DNA (Bolton et al. 2000). In the presence of glutathione (GSH), the *ortho*-quinone of α-MeDA undergoes conjugation with GSH to form (glutathion-*S*-yl)-α-MeDA adducts (Hiramatsu et al. 1990). The GSH conjugates remain redox active and may be readily oxidized to the *ortho*-quinone thioethers, which can be followed by reductive addition of a second molecule of GSH to yield 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (Miller et al. 1997). It must be stressed that these redox-active metabolites have been recently implicated in the mechanisms underlying MDMA-induced neurotoxicity (Miller et al. 1995, 1997; Bai et al. 1999, 2001) and nephrotoxicity (Carvalho et al. 2002b). To further elucidate the potential role of metabolites in MDMA-elicited hepatotoxicity, we evaluated the effects of MDA and α-MeDA on cell viability, the extent of lipid peroxidation, levels of glutathione and glutathione disulfide (GSSG), the formation of GSH conjugates, and the activities of GSSG reductase (GR), GSH peroxidase (GPX), and GSH *S*-transferase (GST) in isolated rat hepatocytes. Finally, high-performance liquid chromatography methodology with simultaneous combined electrochemical and diode-array analysis (HPLC-DAD/EC) was utilized to identify the GSH conjugates of these metabolites formed within the cells.

Materials and methods

Chemicals

All reagents used in this study were of analytical grade. Collagenase (type I), bovine serum albumin (fraction V), *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), ethylene glycol-*bis*(β-aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), reduced GSH, GSSG, GR (EC 1.6.4.2), 2-vinylpyridine, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (β-NADPH), β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (β-NADH), 5,5'-dithio-*bis*(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), pyruvic acid, 2-thiobarbituric acid (TBA), 1-octanesulfonic acid, γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT; EC 2.3.2.2) and all the reagents for enzymatic determinations were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Chloroacetic acid, citric acid, methanol (gradient grade), perchloric acid, and all other chemicals were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). 3,4-Methylenedioxyamphetamine (HCl salt) and α-methyldopamine (HBr salt) were synthesized in the Organic Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Porto University, Portugal. 5-(Glutathion-*S*-yl)-α-MeDA was synthesized in the Center for Molecular and Cellular Toxicology, College of Pharmacy, University of Texas, Austin, USA.

Animals

Male Wistar rats (200–250 g) were obtained from Charles-River Laboratories (Barcelona, Spain). Animals were acclimatized in polyethylene cages, lined with wood shavings, with wire-mesh tops, at an ambient temperature of 20 ± 2°C, humidity between 40 and 60% and 12 h/12 h light/dark cycle. The animals had free access to standard rat chow and drinking water, and were kept in the animal house for at least 1 week prior to use. Surgical procedures for the isolation of hepatocytes were performed under anesthesia and were carried out always between 9:00 a.m. and 10:00 a.m.

Hepatocyte isolation and incubation

Hepatocytes were isolated by collagenase perfusion as previously described (Moldéus et al. 1978). Cell viability at the initiation of the experiments was between 85% and 97%.

Incubations were performed in a shaking water bath (90 oscillations/min) at 37°C, using 10^6 cells/ml in Krebs-Henseleit buffer supplemented with 25 mM HEPES (pH 7.4), and gassed with an air stream of humidified carbogen. Isolated hepatocytes were pre-incubated for 30 min at 37°C and then incubated with MDA chloride or α-MeDA bromide at final concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, or 1.6 mM. Since α-MeDA is a light-sensitive unstable compound, all incubations were performed under light-protection conditions. Aliquots of the cell suspensions were taken at time zero and at hourly intervals for 3 h for the evaluation of cell viability, lipid peroxidation, GSH and GSSG levels. Selenium-dependent GPX, GR and GST activities were also quantified in cell suspension aliquots taken at time zero and after 3 h of incubation (samples were kept frozen at −80°C until assay, usually within 1 week). At the end of the experiments, aliquots of cell suspensions (10^6 cells) were collected and immediately centrifuged at 300 rpm for 2 min. The pellet was used for detection of GSH conjugates.

Biochemical analysis

Cell viability was determined after isolation by the Trypan blue exclusion test. During the course of the experiments cell viability was determined by the lactate dehydrogenase (LDH) leakage method, randomly confirmed by the Trypan blue exclusion test.

The extent of lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay at 535 nm as described before (Carvalho et al. 1997).

The GSH and GSSG contents of cell suspensions were determined by the DTNB–GSSG reductase recycling assay as described by Anderson (1985), with some modifications. Briefly, 200 µl of cell suspension aliquots were precipitated with 200 µl perchloric acid (5% final acid concentration) and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm in a refrigerated centrifuge (4°C). After this time, 100 µl acidic supernatant was neutralized with 100 µl 0.76 M $KHCO_3$ and the sample centrifuged for 1 min at 13,000 rpm. Fresh reagent, containing 0.69 mM NADPH and 4 mM DTNB in 72 mM phosphate buffer, was prepared daily. For measurement of total glutathione, 100 µl/well of samples, standards or blank were added in duplicate to 96-well microtiter plates, followed by 65 µl/well of the freshly prepared reagent. Plates were then incubated in a thermomax plate reader (PowerWaveX; Bio-Tek, Winooski, VT, USA) at 30°C for 10 min prior to the addition of 40 µl GR per well (10 IU/ml in phosphate buffer). The stoichmetric formation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) was followed for 2 min at 415 nm and compared with a standard curve. For the determination of GSSG, aliquots (200 µl) of acidic supernatant were treated with 10 µl 2-vinylpyridine and mixed continuously for 1 h for derivatization of GSH. GSSG was then measured as described above for total glutathione. The GSH levels were calculated by subtracting GSSG content from the total glutathione content ($GSH = GSH_t - 2 \times GSSG$).

For measurement of the activities of selenium-dependent GPX, GR and GST, aliquots of cell suspensions were sonicated for 12 s at medium intensity and then centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. GPX, GR, and GST activities were then determined in the supernatant as previously described (Carvalho et al. 2002a).

HPLC-DAD/EC analysis of GSH conjugates

The separation and characterization of GSH conjugates was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), equipped with an electrochemical (EC) and a photodiode array detector (DAD). HPLC analysis was performed using an autosampler injector (Gilson model 231-401), and a Spherisorb RP-18 (5 µm) column (Waters, Milford, MA, USA). A Coulochem II electrochemical detector (ESA, Chelmsford, MA, USA) equipped with a guard cell (ESA 5020) and an analytical cell (ESA 5010) was used. The electrochemical potential settings of the Coulochem II multidetector were: guard cell +0.45 V, detector 1 −0.1 V, and detector 2 +0.35 V. A current of 1–5 µA full-scale was used. A photodiode array detector (Waters model 2690) was placed before the analytical cell and the detection was performed at 292 nm, corresponding to the maximum absorption wavelength of the mono GSH-conjugates. A Compaq computer fitted with Millennium software (Waters) processed the chromatographic and spectral data.

The mobile phase (50 mM citric acid, 0.46 mM 1-octanesulfonic acid and 15% methanol, adjusted to pH 3.0 with 10 M NaOH) was filtered through a 0.45-µm membrane (Millipore, Madrid, Spain) and degassed under a helium stream. An isocratic elution was performed at 1.0 ml/min at room temperature.

Sample aliquots were treated with methanol for precipitation of protein and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. The supernatant was evaporated under a stream of nitrogen and then reconstituted to 150 µl with water. A volume of 100 µl was then injected into the HPLC system. The presence of the conjugates was confirmed by co-chromatography with 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA standards.

To strengthen sample peak identification of GSH conjugates, cell samples were sonicated (12 s at medium intensity) and then treated with γ-GT (8 IU in Krebs-Henseleit buffer) for 1 min before precipitation of proteins with methanol. UV spectra of peaks present in samples were obtained to corroborate identification of GSH conjugates.

Synthesis of 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA conjugate

A mixture of α-MeDA (2 mM), GSH (10 mM), and tyrosinase (5000 U) in 5 ml potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) was incubated for 1 min at 37°C. The reaction was then terminated by addition of 1 ml 15% perchloric acid. The reaction mixture was centrifuged, and 100 µl supernatant was injected into the HPLC-DAD/EC system. The mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate and 10% methanol (adjusted to pH 3.0), at a flow rate of 1.0 ml/min. The HPLC chromatogram revealed the presence of two major peaks corresponding to 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA conjugates, with retention times of 8 min and 16 min, respectively. The peak corresponding to 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA was confirmed after co-elution with 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA standard. Fractions containing 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA were collected and the structure confirmed by mass spectrometry (adapted from Miller et al. 1995).

Statistical analysis

Results are presented as means ± SEM (from five to eight experiments of different preparations of hepatocytes). Statistical comparisons between groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé's test. Changes in the studied parameters with time of incubation were evaluated by one-way repeated measures ANOVA (Huynh-Feldt adjustment). Significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

The toxic effects induced by MDA or α-MeDA on hepatocyte suspensions were evaluated by measuring cell viability, the extent of lipid peroxidation, levels of GSH, GSSG and total glutathione, and antioxidant enzyme activities. Figure 1 illustrates the viability of hepatocytes incubated with MDA or α-MeDA (both at 0.1–1.6 mM). At all tested concentrations, MDA had a negligible effect on cell viability, as measured by LDH leakage (Fig. 1A). In contrast, α-MeDA at the highest concentration tested (1.6 mM) induced a significant decrease in cell viability (cell death up to 43 ± 5%) after 3 h of incubation (Fig. 1B).

No lipid peroxidation was observed when cells were incubated with MDA or α-MeDA (0.1–1.6 mM, 3-h incubation) as measured by TBARS assay (data not shown). Both MDA and α-MeDA (0.1–1.6 mM) induced a concentration- and time-dependent GSH depletion (Fig. 2A,B, respectively). GSH depletion was clearly more marked for the catechol metabolite at the highest concentration studied. In fact, 1.6 mM MDA caused nearly 42% depletion of GSH after 2 h of incubation, whereas 1.6 mM α-MeDA caused an ~85% depletion of GSH, compared with controls. Differences were not evident at the lower tested concentrations. An important finding was that glutathione depletion induced by MDA

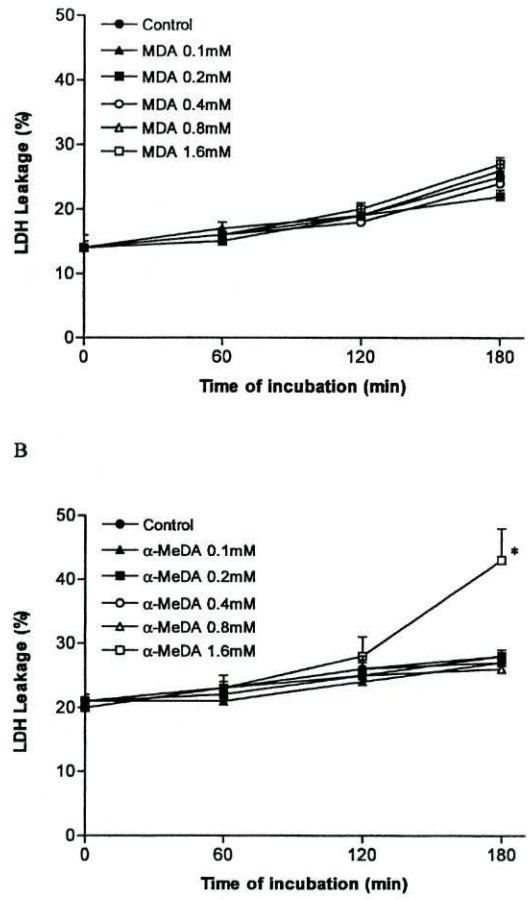


Fig. 1A,B Effect of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA; **A**) and its major metabolite α-methyldopamine (α-MeDA; **B**) on cell viability of hepatocyte suspensions as measured by percentage of lactate dehydrogenase (LDH) leakage. Data represent means ± SEM, $n = 5$–8; $^{*}P < 0.05$, compared with control

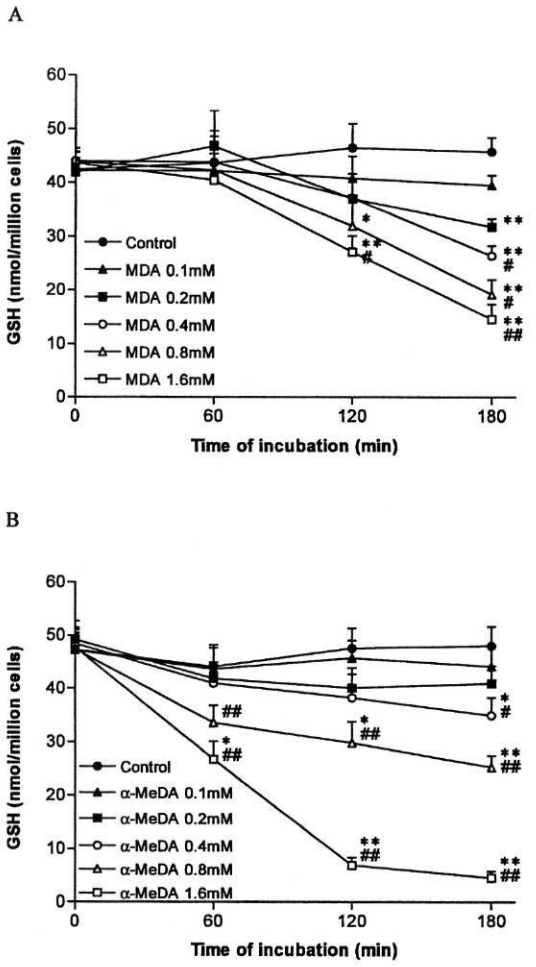


Fig. 2A,B Effect of MDA (**A**) and α-MeDA (**B**) on glutathione (GSH) levels in hepatocyte suspensions. Data represent means ± SEM, $n = 5$–8; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, compared with control; $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$, compared with time zero

or α-MeDA was not due to glutathione oxidation (Fig. 3A,B, respectively). In fact, no significant differences in GSSG levels were found when cells were treated with MDA (0.1–1.6 mM) or α-MeDA (0.1–0.8 mM). It is noteworthy that after the third hour of incubation, GSSG levels were significantly decreased by 1.6 mM α-MeDA, when compared with those of controls. Total glutathione content of cells incubated with 1.6 mM MDA was significantly reduced to 42% of control levels after 3 h of incubation, whereas with 1.6 mM α-MeDA total glutathione levels of cells were significantly reduced to 63% and 72% of control levels after 2 and 3 h of incubation, respectively (data not shown).

One of the aims of the present work was to identify putative GSH conjugates formed within cells incubated with MDA or α-MeDA; thus, an HPLC methodology was implemented to separate and identify these conjugates. In all HPLC-EC analyses of samples obtained from incubations with MDA, a predominant electroactive peak (with retention time of 12.5 min) was detected and identified as α-MeDA after coelution with authentic α-MeDA standard. Within this samples, the HPLC-DAD/EC system also demonstrated the presence of two mono GSH-conjugates in cells treated with 1.6 mM MDA for 3 h. The incubation of hepatocytes with 0.1–1.6 mM α-MeDA for 3 h resulted in a more expressive presence of the two mono GSH-conjugates (Fig. 4). Retention times for the 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA conjugates were 10.0 min (Fig. 4A) and 20.5 min (Fig. 4B), respectively, and were confirmed by co-chromatography with authentic standards. The appearance of two peaks in each of the standards and samples is due to the presence of diastereomers. In previous work, using different chromatographic conditions, we were able to completely separate these two peaks and confirm their identity by mass spectrometry (unpublished data). Furthermore, it was observed that the peaks corresponding to the GSH conjugates completely disappeared when samples were treated with γ-GT, an enzyme known to cleave the γ-glutamyl bond of GSH

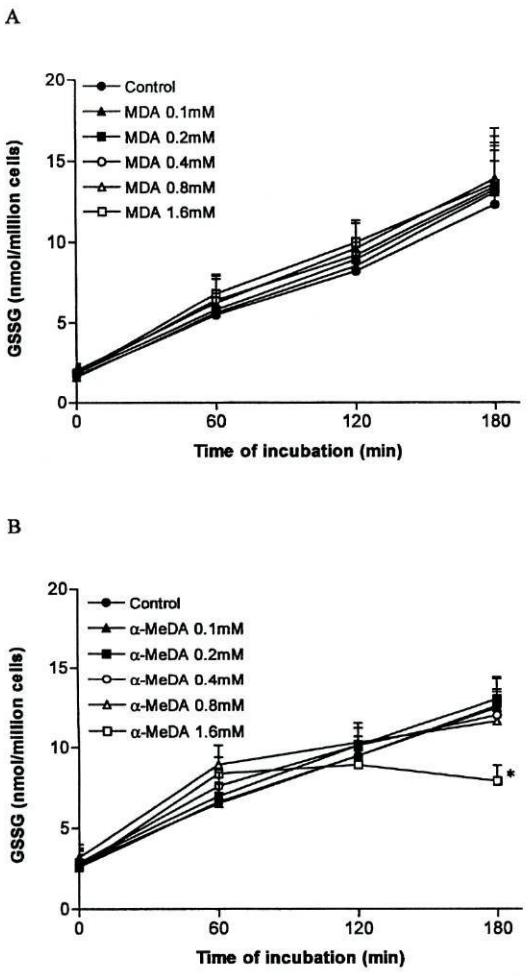


Fig. 3A,B Effect of MDA (**A**) and α-MeDA (**B**) on glutathione disulfide (GSSG) levels in hepatocyte suspensions. Data represent means ± SEM, $n = 5–8$; $^*P < 0.05$, compared with control

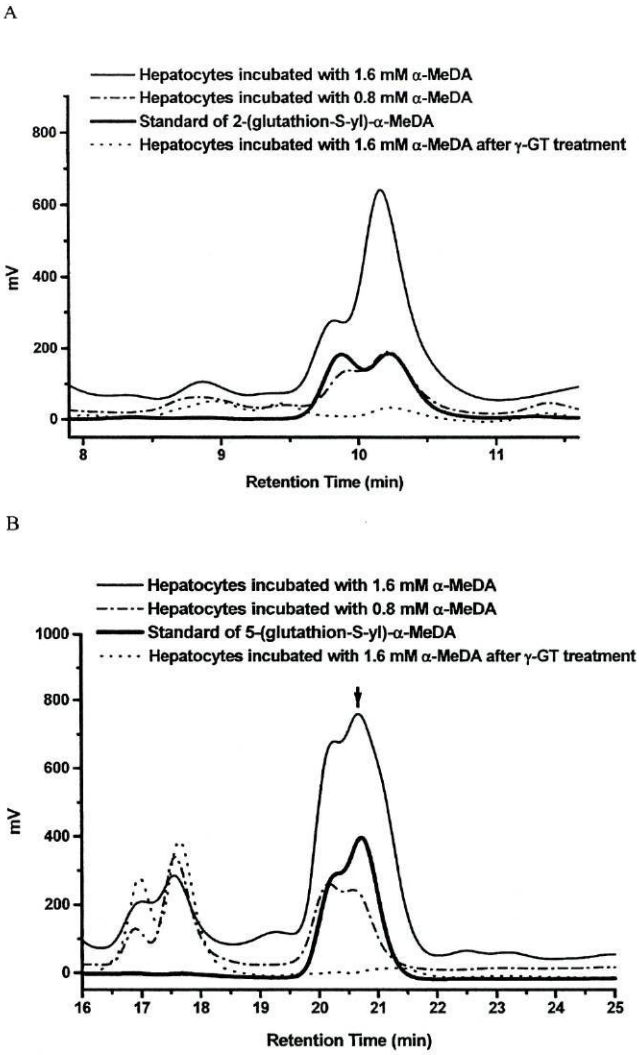


Fig. 4A,B Chromatograms from electrochemical detection HPLC showing the peaks corresponding to the 2-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine (**A**) and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine (**B**) conjugates formed within cells incubated with 0.8 mM or 1.6 mM α-methyldopamine (α-MeDA) for 3 h, and their respective standards. Peaks obtained from cells incubated with 1.6 mM α-MeDA after treatment with γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT) are also presented. Experimental details are stated in "Materials and methods"

(Fig. 4A,B). Although the purpose of the present work was not the quantification of these GSH conjugates, it was observed that 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA formation in cells incubated with α-MeDA correlated with decreases in the concentration of α-MeDA in the incubation medium (as shown in Fig. 4A,B by hepatocytes incubated with α-MeDA at a final concentration of 0.8 mM and 1.6 mM). A comparison of the UV spectra of the 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA conjugate present in the α-MeDa treated cells with that of the respective standard is shown in Fig. 5. The same UV pattern was also observed for 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA conjugate (data not shown). UV spectra of the GSH-conjugate peaks detected in samples exhibited three λ_{max}, at 236 nm, 256 nm and 292 nm, which are characteristic of *S*-glutathionyl conjugates of catecholamines (Spencer et al. 1998).

Finally, the enzymatic activities of GR, GST, and GPX were also evaluated. No significant differences in GR, GPX and GST activities were observed after incubation of hepatocyte suspensions with 0.1–1.6 mM MDA (data not shown). In contrast, the activity of each of these enzymes was significantly lower in samples incubated with 1.6 mM α-MeDA (3 h) than in control samples (Fig. 6). GPX was the most susceptible to inhibition, decreasing to 32% of initial activity, whereas GR and GST activities decreased to only 62% and 55% of initial activity, respectively.

Discussion

MDA is a hepatic-derived metabolite of MDMA (Lim and Foltz 1988). Metabolic activation to a reactive

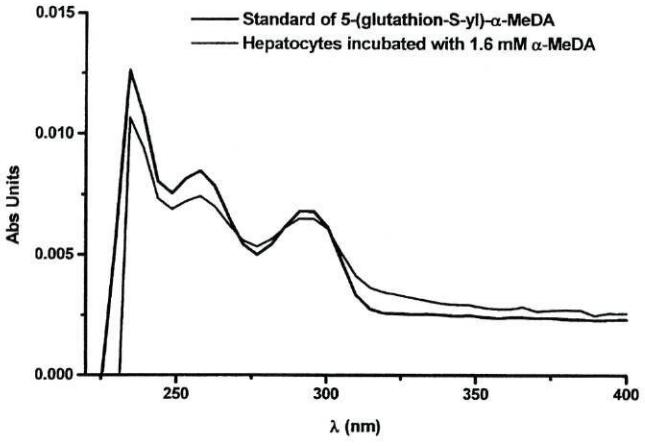


Fig. 5 Comparative UV spectra of the 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA conjugate present in hepatocyte suspensions incubated with α-methyldopamine (α-MeDA) and the respective standard

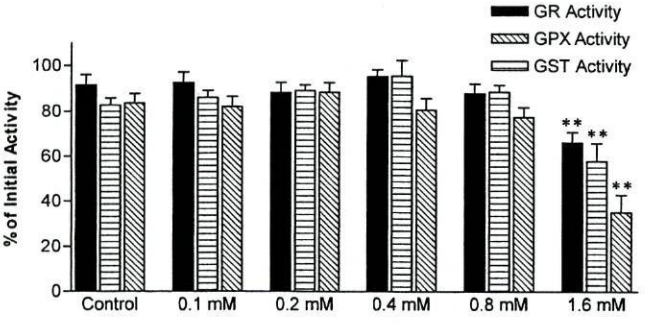


Fig. 6 Percentage of GSSG reductase (GR), GSH peroxidase (GPX) and GSH *S*-transferase (GST) activities in hepatocyte suspensions after 3 h of incubation with α-MeDA, relative to initial activities. Data represent means ±SEM, $n=7$–8; $^{**}P<0.01$, compared with control

metabolite capable of conjugating with GSH has been shown for MDMA and MDA (Hiramatsu et al. 1990). MDMA is *N*-demethylated to MDA, and MDA is demethylenated to α-MeDA by cytochromes P450 2D, 2B and 3A1 (Bai et al. 1999; Kreth et al. 2000). α-MeDA undergoes spontaneous oxidation to the corresponding *ortho*-quinone, which is a highly reactive molecule that can redox cycle with its semiquinone radical, leading to the generation of ROS or reactive nitrogen species (see Fig. 7) (Bolton et al. 2000).

Alternatively, the *ortho*-quinone formed by oxidation of α-MeDA is readily conjugated with GSH to form 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and/or 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA, which themselves may be readily oxidized to *ortho*-quinones followed by the addition of a second molecule of GSH to form 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (Miller et al. 1997). These thioether conjugates of α-MeDA not only preserve but also enhance the biological activity of the parent compounds. In fact, electrochemical studies indicate that the thioether conjugates of α-MeDA exhibit lower half-wave oxidation potentials than α-MeDA, and thus are potentially more reactive (Bai et al. 1999).

In the present study, a time- and concentration-dependent depletion of GSH was found to occur in rat hepatocytes following exposure to MDA or α-MeDA. The GSH depletion was clearly more marked for the catechol metabolite at the highest concentration studied. The fact that GSH depletion obtained with the lowest concentrations of MDA and α-MeDA was similar indicates that, probably, the effect of MDA is due to its conversion into α-MeDA. In fact, in the present study the metabolism of MDA was observed to occur in hepatocytes since the catechol metabolite α-MeDA and the conjugates of α-MeDA with GSH were detected within cells incubated with MDA. The resulting depletion of GSH has already been reported after MDMA exposure of isolated rat (Beitia et al. 1999) and mouse (Carvalho et al. 2001) hepatocytes. As an endogenous antioxidant, GSH is known to play a crucial protective role against cellular injury, which is due to its oxidant neutralizing, lipid peroxidase and/or tocopheryl-radical regenerating activities (Di Mascio et al. 1991). Thus, GSH depletion may render the cells more exposed to the effects of reactive compounds, ROS and reactive nitrogen species being formed within the cells, leading to deleterious effects in hepatocytes.

Despite changes in GSH homeostasis, incubation of freshly isolated rat hepatocytes with MDA did not result in any modification of cell viability or lipid redox status, suggesting that the lower intracellular GSH concentrations are sufficient to protect hepatocytes against oxidative damage. However, after the marked GSH depletion observed in hepatocyte suspensions incubated with the highest concentration of α-MeDA, concentrations of GSH are insufficient to prevent cell death (Fig. 1). These results are in agreement with previous reports (cited in Reed 1990), which showed that cytotoxicity as measured by lipid peroxidation, cell necrosis, and loss of intracellular enzymes in vivo and in vitro occurs only if the intracellular concentrations of GSH fall below 10–15% of the initial value. It must also be stressed that anorexia, hypoxia, and hyperthermia are well-known physiological conditions induced by MDMA in vivo that may strongly contribute to cell death when GSH is no longer available for protection.

2-(Glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA, were identified and characterized in freshly isolated rat hepatocytes after incubation with MDA or α-MeDA (Fig. 4). The intracellular formation of GSH conjugates helps to explain the observed decrease in GSH levels without the corresponding enhancement in GSSG levels.

The ability of polyphenolic thioether conjugates to undergo redox cycling and produce ROS provides a rationale for the potential role of these metabolites in MDA and MDMA hepatotoxicity. *N*-Methyl-α-MeDA, a metabolite of MDMA, and α-MeDA, a metabolite of MDA and MDMA, have been implicated in the neurotoxicity of the respective parent amphetamines following their biotransformation into the corresponding thioether conjugates (Miller et al. 1996, 1997; Bai et al.

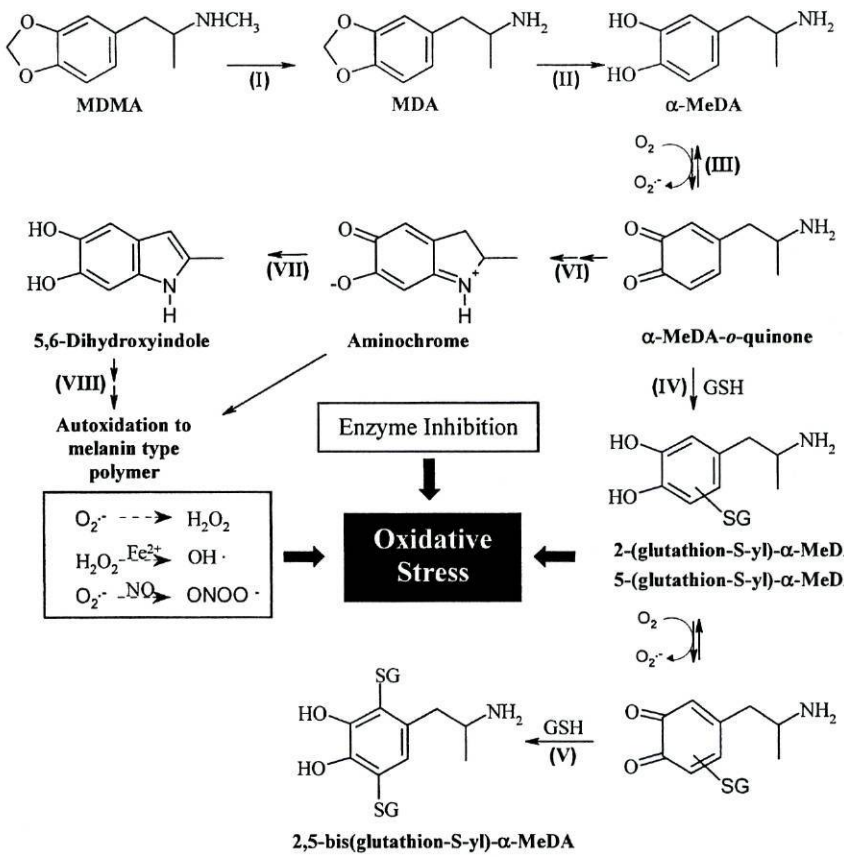


Fig. 7 Schematic presentation of possible metabolic pathway of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in liver. Microsomal *N*-demethylation of MDMA to MDA (*I*) and demethylenation of MDA to α-methyldopamine (α-MeDA) (*II*) followed by *ortho*-quinone formation (*III*) and glutathione conjugation (*IV*, *V*). On cyclization, the *ortho*-quinone of α-MeDA may give rise to the formation of an aminochrome (*VI*) and related compounds, such as 5,6-dihydroxyindoles (*VII*), which can undergo further oxidation and polymerization to form brown or black insoluble pigments of melanin type (*VIII*)

1999). In fact, when injected directly into brain, MDMA and MDA are not neurotoxic. In contrast, direct injection of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA reproduces the toxicity observed following peripheral administration of MDA (Miller et al. 1996, 1997; Bai et al. 1999).

Consistent with known pathways of catecholamine oxidation, incubation of rat hepatocytes with α-MeDA resulted in the formation of orange-colored aminochromes. Furthermore, as the oxidation progressed, dark brown/black turbidity appeared in the medium, a consequence of melanin-type polymer formation (Bindoli et al. 1992; Zhang and Dryhurst 1994). It was already reported that oxidation of dopamine by tyrosinase gives rise to a black, insoluble polymer only when the concentrations of sulfhydryls such as GSH and cysteine are low relative to those of dopamine (Carstam et al. 1991; Zhang and Dryhurst 1994). Consistent with these reports, the formation of black pigments in the incubation medium of cells incubated with α-MeDA only occurs as a late-stage event, probably resulting from the depleted GSH concentrations (and of the antioxidant defense system) being unable to react with the *ortho*-quinones being formed within cells (with the result of further oxidation of quinones to melanin-type polymers). In fact, α-MeDA-*ortho*-quinone can be further oxidized in a process that involves an irreversible 1,4-intramolecular cyclization reaction, resulting in the formation of aminochromes (colored pigments) and related compounds, such as 5,6-dihydroxyindoles, which eventually leads to the appearance of brown or black insoluble polymers of the melanin type (see Fig. 7) (Bindoli et al. 1989, 1992). Importantly, the catecholamine autoxidation process can be accelerated under physiological conditions by oxidative enzymes, such as xanthine oxidase, peroxidase, lipoxygenase, several copper-containing catechol oxidases, or in presence of metal ions such as Cu^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, and several Cu^{2+} and Fe^{3+} chelates (Bindoli et al. 1992).

Melanins represent a large group of chemically active and potentially toxic substances (Hegedus 2000). In the presence of Fe^{3+}, synthetic melanin can catalyze a Fenton-type reaction, which generates the hydroxyl radical and initiates lipid peroxidation (Ben-Shachar et al. 1991). Thus, future work is therefore clearly required to investigate the toxicity exerted by these polymers in hepatocytes.

Ortho-quinones and aminochromes can interact with various nucleophiles in the cell; of particular importance are the reactions with thiol groups, which are present in cysteine, GSH and proteins. The ability of 1.6 mM α-MeDA to inhibit GR, GPX, and GST activities may thus be related to either the oxidation or alkylation of sulfhydryl groups present within the enzymes' active site. *Ortho*-quinones and aminochromes can inhibit enzymes that possess either a GSH-binding site and/or cysteine residues that are critical for enzyme function (Ommen et al. 1991; Bindoli et al. 1992). Several quinones are

known to cause irreversible inhibition of GST (Ommen et al. 1991; Monks and Lau 1992). The GSTs catalyze the nucleophilic attack of GSH on electrophilic substrates, thereby protecting various cell components from potentially damaging reactive electrophiles (Mannervik and Danielson 1988; Armstrong 1991; van Bladeren 2000). Most GST isoenzymes possess a nucleophilic amino acid, which is rapidily modified by quinones, a reaction that inactivates the enzyme (Ploemen et al. 1991), and the 5-(*S*-glutathionyl) conjugates of dopamine and α-methyldopa inhibit human GSTs (Ploemen et al. 1994). Interestingly, GSH conjugates of several quinones also react rapidly with GST (thereby inactivating the enzyme). Therefore, the presence of a GSH moiety may serve to target the quinone to the enzyme (Ommen et al. 1991). The activity of GR, which catalyzes the NADPH-dependent reduction of GSSG to GSH, is crucial to maintain a high cellular GSH/GSSG ratio. Inhibition of GR and GST by quinones, as well as GR, GPX and GST by aminochromes, has been reported (Remião et al. 1999, 2002).

Taken together, it seems likely that *ortho*-quinones, aminochromes and ROS generated during catecholamine oxidation reactions may all participate in α-MeDA-induced enzyme inhibition. Inhibition of these enzymes can increase the oxidative stress resulting from α-MeDA oxidation.

The toxicity of MDA and α-MeDA in freshly isolated rat hepatocytes has not been previously reported. The present results indicate that oxidative stress may play a part in the first step of MDMA-induced liver damage. The loss of GSH and the modification of enzyme activities by oxidized α-MeDA clearly shows that one of the early consequences of MDMA and MDA metabolism is a disruption of thiol homeostasis, which may result in loss of protein function and initiation of a cascade of events leading to cellular damage. GSH in conjunction with GPX/GR is responsible for the elimination of cellular hydrogen peroxide (H_2O_2) and organic peroxides. Thus, depletion of GSH and/or decreased activity of these enzymes may compromise this pathway, thereby allowing H_2O_2 to accumulate to toxic levels. It must be stressed that hepatic mitochondria are especially vulnerable to this effect since they lack the H_2O_2 metabolizing enzyme catalase (DeLeve and Kaplowitz 1991). Alternatively, the loss of GSH may lead to alterations in normal cellular metabolism and lead to the increased accumulation of ROS.

In conclusion, present findings show that MDA and α-MeDA induce toxicity in freshly isolated rat hepatocytes. The toxic effects are characterized by a loss of GSH homeostasis due to conjugation of GSH with α-MeDA, decreases in the antioxidant enzyme activities, and cell death. Thus, it can be postulated that the metabolism of MDMA and MDA, resulting in the formation of the highly reactive compounds *N*-Me-α-MeDA and α-MeDA, and α-MeDA, respectively, is one of the main causes of their hepatotoxic effects.

Acknowledgements This work was supported by PhD grants from Fundação para a Ciência e Tecnologia (Praxis XXI/BD/20087/99 and Praxis XXI/BD/18520/98) and Programa Operacional Ciência, Tecnologia e Inovação (POCTI), Portugal, in co-participation with Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) (project POCTI/36099/FCB/2000). The experiments are declared to comply with the current laws of Portugal.

References

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol 113:548–555

Armstrong RN (1991) Glutathione *S*-transferases: reaction mechanism, structure, and function. Chem Res Toxicol 4:131–140

Bai F, Lau SS, Monks TJ (1999) Glutathione and *N*-acetylcysteine conjugates of α-methyldopamine produce serotoninergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. Chem Res Toxicol 12:1150–1157

Bai F, Jones DC, Lau SS, Monks TJ (2001) Serotonergic neurotoxicity of 3,4-(±)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(±)-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) is potentiated by inhibition of γ-glutamyl transpeptidase. Chem Res Toxicol 14:863–870

Battaglia G, Yeh SY, O'Hearn E, Molliver ME, Kuhar MJ, Sousa EBD (1987) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [^{3}H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites. J Pharmacol Exp Ther 242:911–916

Beitia G, Cobreros A, Sainz L, Cenarruzabeitia E (1999) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced hepatotoxicity: effect on cytosolic calcium signals in isolated hepatocytes. Liver 19:234–241

Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB (1991) Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. J Neurochem 57:1609–1614

Bindoli A, Rigobello MP, Galzigna L (1989) Toxicity of aminochromes. Toxicol Lett 48:3–20

Bindoli A, Rigobello MP, Deeble DJ (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. Free Radic Biol Med 13:391–405

Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol 13:135–160

Carstam R, Brinck C, Hindemith-Augustsson A, Rorsman H, Rosengren E (1991) The neuromelanin of the human substancia nigra. Biochim Biophys Acta 1097:152–160

Carvalho F, Remião F, Soares ME, Catarino R, Queiroz G, Bastos ML (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, Carvalho F, Bastos ML (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 MdL, Pires-das-Neves R, Bastos MdL (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, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML (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

Cho AK, Hiramatsu M, Distefano EW, Chang AS, Jenden DJ (1990) Stereochemical differences in the metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in vivo and in vitro: a pharmacokinetic analysis. Drug Metab Dispos 18:686–691

DeLeve LD, Kaplowitz N (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. Pharmacol Ther 52:287–305

Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am J Clin Nutr 53:194S–200S

Dykhuizen RS, Brunt PW, Atkinson P, Simpson JG, Smith CC (1995) Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. Gut 36:939–941

Ellis A, Wendon J, Portmann B, Williams R (1996) Acute liver damage and ecstasy ingestion. Gut 38:454–458

Fineschi V, Centini F, Mazzeo E, Turillazzi E (1999) Adam (MDMA) and Eve (MDA) misuse: an immunohistochemical study on three fatal cases. Forensic Sci Int 104:65–74

Hegadoren KM, Baker GB, Bourin M (1999) 3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. Neurosci Biobehav Rev 23:539–553

Hegedus ZL (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

Henry JA, Jeffreys KJ, Dawling S (1992) Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). Lancet 340:384–387

Hiramatsu M, Kumagai Y, Unger SE, Cho AK (1990) Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. J Pharmacol Exp Ther 254:521–527

Khakoo S, Coles C, Armstrong J, Barry R (1995) Hepatotoxicity and accelerated fibrosis following 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") usage. J Clin Gastroenterol 20:244–247

Kreth K-P, Kovar K-A, Schwab M, Zanger UM (2000) Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "ecstasy"-related designer drugs. Biochem Pharmacol 59:1563–1571

Kumagai Y, Lin LY, Schmitz DA, Cho AK (1991) Hydroxyl radical mediated demethylenation of (methylenedioxy)phenyl compounds. Chem Res Toxicol 4:330–334

Lim HK, Foltz RL (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

Mannervik B, Danielson UH (1988) Glutathione transferases-structure and catalytic activity. CRC Crit Rev Biochem 23:283–337

Marquardt GM, DiStefano V, Ling LL (1978) Metabolism of β-3,4-methylenedioxyamphetamine in the rat. Biochem Pharmacol 27:1503–1505

Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1995) Metabolism of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine following intracerebroventricular administration to male Sprague-Dawley rats. Chem Res Toxicol 8:634–641

Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1996) Effects of intracerebroventricular administration of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine on brain dopamine, serotonin, and norepinephrine concentrations in male Sprague-Dawley rats. Chem Res Toxicol 9:457–465

Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1997) 2,5-*bis*-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine, a putative metabolite of (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. Eur J Pharmacol 323:173–180

Milroy CM, Clark JC, Forrest ARW (1996) Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. J Clin Pathol 49:149–153

Moldéus P, Hogberg J, Orrenius S (1978) Isolation and use of liver cells. Methods Enzymol 52:60–71

Monks TJ, Lau SS (1992) Toxicology of quinone-thioethers. Crit Rev Toxicol 22:243–270

Ommen BV, Ploemen JHTM, Bogaards JJP, Monks TJ, Lau SS, Bladeren PJV (1991) Irreversible inhibition of rat glutathione *S*-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. Structure–activity relationship and mechanism. Biochem J 276:661–666

Ploemen JH, Ommen BV, Bladeren PJV (1991) Irreversible inhibition of human glutathione *S*-transferase isoenzymes by tetrachloro-1,4-benzoquinone and its glutathione conjugate. Biochem Pharmacol 41:1665–1669

Ploemen JH, Ommen BV, Haan AD, Venekamp JV, Bladeren PJV (1994) Inhibition of human glutathione *S*-transferases by dopamine, α-methyldopa and their 5-*S*-glutathionyl conjugates. Chem Biol Interact 90:87–99

Reed DJ (1990) Glutathione: toxicological implications. Annu Rev Toxicol 30:603–631

Remião F, Carmo H, Carvalho FD, Bastos ML (1999) Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. J Enzyme Inhib 15:47–61

Remião F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho FD, Bastos ML (2002) Cu^{2+}-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. Chem Res Toxicol 15:861–869

Ricaurte GA, Yuan J, McCann UD (2000) (±)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. Neuropsychobiology 42:5–10

Simpson DL, Rumack BH (1981) Methylenedioxyamphetamine. Clinical description of overdose, death, and review of pharmacology. Arch Intern Med 141:1507–1509

Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B (1998) Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. J Neurochem 71:2112–2122

van Bladeren PJ (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. Chem Biol Interact 129:61–76

Varela-Rey M, Montiel-Duarte C, Beitia G, Cenarruzabeitia E, Iraburu MJ (1999) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") stimulates the expression of α1 (I) procollagen mRNA in hepatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 259:678–682

Walubo A, Seger D (1999) Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "ecstasy": case report and review of the literature. Hum Exp Toxicol 18:119–125

Zhang F, 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

TRABALHO III

The toxicity of N-methyl-α-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine

Reprinted from Toxicology 200: 193-203

Copyright (2004) with kind permission from Elsevier Science Ltd

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Toxicology 200 (2004) 193–203
TOXICOLOGY
www.elsevier.com/locate/toxicol

The toxicity of *N*-methyl-α-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and *N*-acetylcysteine

Márcia Carvalho [a,*], Fernando Remião [a], Nuno Milhazes [b], Fernanda Borges [b], Eduarda Fernandes [a], Félix Carvalho [a], Maria Lourdes Bastos [a]

[a] *REQUIMTE, Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4099/030 Porto, Portugal*
[b] *Serviço de Química Orgânica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4099/030 Porto, Portugal*

Received 19 February 2004; received in revised form 26 March 2004; accepted 30 March 2004
Available online 1 Jun 2004

Abstract

In the past decade, clinical evidence has increasingly shown that the liver is a target organ for 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") toxicity. The aims of the present in vitro study were: (1) to evaluate and compare the hepatotoxic effects of MDMA and one of its main metabolites, *N*-methyl-α-methyldopamine (*N*-Me-α-MeDA) and (2) to investigate the ability of antioxidants, namely ascorbic acid and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), to prevent *N*-Me-α-MeDA-induced toxic injury, using freshly isolated rat hepatocytes. Cell suspensions were incubated with MDMA or *N*-Me-α-MeDA in the final concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 mM for 3 h. To evaluate the potential protective effects of antioxidants, cells were preincubated with ascorbic acid in the final concentrations of 0.1 and 0.5 mM, or NAC in the final concentrations of 0.1 and 1 mM for 15 min before treatment with 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA for 3 h (throughout this incubation period the cells were exposed to both compounds). The toxic effects were evaluated by measuring the cell viability, glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG), ATP, and the cellular activities of GSH peroxidase (GPX), GSSG reductase (GR), and GSH *S*-transferase (GST).

MDMA induced a concentration- and time-dependent GSH depletion, but had a negligible effect on cell viability, ATP levels, or on the activities of GR, GPX, and GST. In contrast, *N*-Me-α-MeDA was shown to induce not only a concentration- and time-dependent depletion of GSH, but also a depletion of ATP levels accompanied by a loss in cell viability, and decreases in the antioxidant enzyme activities. For both compounds, GSH depletion was not accompanied by increases in GSSG levels, which seems to indicate GSH depletion by adduct formation. Importantly, the presence of ascorbic acid (0.5 mM) or NAC (1 mM) prevented cell death and GSH depletion induced by *N*-Me-α-MeDA.

The results provide evidence that MDMA and its metabolite *N*-Me-α-MeDA induce toxicity to freshly isolated rat hepatocytes. Oxidative stress may play a major role in *N*-Me-α-MeDA-induced hepatic toxicity since antioxidant defense systems are impaired and administration of antioxidants prevented *N*-Me-α-MeDA toxicity.
© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ecstasy; *N*-methyl-α-methyldopamine; Toxicity; Hepatocytes; Oxidative stress; Antioxidants; Ascorbic acid; *N*-acetylcysteine

* Corresponding author. Tel.: +351-222078979; fax: +351-222003977.
E-mail address: marciacarvalho@ff.up.pt (M. Carvalho).

0300-483X/$ – see front matter © 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tox.2004.03.016

1. Introduction

The abuse of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), a popular recreational drug commonly known as "ecstasy", has been associated to several clinical reports of liver damage, namely jaundice (Milroy et al., 1996), hepatomegaly (Milroy et al., 1996), centrilobular necrosis (Milroy et al., 1996), hepatitis (Dykhuizen et al., 1995), fibrosis (Khakoo et al., 1995; Varela-Rey et al., 1999), and liver failure (Ellis et al., 1996; Greene et al., 2003; Henry et al., 1992).

Although there is irrefutable evidence of MDMA-induced hepatocellular damage, the mechanism(s) responsible for that toxicity remain to be thoroughly clarified. One proposed mechanism suggests that MDMA metabolism into reactive metabolites is responsible for the MDMA hepatotoxicity. The metabolism of MDMA involves *N*-demethylation to MDA (Fig. 1). MDMA and MDA are *o*-demethylenated to *N*-methyl-α-methyldopamine (*N*-Me-α-MeDA) and α-MeDA, respectively (Kumagai et al., 1991; Lim and Foltz, 1988; Marquardt et al., 1978), both of which are catechols that can undergo oxidation to the corresponding *o*-quinones (Fig. 1). Quinones are highly redox active molecules that can undergo redox cycling, which originates semiquinone radicals and leads to the generation of reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) (Bolton et al., 2000). Quinones can also be oxidized, in a process which involves an irreversible 1,4-intramolecular cyclization reaction, resulting in the formation of aminochromes and other related compounds, which eventually leads to the appearance of brown or black insoluble polymers of the melanin type (Bindoli et al., 1992; Bindoli et al., 1989). Alternatively, as the reactive *o*-quinone intermediates are electrophilic compounds, cellular damage can occur through alkylation of crucial cellular proteins and/or DNA (Bolton et al., 2000). In the presence of glutathione (GSH), *o*-quinone may be conjugated to form a glutathionyl adduct (Hiramatsu et al., 1990). This GSH conjugate remains redox active being readily oxidized to the quinone–thioether, which can undergo further reaction with GSH and/or protein thiols (Miller et al., 1997). Taking all together, MDMA metabolism leading to the formation of ROS and/or toxic oxidation products and/or GSH depletion may represent the triggering factor responsible for the hepatotoxicity exerted by this amphetamine.

Our group has already shown that two major MDMA metabolites, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and α-methyldopamine (α-MeDA), induce toxicity in freshly isolated rat hepatocytes (Carvalho et al., 2004a). To further elucidate the potential role of metabolites in MDMA-elicited hepatotoxicity, we are now evaluating and comparing the effects of MDMA

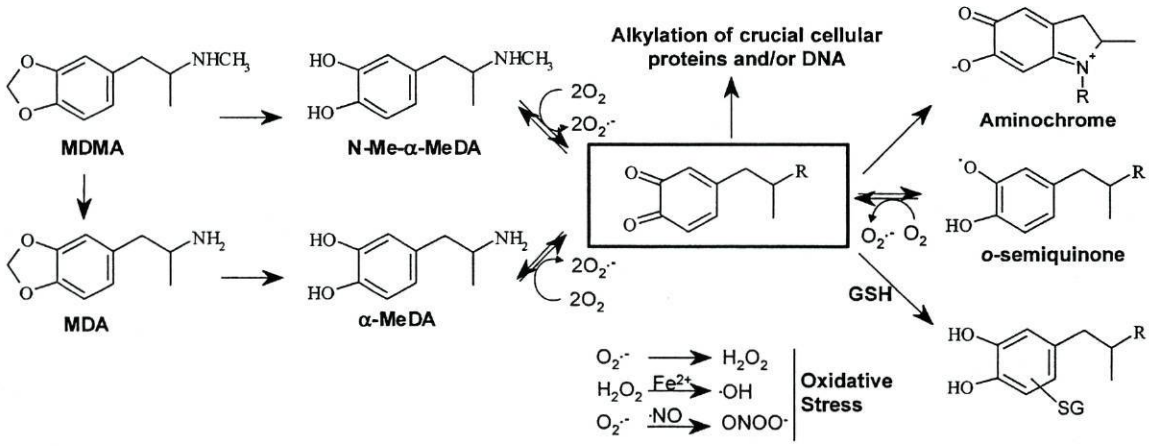


Fig. 1. Proposed pathway for MDMA conversion into hepatotoxic metabolites. MDMA can undergo *N*-demethylation to MDA. Cytochrome P450-mediates demethylenation of MDMA and MDA to *N*-Me-α-MeDA and α-MeDA, respectively. The catechols are readily oxidized to the corresponding *o*-quinones, which can enter redox cycling leading to formation of ROS and RNS. On cyclization, *o*-quinones give rise to the formation of aminochromes. Alternatively, *o*-quinones can react readily with GSH to form the corresponding GSH conjugates.

and *N*-Me-α-MeDA on cell viability, levels of GSH, glutathione disulfide (GSSG), and ATP, and on the activities of GSSG reductase (GR), GSH peroxidase (GPX), and GSH *S*-transferase (GST) in isolated rat hepatocytes. Moreover, in view of the great ability of *N*-Me-α-MeDA to suffer oxidation and thus induce oxidative stress, it might be expected that antioxidants counteract the effect not only of injurious catecholamine-related species but also of deleterious ROS and RNS. To our knowledge, no studies have yet been performed in vivo or in vitro to ascertain the effects of antioxidants on the hepatotoxicity of MDMA and/or its metabolites. Thus, the possible protective effects of ascorbic acid and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) against *N*-Me-α-MeDA-induced toxicity in isolated rat hepatocytes were also investigated in the present study.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Collagenase (type I) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in this study were of analytical grade. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (HCl salt) and *N*-methyl-α-methyldopamine (HCl salt) were synthesized in the Organic Chemistry Department, University of Porto, Portugal.

2.2. Hepatocyte isolation and incubation

Hepatocytes were isolated by collagenase perfusion as previously described (Moldéus et al., 1978). Adult male Wistar rats (Charles-River Laboratories, Barcelona, Spain), weighing 250–350 g, were used. Cell viability at the beginning of the experiments was 90 ± 5%.

Incubations were performed in a shaking water bath (90 oscillations/min) at 37 °C, using 10^6 cells/mL in Krebs–Henseleit buffer supplemented with 25 mM HEPES (pH 7.4), and gassed with an air stream of carbogen. Isolated hepatocytes were pre-incubated for 30 min at 37 °C and then incubated with MDMA or *N*-Me-α-MeDA at a final concentration of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, or 1.6 mM for 3 h. Since *N*-Me-α-MeDA is a light sensitive unstable compound, all incubations were performed with light protection. Sample aliquots taken at time 0 and at hourly intervals for 3 h were used for the evaluation of cell viability, and levels of GSH, GSSG, and ATP. Selenium-dependent GPX, GR, and GST activities were also quantified in aliquots taken at time 0 and after 3 h of incubation (samples were kept frozen at −80 °C until assay).

To evaluate the potential protective effects of antioxidants, cells were pre-incubated with ascorbic acid in the final concentrations of 0.1 and 0.5 mM, or NAC in the final concentrations of 0.1 and 1 mM for 15 min before treatment with 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA for 3 h (throughout this incubation period the cells were exposed to both compounds). Sample aliquots were taken at time 0 and after 3 h of incubation for the evaluation of cell viability, and levels of GSH and GSSG.

2.3. Biochemical analysis

Cell viability was determined after isolation by the trypan blue exclusion test. During the course of the experiments, cell viability was determined by the LDH leakage method, randomly confirmed by the trypan blue exclusion test.

The GSH and GSSG content of cell suspensions were determined by the DTNB–GSSG reductase recycling assay as described before (Carvalho et al., 2004a).

Measurement of the adenine nucleotide ATP in hepatocytes was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection, accordingly to a previously reported method (Stocchi et al., 1985), with slight modifications. Briefly, sample aliquots (100 μL) were treated with 10% perchloric acid (100 μL) for protein precipitation and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. The supernatant (100 μL) was neutralized with 0.76 M $KHCO_3$ (100 μL) and centrifuged for 1 min at 13,000 rpm. A volume of 100 μL was then injected into the HPLC system. A Waters Spherisorb RP-18 (5 μm) analytical column was used. The mobile phase consisted of 0.1 M KH_2PO_4, adjusted to pH 6.8. An isocratic elution was achieved at 1.0 mL/min at room temperature and detection was performed at 254 nm. Quantitative measurements were carried out by injection of standard solutions of known concentrations of ATP. A Compaq computer fitted with Millennium software from Waters processed the chromatographic data.

For the determination of selenium-dependent GPX, GR, and GST activity, aliquots of cell suspensions were sonicated for 12 s at medium intensity and then centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The GPX, GR, and GST activities were determined in the supernatant as previously described (Carvalho et al., 2002).

2.4. Statistical analysis

Results are given as means ± S.E.M. (from three to five experiments of different preparations of hepatocytes). Statistical comparisons between groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé's test. Significance was accepted at P less than 0.05.

3. Results

The toxic effects induced by MDMA or *N*-Me-α-MeDA to hepatocyte suspensions were evaluated by measuring cell viability, levels of GSH, GSSG, and ATP, and antioxidant enzyme activities. MDMA had a negligible effect on cell viability, as measured by LDH leakage, at any of the tested concentrations (data not shown). Fig. 2 illustrates the viability of hepatocytes incubated with *N*-Me-α-MeDA. Notably, this MDMA metabolite induced a concentration-dependent loss of cell viability. Of note, this effect reached more than 90% after 3 h of incubation with the highest concentration tested (1.6 mM). Both MDMA and *N*-Me-α-MeDA induced a concentration- and time-dependent GSH depletion (Fig. 3A and B, respectively). GSH depletion was clearly more marked for the catechol metabolite at the highest concentrations studied (0.8 and 1.6 mM). Differences were not evident at lower concentrations tested. However, GSH depletion induced by MDMA or *N*-Me-α-MeDA was not accompanied by a corresponding increase in GSSG levels (Fig. 4A and B, respectively). Nevertheless, a comparison of Figs. 3B and 4B reveals a large increase in the GSSG/GSH quotient after *N*-Me-α-MeDA treatment, indicative of oxidative stress.

The incubation medium of cell suspensions exposed to *N*-Me-α-MeDA (1.6 mM) became strongly red-colored within 2 h of incubation, and progressively changed to a dark brown color with the appearance of insoluble black pigments. The appearance of red chromophores in the incubation medium is characteristic of aminochrome formation and the insoluble black pigments formed are likely to be melanin type (Bindoli et al., 1992; Bindoli et al., 1989).

The energy status of the cells was also evaluated. ATP levels were significantly decreased in cell suspensions incubated with 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA (Fig. 5), but no significant differences were observed at any of the tested MDMA concentrations (data not shown).

Another parameter evaluated, which is important for the cell response to oxidative stress, was the

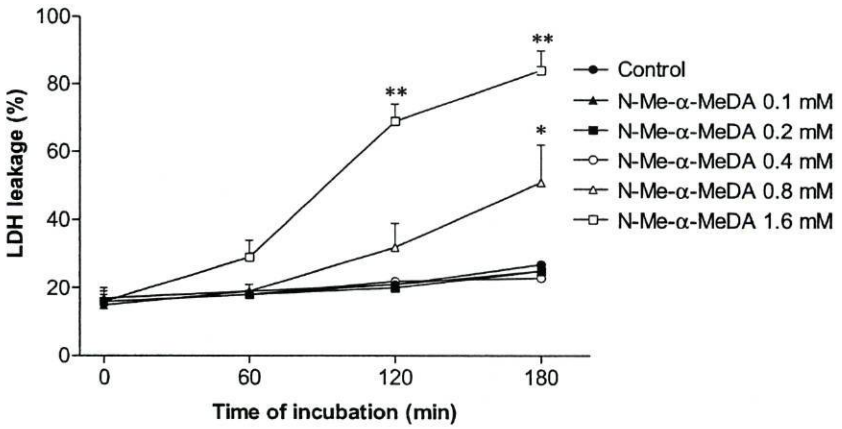


Fig. 2. Effect of *N*-Me-α-MeDA on cell viability in hepatocyte suspensions. Data represent mean ± S.E.M. from five experiments; $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$, compared with control.

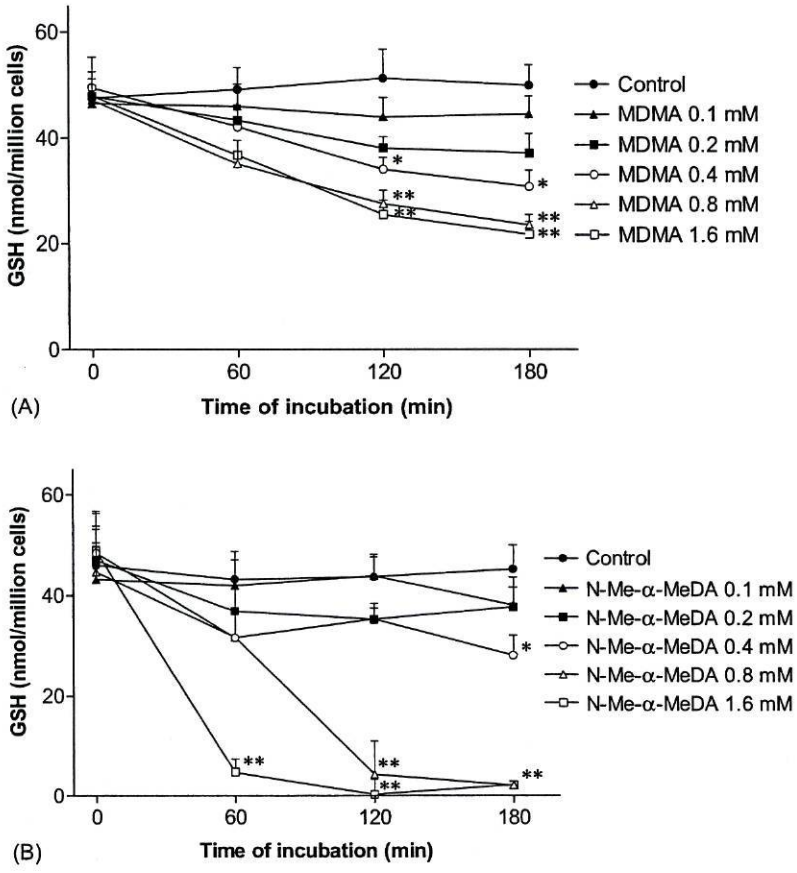


Fig. 3. Effect of MDMA (A) and *N*-Me-α-MeDA (B) on GSH levels in hepatocyte suspensions. Data represent means ± S.E.M. from four experiments; $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$, compared with control.

activity of the enzymes GR, GST, and GPX. No significant differences in GR, GPX, and GST activities were observed after incubation of hepatocyte suspensions with 0.1–1.6 mM MDMA (data not shown). In contrast, the activity of these enzymes was significantly decreased in cell suspensions incubated with 0.8 or 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA for 3 h comparatively to control cells (Fig. 6). In what concerns to the study of the capability of antioxidants to protect against *N*-Me-α-MeDA-induced toxicity in isolated hepatocytes, it was found that 0.5 mM ascorbic acid and 1 mM NAC effectively prevented cell death (Fig. 7) and GSH depletion (Fig. 8) induced by 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA after 3 h of incubation. Moreover, in the presence of ascorbic acid (0.5 mM) or NAC (1 mM), the incubation medium remained colorless throughout the incubation period. No significant effects were observed on GSSG levels of hepatocyte suspensions exposed to *N*-Me-α-MeDA in presence of ascorbic acid (0.1 and 0.5 mM) or 0.1 mM NAC, but 1 mM NAC induced a significant decrease on GSSG levels, when compared with control (Fig. 9). Ascorbic acid or NAC treatment alone had no statistically significant effect on cell viability, levels of GSH or GSSG, with exception of cells exposed to 1 mM NAC where a significant decrease on GSSG levels was observed ($P < 0.05$; data not shown).

4. Discussion

In the present study, MDMA and its metabolite *N*-Me-α-MeDA induced toxicity in isolated rat hepatocytes. While the GSH depleting capacity was already

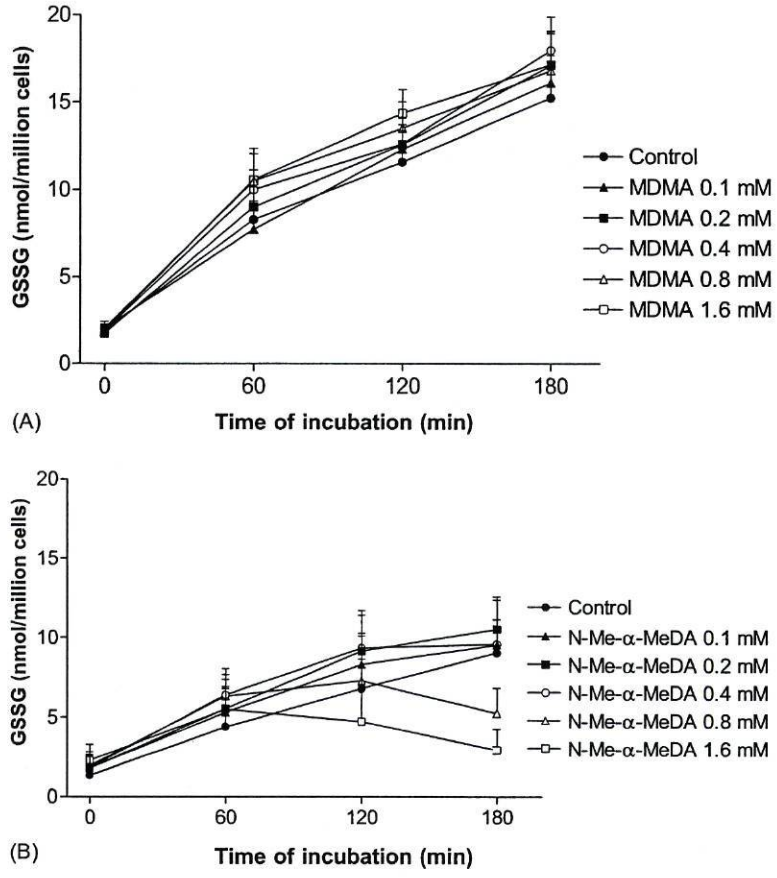


Fig. 4. Effect of MDMA (A) and *N*-Me-α-MeDA (B) on GSSG levels in hepatocyte suspensions. Data represent means ± S.E.M. from four experiments.

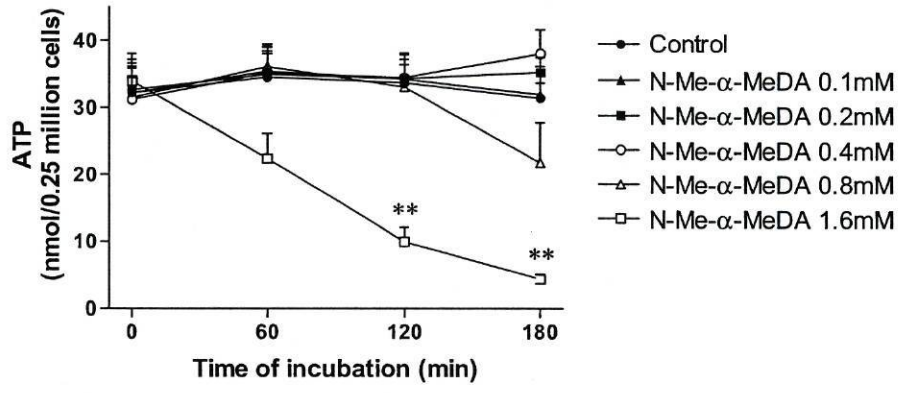


Fig. 5. Effect of *N*-Me-α-MeDA on ATP levels in hepatocyte suspensions. Data represent means ± S.E.M. from four experiments; $^{**}P < 0.01$, compared with control.

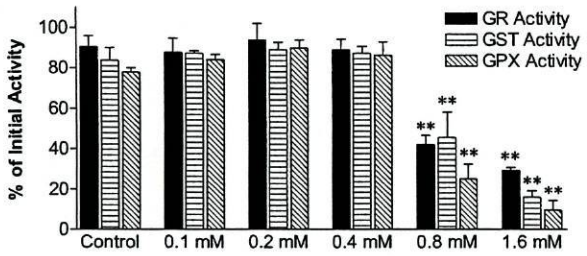


Fig. 6. Percentage of GR, GST, and GPX activities after 3 h of *N*-Me-α-MeDA incubation in hepatocyte suspensions relative to initial activities. Data represent means ± S.E.M. from four experiments; $^{**}P < 0.01$, compared with control.

known, the toxicity of *N*-Me-α-MeDA in freshly isolated rat hepatocytes is reported for the first time in the present study.

There are still no reports on the literature concerning the levels of demethylenated metabolites of MDMA in the liver of either humans or experimental animals. However, there is one report stating the plasma levels of *N*-Me-α-MeDA in human volunteers (Segura et al., 2001). In that study, it was observed that *N*-Me-α-MeDA attains plasma concentrations similar to those of MDMA. Importantly, tissue concentrations of MDMA and its metabolites have been found to be substantially higher (up to 18 times) than blood concentrations (Garcia-Repetto et al., 2003; Sticht et al., 2003). Taking into account that most of the cases of serious toxicity or fatality have involved

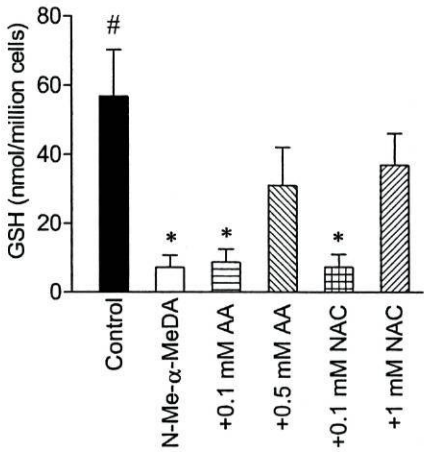


Fig. 8. Effect of ascorbic acid (0.1 and 0.5 mM) and NAC (0.1 and 1 mM) on GSH levels of hepatocyte suspensions exposed to 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA for 3 h. Ascorbic acid or NAC treatment alone was not statistically different from control ($P > 0.88$ for all cases). Data represent means ± S.E.M. from three to four experiments; $^{*}P < 0.05$, compared with control; $^{\#}P < 0.05$, compared with *N*-Me-α-MeDA.

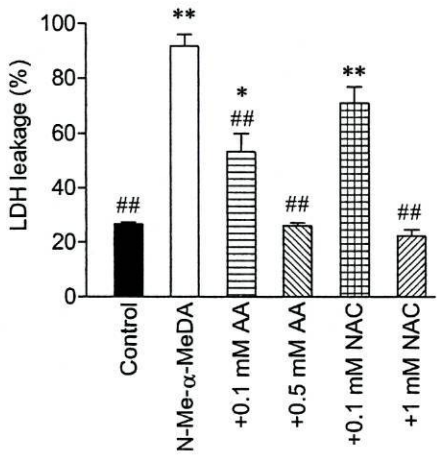


Fig. 7. Effect of ascorbic acid (0.1 and 0.5 mM) and NAC (0.1 and 1 mM) on cell viability of hepatocyte suspensions exposed to 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA for 3 h. Ascorbic acid or NAC treatment alone was not statistically different from control ($P > 0.99$ for all cases). Data represent means ± S.E.M. from three to four experiments; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, compared with control; $^{\#\#}P < 0.01$, compared with *N*-Me-α-MeDA.

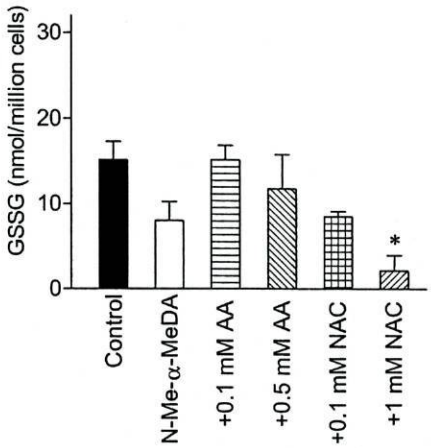


Fig. 9. Effect of ascorbic acid (0.1 and 0.5 mM) and NAC (0.1 and 1 mM) on GSSG levels of hepatocyte suspensions exposed to 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA for 3 h. Ascorbic acid or NAC treatment alone was not statistically different from control ($P > 0.98$), with exception for 1 mM NAC where a significant decrease on GSSG levels was observed ($P < 0.05$). Data represent means ± S.E.M. from three to four experiments; $^{*}P < 0.05$, compared with control.

MDMA blood levels ranging from 2.5 to 50 μM, the concentrations used in the present study are most likely attained in the in vivo situation. Thus, new studies are needed to verify which liver concentrations are achieved for MDMA and its toxic metabolites during intoxications in humans with this drug of abuse.

Accordingly to what has been postulated for catecholic toxicants, the mechanism underlying *N*-Me-α-MeDA-induced toxicity is thought to involve the inherent reactivity of the catechol moiety of the molecule. *N*-Me-α-MeDA certainly undergoes oxidation to the corresponding *o*-quinone (see Fig. 1), which may suffer redox cycling, leading to the generation of ROS, including superoxide anion, hydrogen peroxide, and ultimately the hydroxyl radical (Bolton et al., 2000). Superoxide anion may react with nitric oxide to form peroxynitrite ($ONOO^-$), which is a powerful cytotoxic species (Halliwell et al., 1999). Production of ROS and RNS can cause oxidative stress within cells through the formation of oxidized cellular macromolecules, including lipids, proteins, and DNA. Importantly, quinones also react readily with cellular nucleophiles and this too can lead to cytotoxicity. Reduced sulfhydryl groups in the form of free cysteine, GSH, or cysteinyl residues on proteins are strong nucleophiles within the cell. In our previous study (Carvalho et al., 2004a), the mono *S*-glutathionyl conjugates of α-MeDA, 2-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA, were identified and characterized in freshly isolated rat hepatocytes which were incubated with this MDMA metabolite. Importantly, the glutathionyl adduct of *N*-Me-α-MeDA was already detected in rat liver microsomes (Hiramatsu et al., 1990). In the present study, a time- and concentration-dependent depletion of GSH was found to occur in rat hepatocytes following MDMA or *N*-Me-α-MeDA exposure (Fig. 3A and B), which was clearly more drastic for the catechol metabolite at the highest concentrations studied. The intracellular formation of GSH-conjugates helps to explain the observed loss of GSH without the corresponding increase in the levels of GSSG (Fig. 4A and B). GSH depletion has already been reported after MDMA exposure in isolated rat (Beitia et al., 1999) and mouse (Carvalho et al., 2001) hepatocytes. Since GSH is a crucial endogenous antioxidant in cell protection (Di Mascio et al., 1991), its depletion may render the cells more exposed to the effects of reactive compounds, ROS and RNS being formed within the cells, leading to deleterious effects in hepatocytes.

Despite changes in GSH homeostasis, incubation of freshly isolated rat hepatocytes with MDMA produced no significant loss of cell viability, suggesting that the remaining intracellular GSH concentrations are probably still sufficient to protect hepatocytes against MDMA-induced toxicity. However, after the marked GSH depletion observed in hepatocyte suspensions incubated with 0.8 and 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA, cellular GSH levels are insufficient to prevent cell death (Fig. 2). These results are in agreement with previous reports cited in (Reed, 1990), which showed that cytotoxicity, as measured by lipid peroxidation, cell necrosis, and loss of intracellular enzyme activities, occurs only if the intracellular concentrations of GSH falls below 10–15% of the initial value. It must also be stressed that anorexia, hypoxia, and hyperthermia are well-known physiological conditions induced by MDMA in vivo which may strongly contribute for cell death when GSH is no longer available for protection.

Consistent with known pathways of catecholamine oxidation, incubation of rat hepatocytes with *N*-Me-α-MeDA resulted in the formation of red-colored aminochromes. In accordance with this result, we have recently identified, by mass spectrometry, the formation of *N*-methyl-α-methyldopaminochrome in the incubation medium of rat cardiomyocyte suspensions exposed to *N*-Me-α-MeDA (Carvalho et al., 2004b). This aminochrome can also undergo further oxidation. In fact, as the oxidation progressed, a dark brown/black turbidity appeared in the incubation medium, a consequence of melanin type polymer formation (Bindoli et al., 1992; Zhang and Dryhurst, 1994). In line with our previous studies in hepatocytes (Carvalho et al., 2004a) and cardiomyocytes (Carvalho et al., 2004b), the formation of black pigments in the incubation medium of cells incubated with MDMA catechol metabolite only occurs as a late stage event, probably resulting from the depleted GSH concentrations (and of the enzymatic antioxidant defense system), exposing cells to the *o*-quinones that are constantly being formed (with the result of further oxidation of quinones to melanin type polymers).

The ability of *N*-Me-α-MeDA (0.8–1.6 mM, 3 h) to inhibit the activities of GR, GPX, and GST (Fig. 6) may be related to either the oxidation or alkylation of sulfhydryl groups present within the enzyme active

site. GR, GPX, and GST inhibition was already reported to occur in rat hepatocyte suspensions exposed to α-MeDA (Carvalho et al., 2004a). *o*-Quinones, aminochromes, and GSH conjugates are known to cause irreversible inhibition of enzymes that possess either a GSH-binding site and/or cysteine residues critical for enzyme function (Bindoli et al., 1992; Monks and Lau, 1992; Ommen et al., 1991). Inhibition of GR and GST by quinones, as well as GR, GPX, and GST by aminochromes has been reported before (Remião et al., 1999; Remião et al., 2002). Inhibition of these enzymes can increase the oxidative stress resulting from *N*-Me-α-MeDA oxidation.

Another toxic event observed in cells exposed to *N*-Me-α-MeDA was the depletion of cellular ATP levels, which was greater than 85% after 3 h of incubation with the highest concentration tested (Fig. 5). It was already shown that MDMA administration causes a rapid and transient inhibition of mitochondrial function (Burrows et al., 2000), although the mechanisms are not completely understood. Altered thiol homeostasis may contribute to mitochondrial dysfunction. Furthermore, quinones and aminochromes have been reported to affect mitochondrial energy processes (Bindoli et al., 1992; Taam et al., 1986). Consequently, disruption of cellular energetics by *N*-Me-α-MeDA may contribute to the process of oxidative stress that appears to mediate *N*-Me-α-MeDA-induced toxicity.

As shown in Fig. 1, ROS and RNS may be formed at various steps during *N*-Me-α-MeDA oxidation processes. Therefore, in addition to the direct reactions of oxidative products of *N*-Me-α-MeDA, radical damage might ensue involving the superoxide anion or, via the iron-catalyzed Haber–Weiss mechanism, the hydroxyl radical. Antioxidants are thus expected to reduce the production not only of injurious catecholamine-related species but also of deleterious ROS and RNS. In accordance with this concept, the addition of 0.5 mM ascorbic acid or 1 mM NAC prevented cell death (Fig. 7) and GSH depletion (Fig. 8) caused by 1.6 mM *N*-Me-α-MeDA. The protection elicited by these antioxidants against *N*-Me-α-MeDA toxicity is almost certainly related to their effectiveness in keeping *N*-Me-α-MeDA in its reduced state and/or to the scavenging effect against ROS and RNS. The direct ability of ascorbic acid to scavenge ROS and RNS is well known (Carr and Frei, 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999). Ascorbic acid acts as a two electron reducing agent and confers protection by donating an electron to reduce free radicals, thus neutralizing these species prior to their reaction with biological molecules (Carr and Frei, 1999; Evans and Halliwell, 2001). In addition to scavenging ROS/RNS, ascorbic acid can regenerate other small molecule antioxidants, such as α-tocopherol, glutathione, urate, and β-carotene, from their respective radical species (Carr and Frei, 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999). In this study, ascorbic acid may quench radicals generated during the redox cycling of *N*-Me-α-MeDA-*o*-quinone and/or reduce or prevent the formation of oxidation byproducts from *N*-Me-α-MeDA, namely semiquinones and *o*-quinones, and thus prevent *N*-Me-α-MeDA-induced toxicity. This theory is supported by the fact that GSH depletion (due to conjugation of *N*-Me-α-MeDA-*o*-quinone with GSH) or red-colored aminochrome formation were not observed in the presence of this antioxidant.

It is stated that ascorbic acid can also exert pro-oxidant properties in vitro, which are attributed to the formation of ROS in the presence of transition metal ions (Halliwell and Gutteridge, 1999). Thus, the ability of ascorbic acid to exert both pro-oxidant and antioxidant effects make difficult the speculations of an in vivo possible beneficial effect of ascorbic acid in treating MDMA liver injury. Studies using in vivo models should be carried out to determine the therapeutical relevance of our findings.

The sulfur-containing antioxidant NAC has been widely used as an antioxidant in several in vitro experiments and is effective in the treatment of paracetamol overdosage in humans. NAC within cells is hydrolyzed to cysteine enabling GSH synthesis (Deneke, 2000). Additionally, NAC may directly scavenge several ROS and RNS (Halliwell and Gutteridge, 1999) or may react with the *o*-quinone, which prevents the recycling of this compound to *N*-Me-α-MeDA.

In the present study, NAC (1 mM) appears to be protective against *N*-Me-α-MeDA toxicity without involving GSH. This may appear to be contradictory, but evidence is mounting for a direct role of NAC in scavenging free radicals and protecting against oxidative damage (Shaikh et al., 1999). The effectiveness of NAC in humans suffering from MDMA-induced liver damage has not yet been elucidated, although intravenous administration of NAC is a routine clinical

procedure for treating hepatic dysfunctions and acute liver failure, as observed in patients intoxicated with MDMA (Greene et al., 2003).

Taking all together, the results obtained in the present study suggest that metabolism of MDMA into highly reactive catechol metabolites is one of the main causes of MDMA-induced hepatotoxicity in vivo. Of note, toxic effects induced by *N*-Me-α-MeDA are more pronounced than those found with the catechol metabolite α-MeDA (Carvalho et al., 2004a). In addition, these results clearly show that cellular antioxidant defense systems (endogenous reductants along with detoxifying enzymes) are impaired after exposure to *N*-Me-α-MeDA, which may contribute to increase oxidative stress resulting from ROS and RNS being formed within hepatic cells. Moreover, it should be pointed out that one of the consequences of MDMA abuse is anorexia or loss of appetite, which could decrease the intake of ascorbic acid, cysteine (the precursor of GSH synthesis) and other antioxidants from dietary sources, thereby accelerating free radical damage and the occurrence of oxidative stress.

In conclusion, present findings strongly indicate that oxidative stress resulting from *N*-Me-α-MeDA oxidation is involved in the mechanism of toxicity of *N*-Me-α-MeDA, and probably also of MDMA, in isolated rat hepatocytes. Protection can be derived from treatment with antioxidants, namely ascorbic acid and NAC. Future in vivo studies are clearly necessary in order to ascertain the potential benefits of antioxidant intervention.

Acknowledgements

This work was supported by Ph.D. grants from FCT (Praxis XXI/BD/20087/99 and Praxis XXI/BD/18520/98) and POCTI, Portugal, and by FEDER European Community funding (Project POCTI/36099/FCB/2000).

References

Beitia, G., Cobreros, A., Sainz, L., Cenarruzabeitia, E., 1999. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced hepatotoxicity: effect on cytosolic calcium signals in isolated hepatocytes. Liver 19, 234–241.

Bindoli, A., Rigobello, M.P., 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., Galzigna, L., 1989. Toxicity of aminochromes. Toxicol. Lett. 48, 3–20.

Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. Chem. Res. Toxicol. 13, 135–160.

Burrows, K., Gudelsky, G., Yamamoto, B., 2000. Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration. Eur. J. Pharmacol. 398, 11–18.

Carr, A., Frei, B., 1999. Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? FASEB J. 13, 1007–1024.

Carvalho, M., Carvalho, F., 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., Bastos, M.L., 2002. 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., Milhazes, N., Remião, F., Borges, F., Fernandes, E., Monks, T., Amado, F., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2004a. Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and a-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. Arch. Toxicol. 78, 16–24.

Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Monteiro, M.C., Gonçalves, M.J., Seabra, V., Amado, F., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2004b. Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. Chem. Res. Toxicol. 17, 623–632.

Deneke, S.M., 2000. Thiol-based antioxidants. Curr. Top. Cell Regul. 36, 151–180.

Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am. J. Clin. Nutr. 53, 194S–200S.

Dykhuizen, R.S., Brunt, P.W., Atkinson, P., Simpson, J.G., Smith, C.C., 1995. Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. Gut 36, 939–941.

Ellis, A., Wendon, J., Portmann, B., Williams, R., 1996. Acute liver damage and ecstasy ingestion. Gut 38, 454–458.

Evans, P., Halliwell, B., 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. Br. J. Nutr. 85, S67–S74.

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.

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.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York.

Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M., 1999. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. Free Radic. Res. 31, 651–669.

Henry, J.A., Jeffreys, K.J., Dawling, S., 1992. Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). Lancet 340, 384–387.

Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Unger, S.E., Cho, A.K., 1990. Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. J. Pharmacol. Exp. Ther. 254, 521–527.

Khakoo, S., Coles, C., Armstrong, J., Barry, R., 1995. Hepatotoxicity and accelerated fibrosis following 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy') usage. J. Clin. Gastroenterol. 20, 244–247.

Kumagai, Y., Lin, L.Y., Schmitz, D.A., Cho, A.K., 1991. Hydroxyl radical mediated demethylenation of (methylenedioxy)phenyl compounds. Chem. Res. Toxicol. 4, 330–334.

Lim, H.K., 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.

Marquardt, G.M., DiStefano, V., Ling, L.L., 1978. Metabolism of beta-3,4-methylenedioxyamphetamine in the rat. Biochem. Pharmacol. 27, 1503–1505.

Miller, R.T., Lau, S.S., Monks, T.J., 1997. 2,5-bis-(Glutathion-*S*-yl)-a-methyldopamine, a putative metabolite of (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. Eur. J. Pharmacol. 323, 173–180.

Milroy, C.M., Clark, J.C., Forrest, A.R.W., 1996. Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. J. Clin. Pathol. 49, 149–153.

Moldéus, P., Hogberg, J., Orrenius, S., 1978. Isolation and use of liver cells. Methods enzymol. 52, 60–71.

Monks, T.J., Lau, S.S., 1992. Toxicology of quinone-thioethers. Crit. Rev. Toxicol. 22, 243–270.

Ommen, B.V., Ploemen, J.H.T.M., Bogaards, J.J.P., Monks, T.J., Lau, S.S., Bladeren, P.J.V., 1991. Irreversible inhibition of rat glutathione *S*-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. Structure–activity relationship and mechanism. Biochem. J. 276, 661–666.

Reed, D.J., 1990. Glutathione: toxicological implications. Ann. Rev. Toxicol. 30, 603–631.

Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F.D., Bastos, M.L., 1999. Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. J Enzym Inhib 15, 47–61.

Remião, F., Carvalho, M., Carmo, H., Carvalho, F.D., Bastos, M.L., 2002. Cu^{2+}-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. Chem. Res. Toxicol. 15, 861–869.

Segura, M., Ortuno, J., Farre, M., McLure, J.A., Pujadas, M., Pizarro, N., Llebaria, A., Joglar, J., Roset, P.N., Segura, J., Torre, R.d.L., 2001. 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. Chem. Res. Toxicol. 14, 1203–1208.

Shaikh, Z.A., Vu, T.T., Zaman, K., 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154, 256–263.

Sticht, G., Pluisch, F., Bierhoff, E., Kaferstein, H., 2003. Fatal outcome of Ecstasy overdose. Arch. Kriminol. 211, 73–80.

Stocchi, V., Cucchiarini, L., Magnani, M., Chiarantini, L., Palma, P., Crescentini, G., 1985. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. Anal. Biochem. 146, 118–124.

Taam, G.M., Takeo, S., Ziegelhoffer, A., Singal, P.K., Beamish, R.E., Dhalla, N.S., 1986. Effect of adrenochrome on adenine nucleotides and mitochondrial oxidative phosphorylation in rat heart. Can. J. Cardiol. 2, 88–93.

Varela-Rey, M., Montiel-Duarte, C., Beitia, G., Cenarruzabeitia, E., Iraburu, M.J., 1999. 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") stimulates the expression of a1 (I) procollagen mRNA in hepatic stellate cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 259, 678–682.

Zhang, F., 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.

11. ENSAIOS *IN VITRO* DA NEFROTOXICIDADE DA 3,4-METILENO-DIOXIMETANFETAMINA E DOS SEUS METABOLITOS

A avaliação da acção nefrotóxica da MDMA e dos seus metabolitos, *in vitro*, foi realizada recorrendo aos seguintes parâmetros:

- Estudo da relação concentração-efeito para a MDMA e seus metabolitos (**Trabalho IV**). Para tal, as culturas primárias de células tubulares proximais renais humanas e de rato Wistar foram expostas à MDMA, MDA, α-MeDA, 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA nas concentrações finais de 0,1 a 0,8 mM, durante 24 horas. O biomarcador de efeito determinado foi a viabilidade celular.
- Estudo da contribuição das diferentes vias metabólicas na nefrotoxicidade induzida pelos conjugados 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA, recorrendo a inibidores enzimáticos selectivos, nomeadamente a acivicina para a γ-GT e a bestatina para a aminopeptidase M (**Trabalho IV**).

TRABALHO IV

Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells

Reprinted from Archives of Toxicology 76: 581-588

Copyright (2002) with kind permission from Springer-Verlag

Arch Toxicol (2002) 76: 581–588
DOI 10.1007/s00204-002-0381-3

ORGAN TOXICITY AND MECHANISMS

**Márcia Carvalho · Gabrielle Hawksworth
Nuno Milhazes · Fernanda Borges · Terrence J. Monks
Eduarda Fernandes · Félix Carvalho
MariaLourdes Bastos**

Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells

Received: 25 March 2002 / Accepted: 17 June 2002 / Published online: 1 August 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract The metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) has recently been implicated in the mechanisms underlying ecstasy-induced neurotoxicity and hepatotoxicity. However, its potential role in ecstasy-induced kidney toxicity has yet to be investigated. Thus, primary cultures of rat and human renal proximal tubular cells (PTCs) were used to investigate the cytotoxicity induced by MDMA and its metabolites methylenedioxyamphetamine (MDA), α-methyldopamine (α-MeDA), and the glutathione (GSH) conjugates 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA. Cell viability was evaluated using the mitochondrial MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. MDMA and MDA were not found to be toxic to either rat or human PTCs at any concentration tested (100–800 μM). In contrast, 800 μM α-MeDA caused 60% and 40% cell death in rat and human PTCs, respectively. Conjugation of α-MeDA with GSH resulted in the formation of even more potent nephrotoxicants. Thus, exposure of rat and human PTC monolayers to 400 μM 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA caused approximately 80% and 70% cell death, respectively. 5-(Glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (400 μM) was more toxic than 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA to rat renal PTCs but equally potent in human renal PTCs. Pre-incubation of rat PTCs with either acivicin, an inhibitor of γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT), or bestatin, an inhibitor of aminopeptidase M, resulted in increased toxicity of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA but had no effect on 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA-mediated cytotoxicity. The present data provide evidence that metabolism is required for the expression of MDMA-induced renal toxicity in vitro. In addition, metabolism of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA by γ-GT and aminopeptidase M to the corresponding cystein-*S*-yl-glycine and/or cystein-*S*-yl conjugates is likely to be associated with detoxication of this compound. Thus, it appears that toxicity induced by thioether metabolites of ecstasy at the apical membrane of renal proximal tubular cells is the result of extracellular events, presumably redox cycling.

Keywords MDMA · Metabolites, Glutathione conjugate · Rat · Human · Renal proximal tubular cells

M. Carvalho (✉) · E. Fernandes · F. Carvalho · M.L. Bastos
CEQUP, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy,
University of Porto, Rua Aníbal Cunha, 164,
4050-047 Porto, Portugal
E-mail: marciacarvalho@ff.up.pt
Fax: +351-22-2003977

G. Hawksworth
Departments of Medicine and Therapeutics
and Biomedical Sciences, University of Aberdeen,
Polwarth Building, Foresterhill, Aberdeen AB25 2ZD, UK

N. Milhazes · F. Borges
CEQOFFUP, Organic Chemistry Department,
Faculty of Pharmacy, University of Porto,
Rua Aníbal Cunha, 164, 4050–047 Porto, Portugal

T.J. Monks
Center for Molecular and Cellular Toxicology,
College of Pharmacy, University of Texas at Austin,
Austin, TX 78712-1074, USA

Introduction

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or ecstasy) is a ring-substituted amphetamine derivative that rapidly achieved popularity as a recreational drug of abuse mainly among young people. Several cases of acute or chronic renal failure secondary to ecstasy consumption have recently been reported (Fahal et al. 1992; Henry et al. 1992; Woodrow et al. 1995; Bingham et al. 1998; Walubo and Seger 1999). However, despite these reports, the mechanisms of toxicity remain to be elucidated.

Several factors may contribute to the adverse renal effects of ecstasy, including disseminated intravascular coagulation (DIC), vasoconstriction, rhabdomyolysis, hyperthermia and metabolism. DIC and rhabdomyolysis

are frequent clinical consequences of ecstasy abuse (and of amphetamines in general), resulting in varying degrees of microvascular obstruction due to fibrin-platelet or myoglobin deposition, respectively (Fahal et al. 1992; Fineschi and Masti 1996; Cunningham 1997). This process may result in sudden renal ischaemia and acute tubular necrosis. Hyperthermia, a pro-oxidant aggressive condition, may also play a part (Dar and McBrien 1996). In addition, MDMA metabolism results in the formation of redox-active metabolites, which have recently been implicated in the mechanisms underlying ecstasy-induced neurotoxicity (Miller et al. 1995, 1997; Bai et al. 1999, 2001) and hepatotoxicity (Carvalho et al. 2001).

In the present work, the role of these putative metabolites in ecstasy-induced nephrotoxicity was investigated. MDMA is demethylenated to *N*-methyl-α-methyldopamine and *N*-demethylated to α-methyldopamine (α-MeDA) by cytochromes P450 2D, 2B and 3A (Kumagai et al. 1994; Kreth et al. 2000) (Fig. 1). These reactive metabolites are readily oxidized to the corresponding *o*-quinones. Quinones are highly redox-active molecules which can enter redox cycles with their semiquinone radicals, leading to formation of reactive oxygen species (ROS), including the superoxide anion, hydrogen peroxide, and ultimately the hydroxyl radical (Bolton et al. 2000). Alternatively, the reactive *o*-quinone intermediates are Michael acceptors, and cellular damage can occur through alkylation of crucial cellular proteins and/or DNA. In the presence of glutathione (GSH), the oxidation of α-MeDA to the corresponding *o*-quinone is followed by conjugation with GSH to form 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (Hiramatsu et al. 1990). The GSH-conjugate remains redox active and is readily oxidized to the quinone-GSH conjugate followed by the addition of a second molecule of GSH to yield 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (Miller et al. 1997).

The conjugation of GSH with electrophilic compounds usually results in their detoxication and subsequent elimination as mercapturic acids. Recently, however, several examples have been reported where conjugation of quinones with GSH fails to eliminate their biological or toxicological reactivity (for detailed reviews see Monks and Lau 1994, 1997; van Bladeren 2000; Dekant 2001), and evidence is accumulating that GSH conjugates of a variety of polyphenols are nephrotoxicants in animal models (Monks et al. 1985, 1988; Lau et al. 1988; Monks and Lau 1990; Fowler et al. 1991; Lau 1995). We report for the first time the differential toxicity of ecstasy and its metabolites methylenedioxyamphetamine (MDA), α-MeDA, and the GSH conjugates 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA in primary cultures of rat and human renal proximal tubular cells (PTCs). Furthermore, the contribution of different metabolic pathways were evaluated using selective enzyme inhibitors, such as acivicin for γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT) and bestatin for aminopeptidase M.

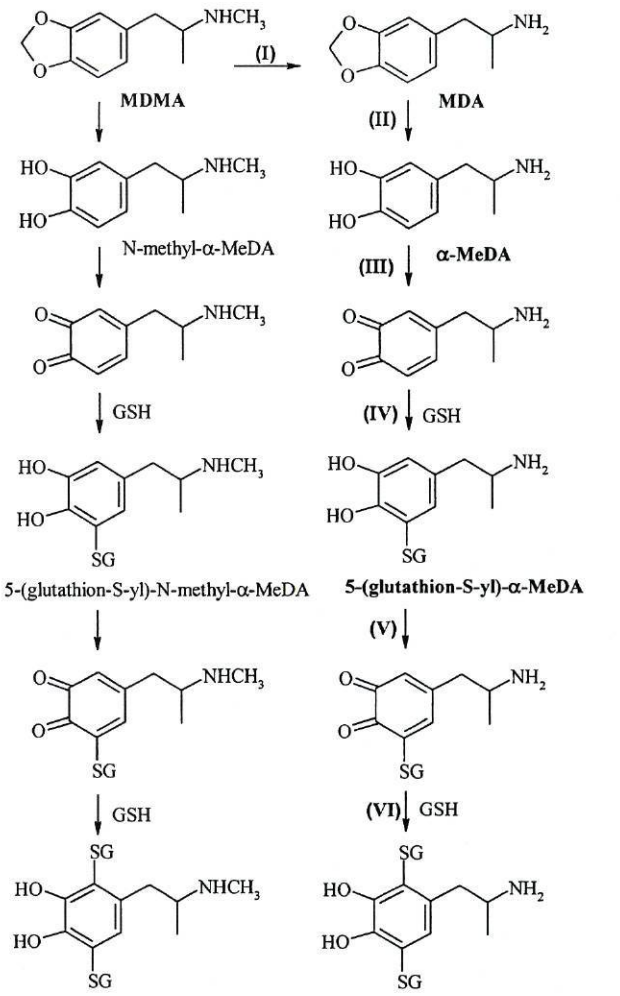


Fig. 1. Proposed pathway for 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolism to nephrotoxic metabolites. MDMA can undergo *N*-demethylation to methylenedioxyamphetamine (MDA) (*I*). Cytochrome P450-mediates demethylenation of MDMA and MDA to *N*-methyl-α-methyldopamine and α-methyldopamine (α-MeDA), respectively (*II*). The catechols are readily oxidized to the corresponding *o*-quinones (*III*), which may react readily with glutathione (GSH) to form the corresponding GSH conjugates (*IV*). Quinol-linked GSH conjugates are also susceptible to oxidation to the quinone-thioethers (*V*), which undergo a second GSH addition to form the *bis*-GSH substituted catechol (*VI*)

Materials and methods

Chemicals

Collagenase (clostridiopeptidase A; EC 3.4.24.3), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], glutathione (GSH), acivicin and bestatin were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo., USA). All other reagents were of the highest grade commercially available. MDMA (HCl salt), MDA (HCl salt) and α-MeDA (HBr salt) were synthesized in the Organic Chemistry Department, Porto University, Portugal. 5-(Glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA were synthesized in the Center for Molecular and Cellular Toxicology, College of Pharmacy, University of Texas, Austin, USA.

Biological material

Rat renal tissue

Male Wistar rats (200–250 g) were used for all experiments, and were housed in the Biological Services Unit, Foresterhill, University of Aberdeen, UK. The animals had free access to a commercial diet (CRM, Special Diet Services, Witham, UK) and tap water, and were kept on a 12-h/12-h day/night cycle. Animals were killed by cervical dislocation and the kidneys were excised and placed on ice.

Human renal tissue

Human kidney samples were obtained from surgical nephrectomies at Aberdeen Royal Infirmary (UK). Kidneys were transferred on ice to the Pathology Department and tissue samples were collected from areas defined as normal by a consultant pathologist. Renal cell isolation took place immediately after sample collection.

Cell isolation and culture

Rat and human proximal tubular cells were isolated following the procedure of Hawksworth (Rodilla and Hawksworth 1996), consisting essentially of a collagenase enzymatic digestion of renal cortex tissue followed by filtration and isopycnic Percoll density centrifugation. The cell yield was $20–30\times10^6$ cells/rat and $10–15\times10^6$ cells/g of human cortical tissue. Viability was routinely higher than 85%. PTCs (8×10^4 cells/cm^2) were cultured on 96-well microtitre plates at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. The culture medium was Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F12 Ham (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin (50 U/ 50 μg/ml), ofloxacin (5 μg/ml) and amphotericin B (1.5 μg/ml) (all from Gibco BRL, Paisley, UK). Culture medium was changed every 24 h.

Cytotoxicity assay

As judged by light microscopy, rat and human PTC monolayers were confluent 4 days after plating. At that time, monolayers were incubated for 24 h with 100, 200, 400, or 800 μM MDMA, MDA, α-MeDA, 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA or 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA. When indicated, monolayers were pre-treated with 250 μM acivicin or 10 μM bestatin for 20 min. Cell viability was measured using the mitochondrial MTT assay. MTT is a yellow water-soluble dye that is reduced in viable cells to an insoluble purple coloured product, MTT-formazan (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan) by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase. After exposure to the compounds, the medium was removed and the cells were washed twice with fresh culture medium. Subsequently the cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 4 h with 100 μl MTT (0.5 mg/ml). MTT solution was then removed from the cells and intracellular MTT-formazan was solubilized in 100 μl dimethyl sulfoxide and the absorbance measured at 540 nm in a microplate reader.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM of measurements from the indicated number of separate cell isolations. Statistical comparisons were made by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé's test. Differences were considered significant at $P<0.05$.

Results

Apical exposure of rat (Fig. 2) or human (Fig. 3) PTC monolayers to MDMA or MDA for 24 hours had no adverse effects at any concentration tested (100 to 800 μM) as determined by changes in mitochondrial function. In contrast, exposure of rat and human renal PTCs to α-MeDA at the highest concentration tested (800 μM) induced a significant decrease in cell viability, measured by decreases in mitochondrial function (Figs. 2 and 3), causing 60% and 40% cell death in rat and human PTCs respectively.

GSH conjugates of α-MeDA were clearly more potent nephrotoxicants than the parent catechol. Thus, exposure of rat and human PTC monolayers to 400 μM 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA caused approximately 80% and 70% cell death, respectively (Figs. 2 and 3). 5-(Glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (400 μM) was more toxic than 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA to rat renal PTCs. 5-(Glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (400 μM) caused 80% cell death, whereas 800 μM 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA was required to cause similar increases in this parameter (Fig. 2). In contrast, the two conjugates were equally potent in human renal PTCs (Fig. 3). Thus, human PTCs were more sensitive to 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA than rat PTCs.

To determine the role of γ-GT and aminopeptidase M in the cytotoxicity mediated by 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA, rat

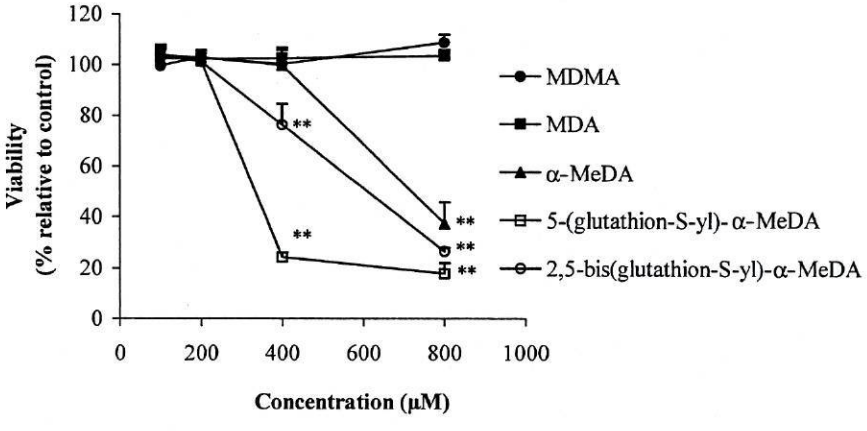


Fig. 2. Cellular viability determined by MTT assay 24 h after incubation of rat proximal tubular cell monolayers with 100, 200, 400 and 800 μM 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylenedioxyamphetamine (MDA) and α-methyldopamine (α-MeDA) ($n=7$ cultures, four replicates), 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA ($n=4$ cultures, four replicates) and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA ($n=3$ cultures, four replicates). Data represent means + SEM. $^{**}P<0.01$, compared with control

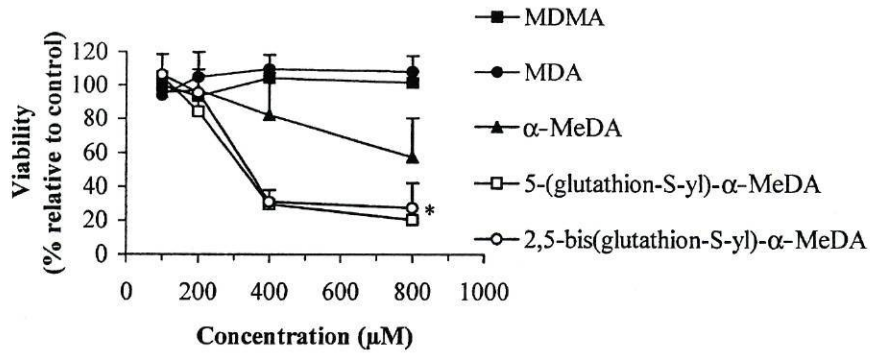


Fig. 3. Cellular viability measured by MTT assay 24 h after incubation of human proximal tubular cell monolayers with 100, 200, 400 and 800 μM 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylenedioxyamphetamine (MDA) and α-methyldopamine (α-MeDA) ($n=3$ cultures, four replicates), 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA ($n=2$ cultures, four replicates) and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA ($n=1$ culture, four replicates). Data represent means + SEM. *$P<0.05$, compared with control

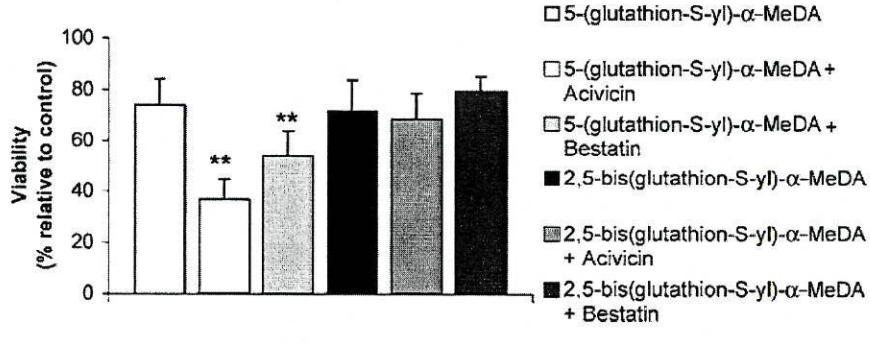
PTCs were pre-treated with acivicin, an inhibitor of γ-GT, or bestatin, an inhibitor of aminopeptidase M, prior to exposure of the monolayers to these conjugates. Because of the requirement for concentrations at which potentiation of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA toxicity could be easily observed, we selected concentrations of 300 μM and 400 μM, respectively. Interestingly, inhibition of either γ-GT or aminopeptidase M potentiated 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA-mediated cytotoxicity but had no effect on 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA-mediated cytotoxicity. Although 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (300 μM) or 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (400 μM) decreased cell viability (Fig. 4) at these concentrations, the decreases were not statistically significant. However, following pretreatment with acivicin, the same concentrations of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA significantly decreased cell viability by 65% compared with controls. Pretreatment with bestatin caused a more modest, but significant, decrease (approximately 45%) in cell viability. Acivicin or bestatin treatment alone had no statistically significant effect on cell viability.

Fig. 4. Effect of acivicin and bestatin on 5-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine- and 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine-induced toxicity. Rat proximal tubular cell monolayers were pre-treated for 20 min with 250 μM acivicin or 10 μM bestatin. After this period, monolayers were treated with 300 μM 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA ($n=5$ cultures, four replicates) or 400 μM 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA ($n=2$ cultures, four replicates). Viability was measured by MTT assay and data are expressed as means + SEM relative to controls. **$P<0.01$, compared with control

Discussion

We have shown that neither MDMA nor MDA are directly toxic to either rat or human PTCs. In contrast, several known and putative metabolites of these amphetamines produced cytotoxicity in primary PTC cultures of both human and rat origin. These findings indicate that metabolism is a prerequisite for the renal toxicity of MDMA and MDA, at least in vitro. Mammalian kidneys are capable of metabolizing xenobiotics via a broad variety of pathways, including cytochrome P450-dependent oxidation, and conjugations with GSH, glucuronic acid and sulfate (Boogaard et al. 1990). However, whether metabolites of MDMA can be formed directly within kidney cells in sufficient quantities to produce toxicity is not known and requires further investigation. Activities of the cytochrome P450 isoenzymes decrease considerably in primary cultures of PTCs (Schaaf et al. 2001), the greatest loss in activity occurring within 24 h of culture. Such effects may contribute to the lack of toxicity of MDMA and MDA in rat and human PTCs. Alternatively, metabolites of MDMA and MDA formed in the liver may reach the kidney via the circulation.

MDMA and MDA are demethylenated to α-MeDA by cytochromes P450 2D, 2B and 3A isoenzymes (Kreth et al. 2000). The reactivity of this redox-active metabolite probably contributes to the observed decrease in rat



and human PTC viability. α-MeDA is a catechol, with the capacity to redox cycle with the concomitant generation of ROS, initially the superoxide anion, but subsequently hydrogen peroxide, and ultimately the hydroxyl radical (Bolton et al. 2000). Thus, superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) undergoes either spontaneous or enzyme-catalysed dismutation to form hydrogen peroxide. $O_2^{\cdot-}$ also reacts with nitric oxide (NO) to form peroxynitrite ($ONOO^-$), which is a powerful cytotoxic species (Halliwell et al. 1999). In addition, $O_2^{\cdot-}$ reduces Fe^{3+} to Fe^{2+}, and hydrogen peroxide then reacts with Fe^{2+} to generate the hydroxyl radical (see Fig. 5), which is probably the reactive species responsible for damage to essential macromolecules (Bolton et al. 2000). Furthermore, α-MeDA may undergo further oxidative coupling to give rise to dimeric and polymeric products. The presence of insoluble black pigments within PTC monolayers exposed to α-MeDA is indicative of such polymerization reactions that ultimately give rise to melanin-like pigments. Persistence of insoluble pigments may cause tubular obstruction and irritation, which could contribute to the chronic toxicity of ecstasy.

In contrast to the generally accepted role of GSH conjugation serving as a detoxication mechanism, it is now known that conjugation of GSH with electrophiles may result in preservation or enhancement of biological activity (Monks and Lau 1992). In particular, although quinones formed by oxidation of α-MeDA are readily conjugated with GSH to form 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA (Hiramatsu et al. 1990), the conjugate itself is readily oxidized to the quinone-thioether (Miller et al. 1997), followed by the reductive addition of a second molecule of GSH to form 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA. Thus, like other GSH conjugates of a variety of polyphenols that are potent nephrotoxicants (Lau 1995), the thioether metabolites of ecstasy retain the ability to redox cycle with the corresponding generation of ROS.

The first step in the metabolism of GSH conjugates involves either hydrolysis or transamination by γ-GT, a membrane-bound enzyme, which has its active site oriented on the outer surface of the cell membrane. The kidney possesses the highest levels of γ-GT activity and the outer surface of the microvillus membrane (brush border) in the proximal tubule is the main site of γ-GT activity (Horiuchi et al. 1978). The product of the γ-GT catalysed reaction is a S-substituted cysteinyl-glycine dipeptide, which, in turn, is subject to hydrolytic cleavage of the glycine residue. The latter reaction is catalysed by the membrane enzymes aminopeptidase M and dipeptidase. Aminopeptidase M is more abundant than the dipeptidase and rat kidney possesses the highest levels of aminopeptidase M activity (Commandeur et al. 1995). The transfer of an acetyl group to the S-substituted cysteine conjugate catalysed by cysteine-thioether *N*-acetyltransferase completes the detoxication function of mercapturic acid biosynthesis (Monks and Lau 1987). However, in contrast to the detoxication function of mercapturic acid synthesis, GSH S-conjugates biosynthesized from several quinones, hydroquinones and aminophenols are nephrotoxic in animal models (Lau 1995; Monks and Lau 1998). A major factor in the nephrotoxicity of these polyphenolic GSH-conjugates seems to be the ease with which their metabolites oxidize to the corresponding quinones. For example, the half-wave oxidation potentials of 2-Br-(*bis*-cystein-*S*-yl)hydroquinone and 2,3,5-(*tris*-cystein-*S*-yl)hydroquinone are lower than those of 2-Br-(*bis*-glutathion-*S*-yl)hydroquinone and 2,3,5-(*tris*-glutathion-*S*-yl)hydroquinone (Monks et al. 1994). In this manner, γ-GT and dipeptidases serve to deliver a more readily oxidizable, and thus more reactive, metabolite to PTCs.

However, the cytoxicity of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA in rat PTCs is potentiated by inhibition of renal γ-GT and aminopeptidase M, indicating that metabolism of the conjugate to the corresponding cystein-*S*-yl-glycine and/or cystein-*S*-yl conjugate is a detoxication pathway. In addition, pre-incubation of rat PTCs with either acivicin or bestatin had no effect on

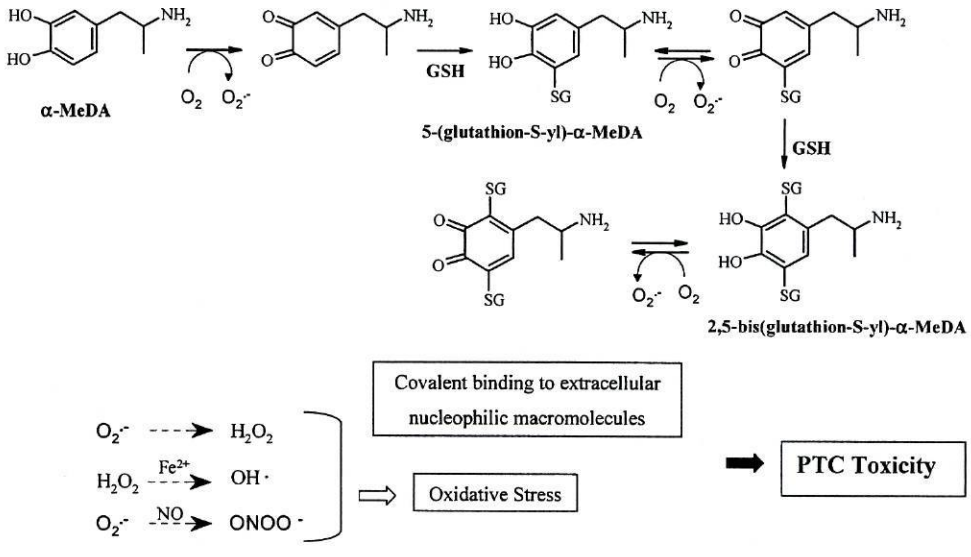


Fig. 5. Formation of reactive oxygen species by redox-cycling of glutathione (GSH) conjugates of quinones formed from α-methyldopamine (α-MeDA) (*PTC* renal proximal tubular cell)

2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA-mediated cytotoxicity. Thus, it seems that increasing GSH substitution results in a decreased affinity for γ-GT of the GSH-conjugate. Since γ-GT-mediated cleavage of the GSH portion of quinones is a prerequisite for cellular uptake of the conjugates, the observed results are suggestive of an extracellular mechanism of toxicity. The mechanism of quinone-GSH conjugate-mediated toxicity is unclear, but based upon the known properties of quinones, is likely to be initiated either via the arylation of cellular macromolecules that are critical for cell structure and function, or via the generation of ROS during quinone redox cycling. Potentiation of toxicity by acivicin pretreatment has also been observed with GSH conjugates of chlorohydroquinones (Mertens et al. 1991), *p*-aminophenol (Anthony et al. 1993) and menadione (Haenen et al. 1994). These findings suggest that for a number of GSH-conjugates degradation by γ-GT may be a detoxication mechanism. To explain this effect, it was hypothesized that inhibition of γ-GT by acivicin prevents the formation of a benzothiazolyl-like compound via cyclization of the cysteinylglycine and/or cysteine conjugate (Monks 1995). γ-GT-mediated hydrolysis of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA and subsequent aminopeptidase M-mediated glycine cleavage may thus lead to oxidative cyclization of the cysteine conjugate (Fig. 6). In this reaction, the cysteinyl amino group condenses with the quinone carbonyl to give a benzothiazolyl-like compound. Since this reaction eliminates the reactive quinone function from the molecule, it effectively prevents redox cycling of the thioether. The intramolecular cyclization reaction can therefore be considered an intramolecular detoxication reaction. Inhibiting the metabolism of these conjugates results in a high extracellular concentration of GSH-conjugates. In addition, quinone-thioethers are known to inhibit a variety of enzymes that utilize GSH as either a substrate or a co-substrate, including γ-GT (Monks and Lau 1998). Such an effect of the α-MeDA–GSH conjugate on γ-GT at PTC membranes may subsequently also increase extracellular concentrations of nephrotoxic metabolites of MDMA. Since these conjugates retain the ability to redox cycle, with the concomitant generation of ROS, it is possible that they induce lipid peroxidation of cell membranes. In addition, GSH-linked *o*-quinones interact with thiol groups of extracellularly located functional proteins, which play a critical role in cell function.

Inhibition of γ-GT by acivicin enhances MDMA-induced toxicity to serotoninergic neurons (Bai et al. 2001). γ-GT is also present in high concentrations in the brain. Such enhancement may involve increased uptake of thioether metabolites of MDMA into the brain due to the increased pool of thioether conjugates available for uptake via the intact GSH transporter. At present, a similar GSH transporter capable of transferring GSH conjugates into the cell has not been identified in the apical membrane of renal PTCs.

The GSH conjugate 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA was more toxic to rat PTC monolayers than 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA. The greater potency of the former mono-substituted GSH conjugate may be related to its ability to maintain redox activity, since *bis*-, and *tris*-substituted thiol conjugates may be more predisposed to dimerization or polymerization reactions.

By contrast, the two conjugates were equally potent in human renal PTCs. Thus, human PTCs were more sensitive to 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA than rat PTCs. The reasons for such differences in susceptibility to the *bis*-substituted GSH conjugate are unclear at present. Species differences in the specific activity of renal γ-GT have been reported (Lau 1995). The species variations of γ-GT result not only from differences in concentrations of γ-GT but also from differences in the γ-GT -protein. The different forms of γ-GT may have different specificity for γ-glutamyl acceptor substrates (Commandeur et al. 1995). However, factors other than γ-GT appear to be involved since metabolism mediated by this enzyme had no effect on renal toxicity induced by 2,5-*bis*(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA. Thus, it is more likely that variability in antioxidant defences contributes, at least in part, to the differential toxic effects of quinone thioethers.

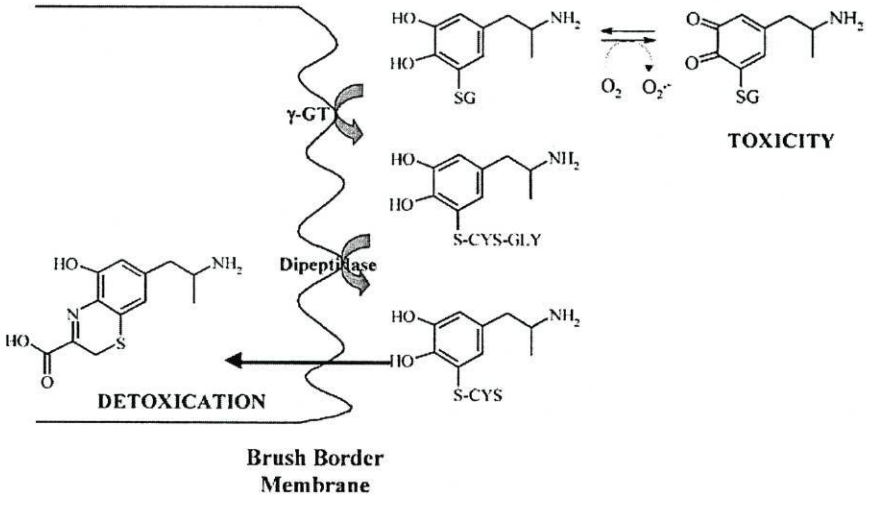


Fig. 6. Proposed mechanism resulting in detoxication of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine in renal proximal tubular epithelial cells (*γ-GT* γ-glutamyl transpeptidase)

In summary, the results of the present work indicate that metabolism of MDMA and MDA plays an important role in the development of nephrotoxicity in vitro. In addition, conjugation of the putative metabolite, α-MeDA, with GSH results in compounds that are even more potent nephrotoxicants. Furthermore, the ability of acivicin and bestatin to potentiate the nephrotoxicity of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-MeDA suggests that metabolism of this conjugate by γ-GT and aminopeptidase M constitutes a detoxication reaction. Thus, an extracellular mode of toxicity rather than uptake of cysteine-*S*-yl conjugates seems to account for the toxic effects of the thioether metabolites of ecstasy. Further work is therefore clearly required to delineate the extracellular mechanism(s) by which these compounds exert toxicity in renal cells.

Acknowledgements This work was supported by a project grant from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT; PraxisXXI/BD/20087/99) and Programa Operacional Ciência, Tecnologia, Inovação (POCTI, Portugal), in co-participation with Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) European Community funding (project POCTI/36099/FCB/2000).

References

Anthony ML, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK (1993) Studies on the effects of L-(αl S,5S)-α-amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT-125) on 4-aminophenol-induced nephrotoxicity in the Fischer 344 rat. Arch Toxicol 67:696–705

Bai F, Lau SS, Monks TJ (1999) Glutathione and *N*-acetylcysteine conjugates of α-methyldopamine produce serotoninergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. Chem Res Toxicol 12:1150–1157

Bai F, Jones DC, Lau SS, Monks TJ (2001) Serotonergic neurotoxicity of 3,4-(±)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(±)-methylendioxymethamphetamine (ecstasy) is potentiated by inhibition of γ-glutamyl transpeptidase. Chem Res Toxicol 14:863–870

Bingham C, Beaman M, Nicholls A, Anthony P (1998) Necrotizing renal vasculopathy resulting in chronic renal failure after ingestion of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). Nephrol Dial Transplant 13:2654–2655

Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol 13:135–160

Boogaard PJ, Nagelkerke JF, Mulder GJ (1990) Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. Chem Biol Interact 76:251–291

Carvalho M, Carvalho F, Bastos ML (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

Commandeur JN, Stijntjes GJ, Vermeulen NP (1995) Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. Pharmacol Rev 47:271–330

Cunningham M (1997) Ecstasy-induced rhabdomyolysis and its role in the development of acute renal failure. Intensive Crit Care Nurs 13:216–223

Dar KJ, McBrien ME (1996) MDMA induced hyperthermia: report of a fatality and review of current therapy. Intensive Care Med 22:995–996

Dekant W (2001) Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. Toxicol Lett 124:21–36

Fahal IH, Sallomi DF, Yaqoob M, Bell GM (1992) Acute renal failure after ecstasy. BMJ 305:29

Fineschi V, Masti A (1996) Fatal poisoning by MDMA (ecstasy) and MDEA: a case report. Int J Legal Med 108:272–275

Fowler LM, Moore RB, Foster JR, Lock EA (1991) Nephrotoxicity of 4-aminophenol glutathione conjugate. Hum Exp Toxicol 10:451–459

Haenen HEMG, Rogmans P, Temmink JHM, van Bladeren PJ (1994) Differential detoxification of two thioether conjugates of menadione in confluent monolayers of rat renal proximal tubular cells. Toxicol in Vitro 8:207–214

Halliwell B, Zhao K, Whiteman M (1999) Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. Free Radic Res 31:651–669

Henry JA, Jeffreys KJ, Dawling S (1992) Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). Lancet 340:384–387

Hiramatsu M, Kumagai Y, Unger SE, Cho AK (1990) Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. J Pharmacol Exp Ther 254:521–527

Horiuchi S, Inoue M, Morino Y (1978) γ-Glutamyl transpeptidase: sidedness of its active site on renal brush-border membrane. Eur J Biochem 87:429–437

Kreth K-P, Kovar K-A, Schwab M, Zanger UM (2000) Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of 'ecstasy'-related designer drugs. Biochem Pharmacol 59:1563–1571

Kumagai Y, Lin LY, Hiratsuka A, Narimatsu S, Suzuki T, Yamada H, Oguri K, Yoshimura H, Cho AK (1994) Participation of cytochrome P450-2B and -2D isozymes in the demethylenation of methylenedioxymethamphetamine enantiomers by rats. Mol Pharmacol 45:359–365

Lau SS (1995) Quinone-thioether-mediated nephrotoxicity. Drug Metab Rev 27:125–141

Lau SS, Hill BA, Highet RJ, Monks TJ (1988) Sequential oxidation and glutathione addition to 1,4-benzoquinone: correlation of toxicity with increased glutathione substitution. Mol Pharmacol 34:829–836

Mertens JJ, Temmink JH, van Bladeren PJ, Jones TW, Lo HH, Lau SS, Monks TJ (1991) Inhibition of γ-glutamyl transpeptidase potentiates the nephrotoxicity of glutathione-conjugated chlorohydroquinones. Toxicol Appl Pharmacol 110:45–60

Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1995) Metabolism of 5-(glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine following intracerebroventricular administration to male Sprague-Dawley rats. Chem Res Toxicol 8:634–641

Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1997) 2,5-*bis*-(Glutathion-*S*-yl)-α-methyldopamine, a putative metabolite of (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. Eur J Pharmacol 323:173–180

Monks TJ (1995) Modulation of quinol/quinone-thioether toxicity by intramolecular detoxication. Drug Metab Rev 27:93–106

Monks T, Lau SS (1987) Commentary: renal transport processes and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. Drug Metab Dispos 15:437–441

Monks TJ, Lau SS (1990) Nephrotoxicity of quinol/quinone-linked S-conjugates. Toxicol Lett 53:59–67

Monks TJ, Lau SS (1992) Toxicology of quinone-thioethers. Crit Rev Toxicol 22:243–270

Monks TJ, Lau SS (1994) Glutathione conjugation as a mechanism for the transport of reactive metabolites. Adv Pharmacol 27:183–210

Monks TJ, Lau SS (1997) Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. Chem Res Toxicol 10:1296–1313

Monks TJ, Lau SS (1998) The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38:229–255

Monks TJ, Lau SS, Highet RJ, Gillette JR (1985) Glutathione conjugates of 2-bromohydroquinone are nephrotoxic. Drug Metab Dispos 13:553–559

Monks TJ, Highet RJ, Lau SS (1988) 2-Bromo-(diglutathion-*S*-yl)hydroquinone nephrotoxicity: physiological, biochemical, and electrochemical determinants. Mol Pharmacol 34:492–500

Monks TJ, Lo HH, Lau SS (1994) Oxidation and acetylation as determinants of 2-bromocystein-*S*-ylhydroquinone-mediated nephrotoxicity. Chem Res Toxicol 7:495–502

Rodilla V, Hawksworth GM (1996) Isolation and culture of human renal cortical cells with characteristics of proximal tubules. In: Jones GE (ed) Methods in molecular medicine: human cell protocols. Humana Press, NJ, pp 409–417

Schaaf GJ, de Groene EM, Maas RF, Commandeur JN, Fink-Gremmels J (2001) Characterization of biotransformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells. Chem Biol Interact 134:167–190

van Bladeren PJ (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. Chem Biol Interact 129:61–76

Walubo A, Seger D (1999) Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, 'ecstasy': case report and review of the literature. Hum Exp Toxicol 18:119–125

Woodrow G, Harnden P, Turney JH (1995) Acute renal failure due to accelerated hypertension following ingestion of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). Nephrol Dial Transplant 10:399–400

12. ENSAIOS *IN VITRO* DA CARDIOTOXICIDADE DA 3,4-METILENO-DIOXIMETANFETAMINA E DOS SEUS METABOLITOS

A avaliação da acção cardiotóxica da MDMA e dos seus metabolitos, *in vitro*, foi realizada recorrendo aos seguintes parâmetros:

- Estudo da relação concentração-efeito para a MDMA e seus metabolitos (**Trabalho V**). Para tal, procedeu-se à incubação de cardiomiócitos isolados de rato Wistar com MDMA, MDA, α-MeDA e N-Me-α-MeDA nas concentrações finais de 0,1 a 1,6 mM, durante 4 horas. Os biomarcadores de efeito determinados foram a morfologia celular, os níveis celulares de GSH, GSSG, ATP, ADP, cálcio citosólico e a actividade das enzimas antioxidantes GR, GST e GPX.
- Quantificação dos níveis de α-MeDA, N-Me-α-MeDA e seus produtos de oxidação α-metildopaminocromo e N-Me-α-metildopaminocromo, respectivamente, nas suspensões de cardiomiócitos isolados de rato, por HPLC-DAD (**Trabalho V**).

TRABALHO V

Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro

Reprinted from Chemical Research in Toxicology 17: 623-632

Copyright (2004) with kind permission from American Chemical Society

Metabolism Is Required for the Expression of Ecstasy-Induced Cardiotoxicity in Vitro

Márcia Carvalho,*,† Fernando Remião,† Nuno Milhazes,‡,§ Fernanda Borges,‡ Eduarda Fernandes,† Maria do Céu Monteiro,§ Maria José Gonçalves,§ Vítor Seabra,§ Francisco Amado,|| Félix Carvalho,† and Maria Lourdes Bastos†

REQUIMTE, Serviço de Toxicologia and Serviço de Química Orgânica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099/030 Porto, Portugal, Instituto Politécnico de Saúde-Norte, R. Central da Gandra, 1317, Gandra, 4585/116 Paredes, Portugal, and Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810/123 Aveiro, Portugal

Received January 23, 2004

Cardiovascular complications associated with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) abuse have increasingly been reported. The indirect effect of MDMA mediated by a sustained high level of circulating biogenic amines may contribute to the cardiotoxic effects, but other factors, like the direct toxic effects of MDMA and its metabolites in cardiac cells, remain to be investigated. Thus, the objective of the present in vitro study was to evaluate the potential cardiotoxic effects of MDMA and its major metabolites 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), N-methyl-α-methyldopamine (N-Me-α-MeDA), and α-methyldopamine (α-MeDA) using freshly isolated adult rat cardiomyocytes. The cell suspensions were incubated with these compounds in the final concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 mM for 4 h. α-MeDA, N-Me-α-MeDA, and their respective aminochromes (oxidation products) were quantified in cell suspensions by HPLC-DAD. The toxic effects were evaluated at hourly intervals for 4 h by measuring the percentage of cells with normal morphology, glutathione (GSH), and glutathione disulfide (GSSG); intracellular Ca^{2+}, ATP, and ADP; and the cellular activities of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase. No toxic effects were found after exposure of rat cardiomyocytes to MDMA or MDA at any of the tested concentrations for 4 h. In contrast, their catechol metabolites N-Me-α-MeDA and α-MeDA induced significant toxicity in rat cardiomyocytes. The toxic effects were characterized by a loss of normal cell morphology, which was preceded by a loss of GSH homeostasis due to conjugation of GSH with N-Me-α-MeDA and α-MeDA, sustained increase of intracellular Ca^{2+} levels, ATP depletion, and decreases in the antioxidant enzyme activities. The oxidation of N-Me-α-MeDA and α-MeDA into the toxic compounds N-methyl-α-methyldopaminochrome and α-methyldopaminochrome, respectively, was also verified in cell suspensions incubated with these MDMA metabolites. The results obtained in this study provide evidence that the metabolism of MDMA into N-Me-α-MeDA and α-MeDA is required for the expression of MDMA-induced cardiotoxicity in vitro, being N-Me-α-MeDA the most toxic of the studied metabolites.

Introduction

MDMA[1] (ecstasy) is an amphetamine derivative, which has become increasingly popular as a recreational drug of abuse mainly among young people. MDMA consumption has been recently related to several reports of cardiovascular toxicity (*1*−*3*). Indeed, an acute administration of MDMA increases heart rate, blood pressure, and myocardial oxygen consumption in both humans (*4*, *5*) and animals (*6*), which may ultimately result in tachycardia, hypertension, arrhythmias, cardiac ischemia, and heart failure. The chronic use of MDMA may also result in serious cardiovascular damage. A daily administration of MDMA to rats for a total of 28 days was reported to produce significant myocardial pathologies including contraction band necrosis, inflammation, fibrosis, and ultrastructural changes (*7*). These findings are in agreement with a previous report of similar heart pathological alterations in five victims of MDMA use (*2*).

Although there is undeniable evidence of MDMA-induced cardiac toxicity, the mechanism(s) responsible for that toxicity remain to be clarified. One proposed mechanism suggests that the sustained increased catecholaminergic stimulation, a consequence of MDMA intake, is responsible for the MDMA cardiotoxicity. Indeed, the abnormal high release of monoamines from peripheral sympathetic nerves in cardiovascular tissues was reported to produce myocardial necrosis (*8*, *9*). In addition, behavioral and environmental factors accompanying illicit MDMA use may increase the risk for cardiovascular complications. MDMA consumption in crowded conditions, high ambient temperature, loud

* To whom correspondence should be addressed. Fax: 351-222003977. E-mail: marciacarvalho@ff.up.pt.
† Serviço de Toxicologia, Universidade do Porto.
‡ Serviço de Química Orgânica, Universidade do Porto.
§ Instituto Politécnico de Saúde-Norte.
|| Universidade de Aveiro.

[1] Abbreviations: MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamine; N-Me-α-MeDA, N-methyl-α-methyldopamine; α-MeDA, α-methyldopamine; GPX, selenium-dependent glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione-S-transferase; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; H_2O_2, hydrogen peroxide; Fluo-3 AM, fluo-3-acetoxymethyl ester; PI, propidium iodide; DAD, diode array detection.

10.1021/tx049960f CCC: $27.50 © 2004 American Chemical Society
Published on Web 04/27/2004

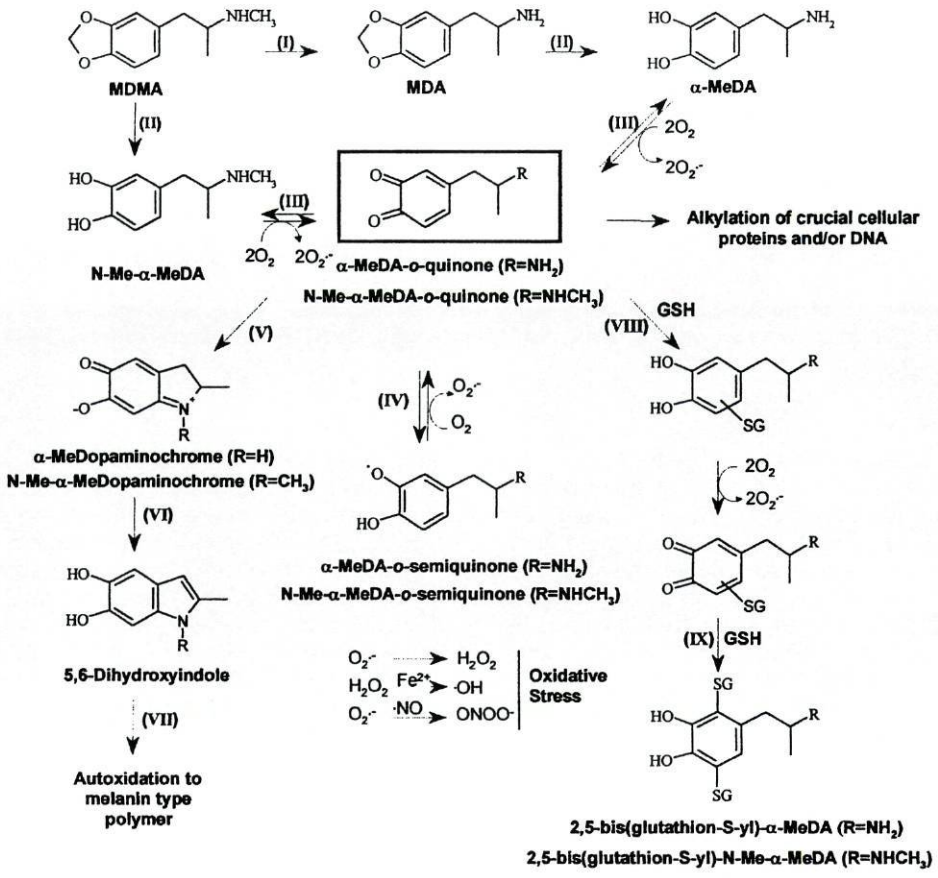


Figure 1. Proposed pathway for MDMA metabolism into cardiotoxic metabolites. MDMA can undergo N-demethylation to MDA (**I**). Cytochrome P450 mediates demethylenation of MDMA and MDA to N-Me-α-MeDA and α-MeDA, respectively (**II**). The catechols are readily oxidized to the corresponding *ortho*-quinones (**III**), which can enter redox cycles with their semiquinone radicals, leading to formation of ROS (**IV**). On cyclization, *ortho*-quinones give rise to the formation of aminochromes (**V**) and related compounds, such as 5,6-dihydroxyindoles (**VI**), which can undergo further oxidation and polymerization to form brown or black insoluble pigments of melanin type (**VII**). Alternatively, *ortho*-quinones can react readily with GSH to form the corresponding GSH conjugates (**VIII**, **IX**).

noise places, and intense physical activity (as frequently occurs at "rave parties") may be associated with a potential life-threatening increase in the cardiovascular toxicity of MDMA. In line with this, Gesi et al. (*10*) recently reported that concomitant exposure to MDMA and noise in rats produced changes in the heart ultrastructure, particularly evident at the mitochondrial level, namely, disarranged cristae and a less dense matrix. An alternative mechanism for MDMA-induced myocyte damage may be a direct toxic effect of MDMA or its metabolites in cardiac cells. It was already reported that methamphetamine is toxic to myocytes in culture systems devoid of catecholamines (*11*). In addition, MDMA metabolism results in the formation of redox active metabolites, which have recently been implicated in the mechanisms underlying ecstasy-induced neurotoxicity (*12–15*), hepatotoxicity (*16*), and nephrotoxicity (*17*).

Metabolism of MDMA involves N-demethylation to MDA. MDMA and MDA are O-demethylenated to N-Me-α-MeDA and α-MeDA, respectively (*18–20*), both of which are catechols that can undergo oxidation to the corresponding *ortho*-quinones (Figure 1). Quinones are highly redox active molecules that can undergo redox cycling, which originates semiquinone radicals and leads to the generation of ROS or RNS (*21*). Quinones can also be oxidized, in a process that involves an irreversible 1,4-intramolecular cyclization reaction, resulting in the formation of aminochromes (colored pigments) and related compounds, such as 5,6-dihydroxyindoles, which eventually leads to the appearance of brown or black insoluble polymers of the melanin type (*22*, *23*). The catecholamine oxidation process can be catalyzed under physiological conditions by oxidative enzymes, such as xanthine oxidase, peroxidase, lipoxygenase, several copper-containing catechol oxidases, or in the presence of metal ions such as Cu^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, and several copper and ferric chelates (*23*). Alternatively, as the reactive *o*-quinone intermediates are Michael acceptors, cellular damage can occur through alkylation of crucial cellular proteins and/or DNA. In the presence of GSH, *o*-quinone may be conjugated with GSH to form a glutathionyl adduct (*24*). This GSH conjugate remains redox active being readily oxidized to the quinone-thioether, which, after the reductive addition of a second molecule of GSH, yields a 2,5-bis-glutathionyl conjugate (*15*). Taken all together, MDMA metabolism leading to the formation of ROS and/or toxic oxidation products and/or GSH depletion may represent the triggering factor responsible for the cardiotoxicity exerted by this amphetamine.

In view of the scarce data regarding the mechanism(s) underlying MDMA-induced toxicity on the cardiovascular system, the purpose of this study was to investigate the role of metabolites in MDMA-induced cardiotoxicity.

Materials and Methods

Chemicals. Collagenase (type II) was obtained from Worthington (U.S.A.). Fluo-3 AM and PI were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). All other reagents used in this study were of analytical grade. MDMA (HCl salt), MDA (HCl salt), N-Me-α-MeDA (HCl salt), and α-MeDA (HBr salt) were synthesized in the Organic Chemistry Department, Porto University (Portugal).

Cardiomyocyte Isolation and Incubation. Cardiomyocytes were isolated by collagenase and protease perfusion as previously described (*25*). Adult male Wistar rats (Charles-River Laboratories, Barcelona, Spain), weighing 200−250 g, were used. Cell viability at the beginning of the experiments was 70 ± 5%.

Incubations were performed in a water bath at 37 °C, using 2.5×10^5 cells/mL in modified Krebs−Henseleit buffer supplemented with 1.8 mM $CaCl_2$ (pH 7.2) and saturated with an airstream of carbogen. Isolated cardiomyocytes were preincubated for 30 min at 37 °C and then incubated with MDMA, MDA, N-Me-α-MeDA, or α-MeDA at a final concentration of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, or 1.6 mM for 4 h. Because α-MeDA and N-Me-α-MeDA are light sensitive unstable compounds, all incubations were performed with light protection. Cell suspension aliquots taken at time 0 and at hourly intervals for 4 h were used for the evaluation of cell morphology, ATP and ADP levels, and concentrations of α-MeDA, N-Me-α-MeDA, and their respective aminochromes (for the last parameter, quantifications were only performed in cell suspensions incubated with the highest concentration assayed). GSH and glutathione disulfide (GSSG) were measured in aliquots taken at time 0 and each hour during 2 h of incubation. GPX, GR, and GST activities were also quantified in aliquots taken at time 0 and after 2 h of incubation (samples were kept frozen at −80 °C until assay). For determination of intracellular Ca^{2+}, the cardiomyocytes were preloaded with Fluo-3AM (see Flow Cytometric Analysis of Intracellular Ca^{2+}) and sample aliquots were taken every 15 min during 1.5 h of incubation.

Cell Morphology. The severity of cell injury was assessed by microscopic examination of cardiomyocyte morphology in the presence or absence of trypan blue. Approximately 600 cardiomyocytes in each sample aliquot were counted under a light microscope, and the percentage of rod-shaped cells to the total cells was calculated and used as an indicator of the morphological change. Cells with ratio length/width > 3 were classified as rod-shaped cells.

HPLC-DAD Analysis of Aminochromes. α-MeDA, N-Me-α-MeDA, and their respective aminochromes were quantified by HPLC with DAD at 278 (for catecholamines) and 490 nm (for aminochromes), as previously reported (*26*) with slight modifications. Perchloric acid (5% final concentration) was added to aliquots of cell suspension, mixed, and immediately centrifuged for 15 s. The supernatant was neutralized with $KHCO_3$, centrifuged for 15 s, and injected into the HPLC-DAD system. A Waters Spherisorb RP-18 (5 μm) column was used. The mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate and 10% acetonitrile (adjusted to pH 3.0), at a flow rate of 1.0 mL/min. The standard curve of each aminochrome was estimated by total oxidation of known concentrations of α-MeDA or N-Me-α-MeDA with 2 mM $NaIO_4$ in a 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). The reactions were conducted at room temperature with vigorous shaking for 2 min. Samples were immediately injected into the HPLC-DAD system. Fractions containing each aminochrome were collected, and the structure was confirmed by mass spectrometry (see Mass Spectrometry of N-Me-α-MeDA and α-MeDA Aminochromes). The total oxidation of α-MeDA or N-Me-α-MeDA into the respective aminochromes was assumed since (i) the peak of α-MeDA or N-Me-α-MeDA in the chromatograms at 278 nm was absent and (ii) the same treatment applied to known concentrations of epinephrine produced similar concentrations of adrenochrome (confirmed by injection of adrenochrome standards).

Mass Spectrometry of N-Me-α-MeDA and α-MeDA Aminochromes. Aminochrome HPLC fractions were collected and analyzed by electrospray mass spectrometry and MS/MS. Electrospray mass spectra and tandem mass spectra were acquired with a Q-TOF 2 (Micromass, Manchester). The instrument resolution was set at 9500 (50% peak valley). The capillary needle voltage was 3000 V, and the source temperature was maintained at 150 °C. Argon was used as the collision gas. The cone voltage was at 45 V for MS and MS/MS. Collision-induced decomposition mass spectra (MS/MS) were acquired by selecting the desired ion with the quadrupole section of the mass spectrometer and colliding it in the collision cell with argon gas (measured pressure in the penning gauge $\sim 6 \times 10^{-6}$ mBar) using a collision energy of 20−25 eV. The resulting product ions were determined by the TOF analyzer. Data acquisition was carried out with a Micromass MassLynx 3.4 data system. Sample introduction used a syringe pump at a flow rate of 10 μL/min.

Biochemical Analysis. The GSH and GSSG contents of cell suspensions were determined by the DTNB−GSSG reductase recycling assay as described before (*16*). Measurement of the adenine nucleotides ATP and ADP in cardiomyocytes was performed by HPLC with UV detection, by a modification of a previously reported method (*27*). Briefly, sample aliquots were treated with perchloric acid (5% final acid concentration) for protein precipitation and centrifuged for 10 min at 13 000 rpm. The supernatant was neutralized with 0.76 M $KHCO_3$, and the sample was centrifuged for 1 min at 13 000 rpm. A volume of 100 μL was then injected into the HPLC system. A Waters Spherisorb RP-18 (5 μm) was the analytical column. The mobile phase consisted of 0.1 M KH_2PO_4, adjusted to pH 6.8. An isocratic elution was performed at 1.0 mL/min at room temperature, and detection was performed at 254 nm. Quantitative measurements were carried out by injection of standard solutions of known concentrations of ATP and ADP. A Compaq computer fitted with Millennium software from Waters processed the chromatographic data.

For the determination of GPX, GR, and GST activity, aliquots of cell suspensions were sonicated for 12 s at medium intensity and then centrifuged at 13 000 rpm for 5 min. The GPX, GR, and GST activities were determined in the supernatant as previously described (*28*).

Flow Cytometric Analysis of Intracellular Ca^{2+}. Real-time intracellular Ca^{2+} measurements were performed only in cardiomyocytes incubated with 1.6 mM N-Me-MeDA. Analysis of intracellular Ca^{2+} was performed as previously reported by Boston et al. (*29*) with some modifications. Ionized calcium was measured using the Ca^{2+} sensitive fluorescent probe, fluo-3 AM, and flow cytometric analysis was performed on a EPICS XL flow cytometer (Beckman-Coulter, Brea, CA) with an argon ion laser (488 nm, 15 mW). Cardiomyocytes (2.5×10^5 cells/mL in modified Krebs−Henseleit buffer) supplemented with 1.8 mM $CaCl_2$ (pH 7.2) were incubated with 10 μM Fluo-3 for 30 min at room temperature. Cells were then washed with fresh Krebs−Henseleit buffer containing 1.8 mM $CaCl_2$, and the cell suspension without treatment (control) was run in a flow cytometer to measure Fluo-3 basal fluorescence (time zero). After that, cells were incubated with 1.6 mM N-Me-MeDA for 90 min at 37 °C in the dark, and samples were taken for analysis every 15 min. To prevent leakage of Fluo-3 via the anion transporter (*30*), probenecid 0.5 mM was added to loading, wash, and protocol solutions.

PI (final concentration 7.5 μM) was added 3 min before data acquisition. PI is an impermeant ion that is fluorescent when bound to DNA and is therefore a marker for nonviable cells. Approximately 10^4 cardiomyocytes in each sample were analyzed for emission fluorescence intensity. Data were collected for emission intensity at wavelengths of 525 nm for Fluo-3 and 675 nm for PI and recorded simultaneously. Only those cells with a low PI fluorescence (viable cells) were included in the comparative analysis of intracellular Ca^{2+}. In these experiments, the Fluo-3 fluorescence intensity was not calibrated; thus,

results are presented as fluorescence arbitrary units and normalized by determining the fluorescence ratio (fluorescence ratio = mean Fluo-3 fluorescence in cells exposed to N-Me-α-MeDA/mean Fluo-3 fluorescence in cells at time zero).

Statistical Analysis. Results are given as means ± SEM (from four to six experiments of different preparations of cardiomyocytes). Statistical comparisons between groups were performed by one way ANOVA followed by Scheffé's test. Changes in the evaluated parameters with time of incubation were evaluated by repeated measures ANOVA (Huynh–Feldt adjustment). When differences reached statistical significance, multiple comparisons between groups were made using the Bonferroni adjustment. Significance was accepted at P less than 0.05.

Results

No toxic effects on cell morphology, intracellular levels of GSH, GSSG, Ca^{2+}, ATP, ADP, or on the activities of GR, GPX, and GST were found after exposure of rat cardiomyocytes to MDMA or MDA at any of the tested concentrations for 4 h (data not shown). In contrast, their catechol metabolites N-Me-α-MeDA and α-MeDA induced significant toxicity in rat cardiomyocytes. One of these effects was an alteration in cell morphology. Figure 2A illustrates normal rod-shaped cardiomyocytes with a regular sarcomere pattern after 2 h of incubation (control group). Isolated cardiac myocytes exposed to N-Me-α-MeDA or α-MeDA underwent a rapid contracture to a square configuration (rigor shortening) (Figure 2B). Contracted cardiomyocytes excluded trypan blue (Figure 2C), indicating that the barrier functions of the plasma membrane were unaffected by rigor shortening. Figure 3A,B shows that both metabolites induced a time- and concentration-dependent loss of rod-shaped morphology that was more evident for N-Me-α-MeDA. Noteworthy, 1.6 mM N-Me-α-MeDA induced more than 90% loss of normal cell morphology after 2 h of incubation. Nevertheless, cellular viability, as measured by trypan blue exclusion, was not significantly different from control cells even after 4 h of incubation (data not shown), although blebs were present in the sarcolemma of cells exposed to N-Me-α-MeDA (0.8–1.6 mM) or α-MeDA (1.6 mM) after 4 h of incubation.

To correlate the toxicological responses at the cellular level with N-Me-α-MeDA and α-MeDA oxidation process, N-Me-α-MeDA, α-MeDA, and their oxidation products (aminochromes) were quantified in cell suspensions incubated with the highest concentration for 4 h. Figure 4A shows N-Me-α-MeDA and N-Me-α-methyldopaminochrome concentrations in cardiomyocyte suspensions exposed to 1.6 mM N-Me-α-MeDA. N-Me-α-MeDA levels decreased from 1.6 mM at time zero to 1.3, 0.8, 0.35, and 0.1 mM after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively. The decrease of N-Me-α-MeDA seems to result from its oxidation, as suggested by the appearance of a red coloration in the incubation medium of cell suspensions incubated with 1.6 mM N-Me-α-MeDA after ~1 h of incubation. In fact, N-Me-α-MeDA aminochrome was detected in cell suspensions after 1 h of incubation, and its concentration increased after 2 h (0.18 and 0.32 mM after 1 and 2 h of incubation, respectively). However, aminochrome levels decreased to 0.22 and 0.14 mM after 3 and 4 h of incubation, respectively. These results are in accordance with the observation that incubation medium of cell suspensions exposed to N-Me-α-MeDA (1.6 mM) became strongly red-colored after ~2 h of incubation and progressively changed to a dark brown color with the appearance of insoluble black pigments after ~3 h of incubation. The insoluble black pigments formed are likely to be melanin type (*22*, *23*). Thus, the progressive decreases in N-Me-α-MeDA concentrations, without increase in aminochrome concentrations, and the

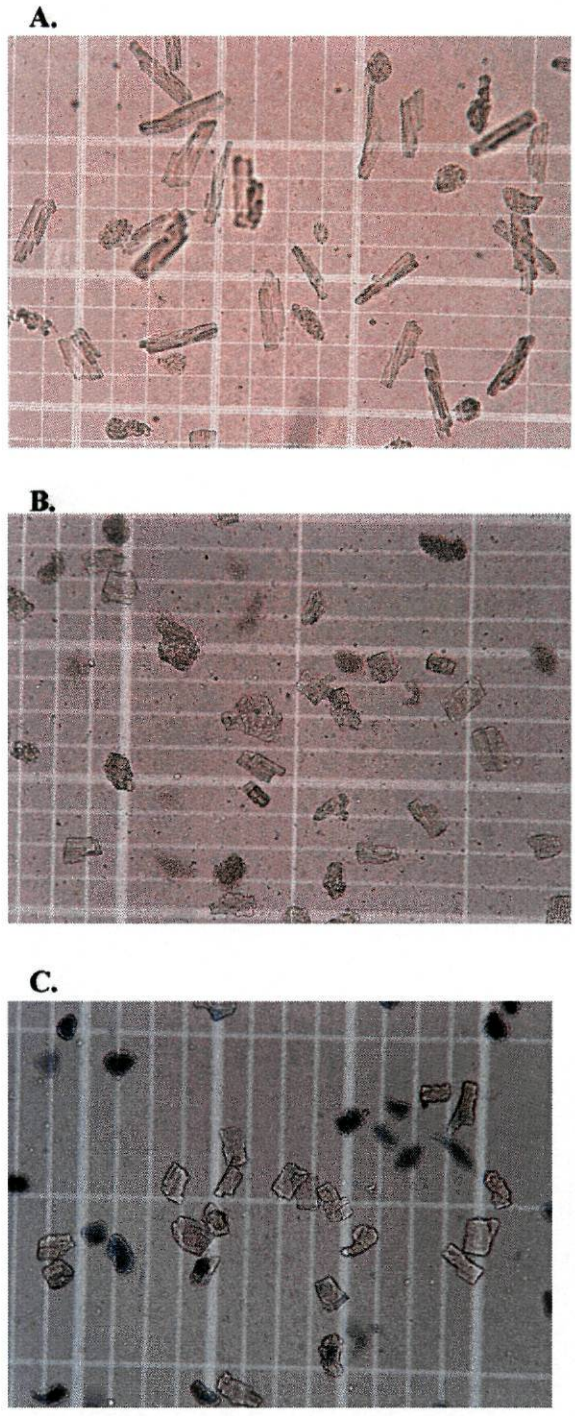


Figure 2. (A) Optic microscopic image of isolated cardiomyocyte suspension showing characteristic rod-shaped cells with a regular sarcomere pattern (control group, 2 h). (B) Cardiomyocytes incubated with N-Me-α-MeDA (1.6 mM, 2 h) underwent a drastic reduction in cell length (rigor shortening). (C) Optic microscopic image showing exclusion of trypan blue dye by contracted cells. Original field magnification, 20×.

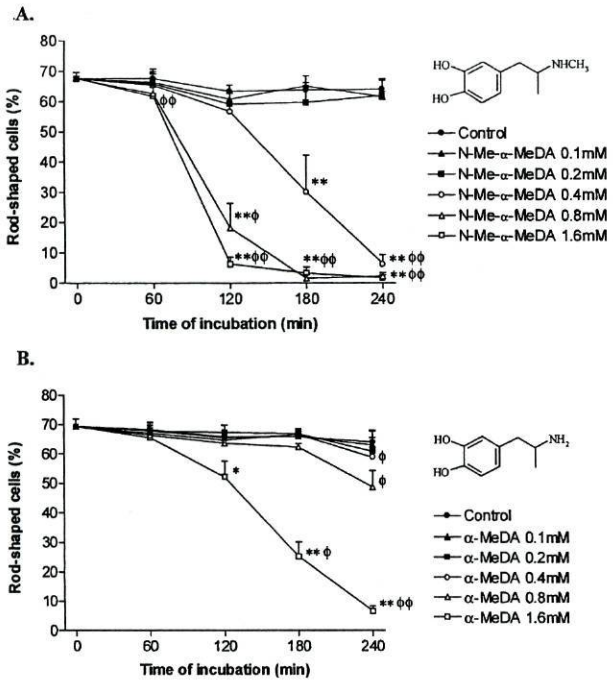


Figure 3. Effect of N-Me-α-MeDA (A) and α-MeDA (B) in cell morphology, measured as % of rod-shaped cells in cardiomyocyte suspensions. Data represent means ± SEM; $n = 5$; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, as compared with control; $^{\phi}P < 0.05$ and $^{\phi\phi}P < 0.01$, as compared with time zero.

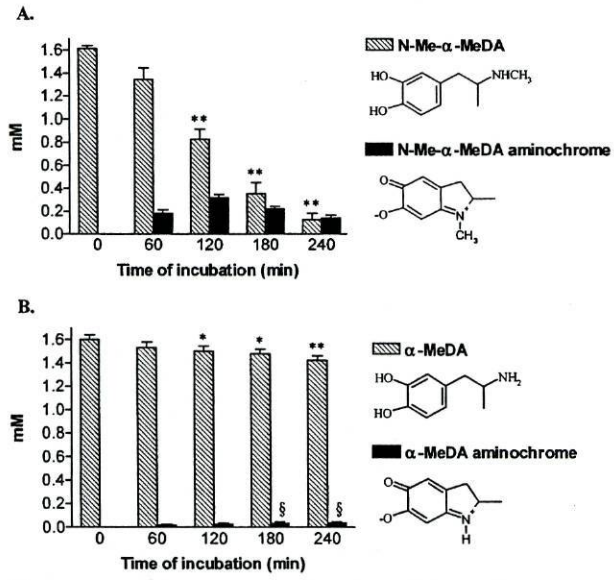


Figure 4. Concentrations of N-Me-α-MeDA and N-methyl-α-methyldopaminochrome (A) and α-MeDA and α-methyldopaminochrome (B) in cardiomyocyte suspensions incubated with 1.6 mM N-Me-α-MeDA or 1.6 mM α-MeDA during 4 h. Data represent means ± SEM; $n = 5$; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, as compared with control; $^{\S}P < 0.05$, as compared with time 1 h.

appearance of black pigments are suggestive that N-Me-α-MeDA oxidation progresses into formation of melanin type polymers.

In α-MeDA samples, α-MeDA concentrations decreased slightly (but significantly) throughout the incubation period (from 1.6 mM at time zero to 1.53, 1.50, 1.48, and 1.42 mM after 1, 2, 3, and 4 h of incubation, respectively) and this was accompanied by the appearance of an orange coloration in the incubation medium after ~1 h

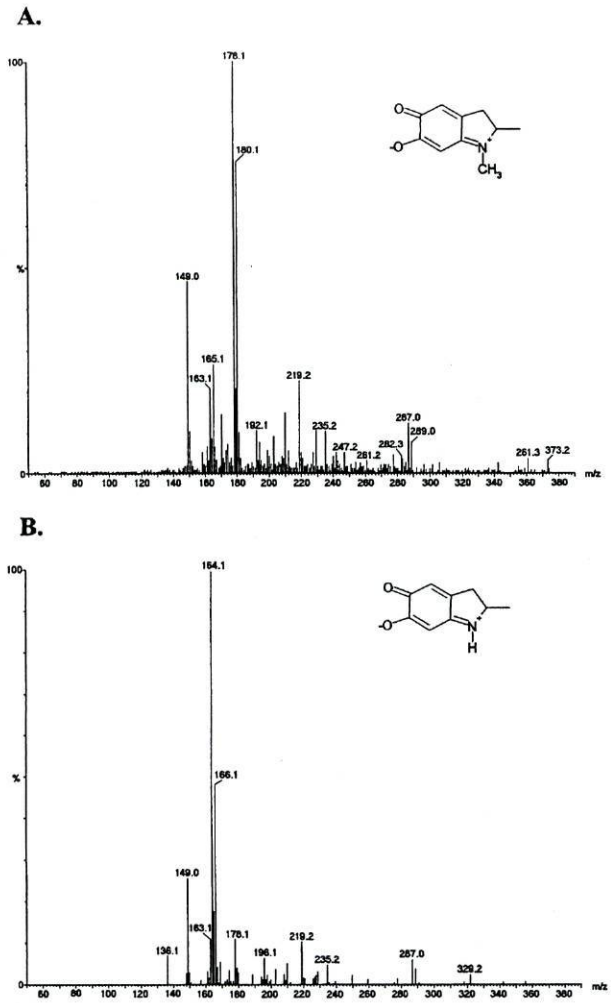


Figure 5. MS spectra of HPLC collected fractions corresponding to N-methyl-α-methyldopaminochrome (A) and to α-methyldopaminochrome (B).

of incubation and of insoluble brown pigments after ~3−4 h of incubation (Figure 4B). Thus, decreases in α-MeDA concentration were smaller and slower than those observed in N-Me-α-MeDA incubations and accompanied by a smaller formation of the respective aminochrome.

UV spectra of aminochromes presented maximum absorption wavelengths at 220, 305, and 490 nm and were similar to the spectrum of aminochromes obtained after oxidation of N-Me-α-MeDA or α-MeDA with $NaIO_4$ (data not shown). Confirming these results, collected HPLC fractions analyzed by MS showed in their spectra the aminochrome $[M + H]^+$ ion as the base peak, respectively, at *m/z* 178.1 for the protonated N-methyl-α-methyldopaminochrome and at *m/z* 164.1 for the protonated α-methyldopaminochrome (Figure 5A,B). Additionally, the aminochromes were structurally identified using tandem mass spectrometry, by applying a general fragmentation pattern characteristic of this class of compounds (*31*).

Both N-Me-α-MeDA and α-MeDA induced marked time- and concentration-dependent GSH depletion (Figure 6A,B, respectively), a fact that was already evident for both metabolites after 1 h of incubation. However, GSH depletion was not accompanied by increases in GSSG levels (Figure 7A,B), with the exception of cells exposed to 0.8 mM N-Me-α-MeDA after 1 h of incubation

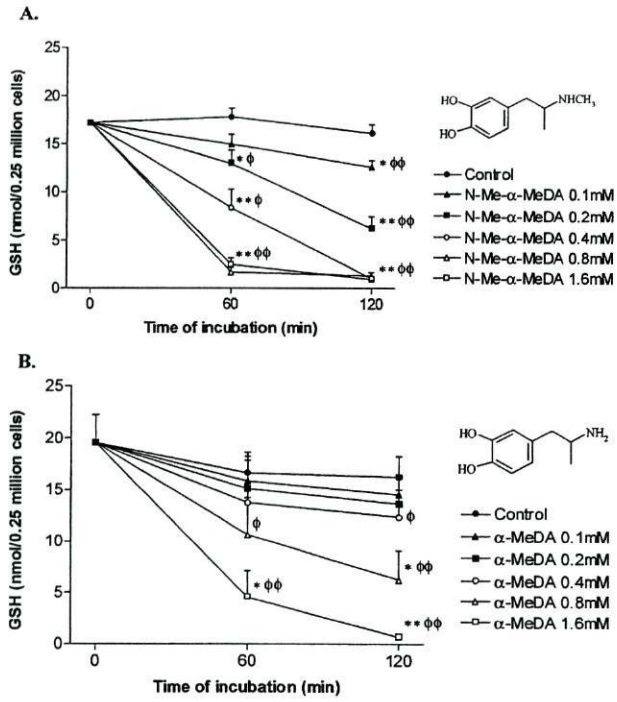


Figure 6. Effect of N-Me-α-MeDA (A) and α-MeDA (B) on GSH levels in cardiomyocyte suspensions. Data represent means ± SEM; $n = 5-6$; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, as compared with control; $^{\phi}P < 0.05$ and $^{\phi\phi}P < 0.01$, as compared with time zero.

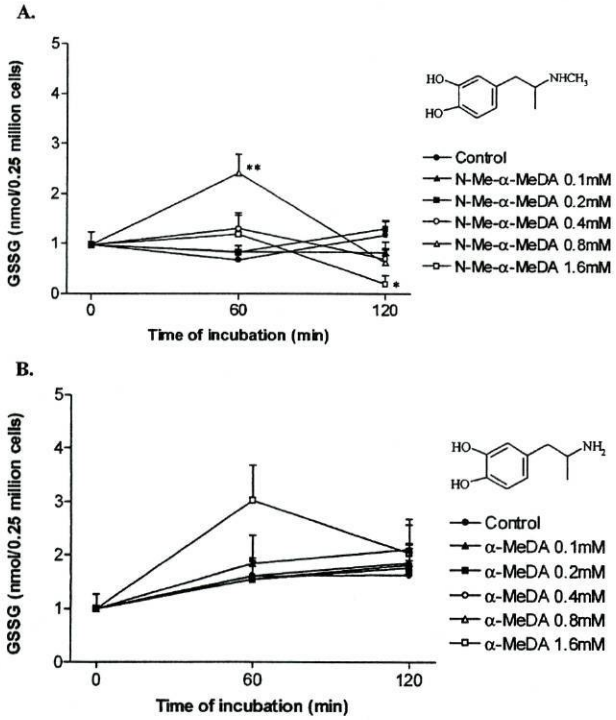


Figure 7. Effect of N-Me-α-MeDA (A) and α-MeDA (B) on GSSG levels in cardiomyocyte suspensions. Data represent means ± SEM; $n = 5-6$; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, as compared with control.

where a slightly but significant increase in GSSG levels was observed, which seems to indicate a GSH depletion by adduct formation.

A potential effect of N-Me-α-MeDA in cellular Ca^{2+} homeostasis was evaluated by flow cytometry. Figure 8A shows examples of representative results of flow cytometry and dot plots of Fluo-3 and PI fluorescence intensities. The PI negative cells (enclosed in region R) were considered viable cells. Fluorescence intensity of Fluo-3 from viable cells was increased after 45 min of exposure to N-Me-α-MeDA (1.6 mM). The time course of increases in intracellular Ca^{2+} levels in cells exposed to 1.6 mM N-Me-α-MeDA is illustrated in Figure 8B. Disruption of Ca^{2+} homeostasis seems to be an early event since a significant increase in intracellular Ca^{2+} was observed after 45 min of incubation.

The energetic status of the cells was also evaluated. ATP levels were significantly decreased in cell suspensions incubated with N-Me-α-MeDA or α-MeDA (Figure 9A,B, respectively). N-Me-α-MeDA-induced ATP depletion was time- and concentration-dependent and clearly more drastic when compared with α-MeDA. ADP levels were not statistically different when compared with control (data not shown).

Another parameter evaluated, which is important for the cell response to oxidative stress, was the activity of the enzymes GR, GST, and GPX. Figure 10 shows that the activity of these enzymes was significantly lower in samples incubated for 2 h with N-Me-α-MeDA (0.4−1.6 mM) or α-MeDA (1.6 mM) than in control samples.

Discussion

MDA, N-Me-α-MeDA, and α-MeDA are major hepatic-derived metabolites of MDMA (*12, 32*). These metabolites formed in liver cells may reach the heart through circulation and exert their toxic effects. It may be postulated that if circulating concentrations of the catecholamines N-Me-α-MeDA and α-MeDA become excessive, with a concomitant saturation of catechol-*o*-methyltransferase systems, then enzymatic, cellular, and autoxidative mechanisms (in those cell compartments where their concentration has increased) could lead to the formation of potentially toxic products such as free radical species, *ortho*-quinones, and aminochromes. In the present study, it was found that N-Me-α-MeDA and α-MeDA induced significant toxicity in isolated rat cardiomyocytes; in contrast, MDMA and MDA were not toxic to rat cardiomyocytes, which indicates a lack of MDMA metabolism in this in vitro model, under the experimental conditions used.

Consistent with known pathways of catecholamine oxidation, incubation of rat cardiomyocytes with N-Me-α-MeDA or α-MeDA resulted in the formation of N-methyl-α-methyldopaminochrome and α-methyldopaminochrome, respectively (Figure 4A,B). Higher levels of aminochrome were obtained after incubation with N-Me-α-MeDA when compared to α-MeDA. The presence of a N-methyl group in catecholamines has been reported to increase dramatically the cyclization rate (*33*). Differences in the rate of cyclization of these catechol metabolites may account for the differences observed in their potencies for producing cardiotoxic effects. The aminochrome can also undergo further oxidation. In fact, as the oxidation progressed, a dark brown/black turbidity appeared in the incubation medium, a consequence of melanin type polymer formation (*23, 34*). It was reported that oxidation of dopamine by enzymatic and nonenzymatic systems gives rise to a black, insoluble polymer only when the concentrations of sulfhydryls such as GSH and cysteine are low relative to that of dopamine (*34, 35*).

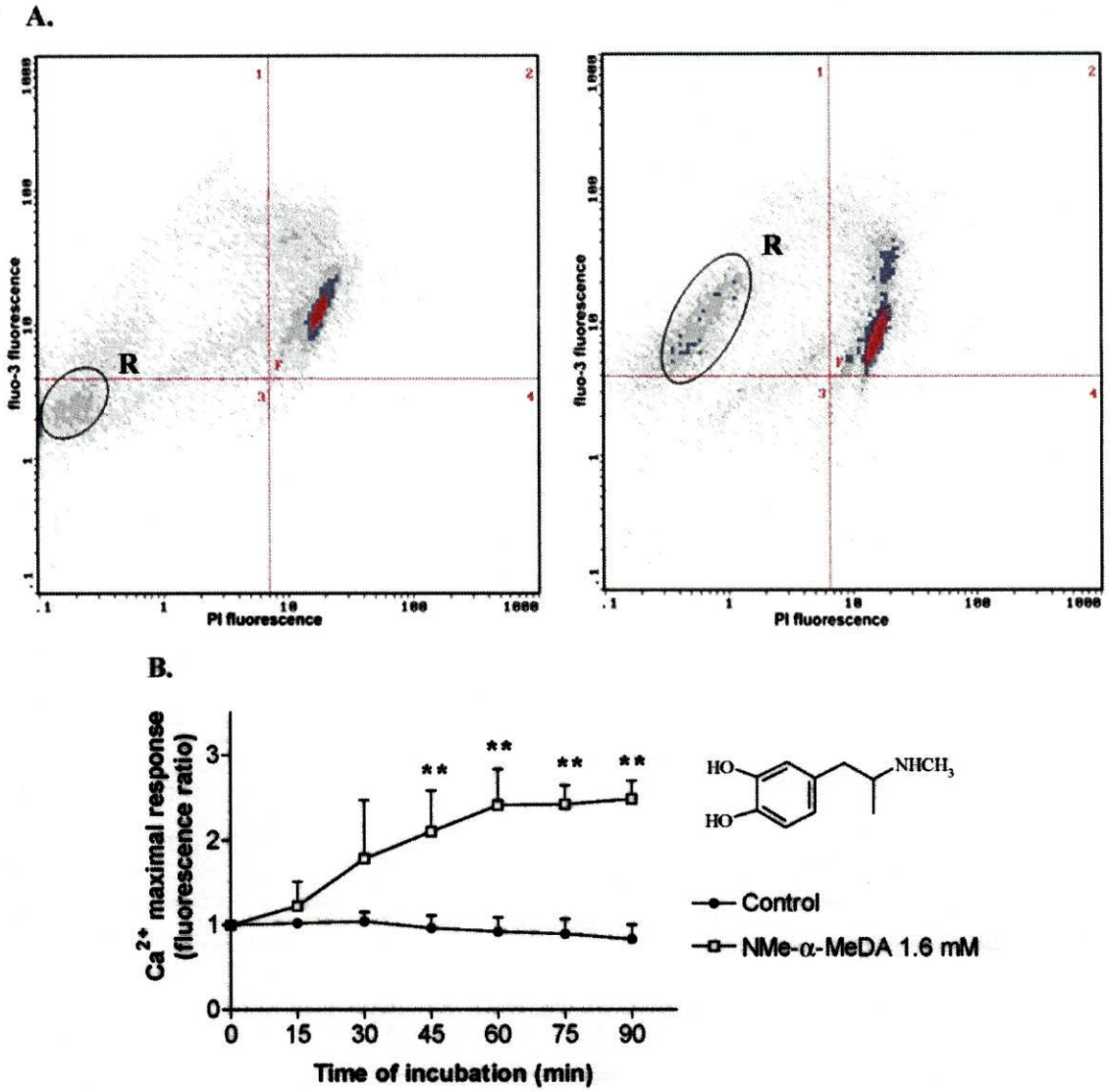


Figure 8. (A) Examples of representative results of flow cytometry. Biparametric dot plots of fluo-3 and PI fluorescence intensities, in control cells (left) and in cells exposed to 1.6 mM N-Me-α-MeDA for 45 min (right). PI negative (viable) cells are gated in region R of the scattergrams. (B) Time course of increase in intracellular Ca^{2+} levels in cells exposed to 1.6 mM N-Me-α-MeDA. Fluorescence ratio = mean Fluo-3 fluorescence in cells exposed to N-Me-α-MeDA/mean Fluo-3 fluorescence in cells at time zero. Data represent means ± SEM; $n = 4$; $^{**}P < 0.01$, as compared with control.

Consistent with these reports, the formation of black pigments in the incubation medium of cells incubated with N-Me-α-MeDA or α-MeDA only occurs as a late stage event. This arises probably from the depleted GSH concentrations (and of the enzymatic antioxidant defense systems) being unable to react with the *ortho*-quinones that were formed within cells (with the result of further oxidation of quinones to melanin type polymers). Melanins represent a large group of chemically active and potentially toxic substances (*36*). Melanins, their intermediates, and reactive oxygen side products exist naturally in vivo and have been implicated in the development of a wide variety of diseases, including cardiovascular disease (for a review see, ref *36*). In the presence of Fe^{3+}, synthetic melanin can catalyze a Fenton type reaction, which generates the hydroxyl radical and initiates lipid peroxidation (*37*). Thus, future work is therefore clearly required to investigate the toxicity exerted by these polymers in cardiomyocytes.

One of the early toxic events observed in cells exposed to N-Me-α-MeDA or α-MeDA was GSH depletion, which was clearly more drastic for the metabolite N-Me-α-MeDA (Figure 6A,B). Oxidation of these catecholamines results in reactive *ortho*-quinones and/or aminochromes, which undergo conjugation with GSH to form the corresponding glutathionyl adducts. Although we did not measure the thiol adduct formation in cardiomyocytes incubated with the catechol metabolites, a drastic depletion on GSH levels was observed without the corresponding enhancement in GSSG levels (Figure 7A,B). It was already shown, in a previous study using freshly isolated rat hepatocytes, that this effect is in fact due to the formation of the GSH conjugates 2-(glutathion-S-yl)-α-MeDA and 5-(glutathion-S-yl)-α-MeDA (*16*). The ability of polyphenolic thioether conjugates to undergo further redox cycling and produce ROS (*12*) provides a rationale for the potential role of these metabolites in MDMA-induced cardiotoxicity. Furthermore, as an endogenous

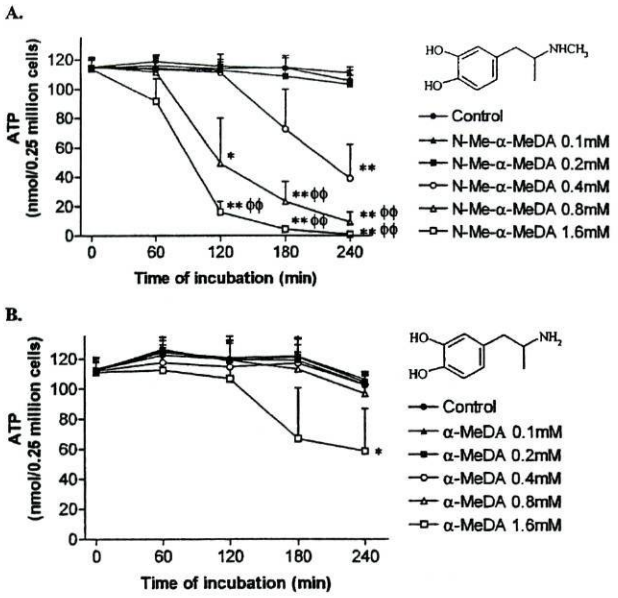


Figure 9. Effect of N-Me-α-MeDA (A) and α-MeDA (B) on ATP levels in cardiomyocyte suspensions. Data represent means ± SEM; $n = 5$; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, as compared with control; $^{\phi\phi}P < 0.01$, as compared with time zero.

antioxidant, GSH is known to play a crucial protective role against cellular injury, which is due to oxidant neutralizing, lipid peroxidase, and/or tocopheryl-radical regenerating activities (*38*). Thus, GSH depletion may render the cells more exposed to the effects of reactive compounds, ROS, and RNS being formed within the cells, leading to deleterious effects in cardiomyocytes. The ability of N-Me-α-MeDA (0.4−1.6 mM, 2 h) or α-MeDA (1.6 mM, 2 h) to inhibit the activities of GR, GPX, and GST (Figure 10A,B) may be related to either the oxidation or the alkylation of sulfhydryl groups present within the enzyme active site. *ortho*-Quinones, aminochromes, and GSH conjugates are known to cause irreversible inhibition of enzymes that possess either a GSH binding site and/or cysteine residues critical for enzyme function (*23*, *39*, *40*). Inhibition of GR and GST by quinones, as well as GR, GPX, and GST by aminochromes, has been reported (*26*, *41*). GSH in conjunction with GPX/GR is responsible for the elimination of cellular H_2O_2 and organic peroxides. Thus, depletion of GSH and/or decreased activity of these enzymes may compromise this pathway thereby allowing H_2O_2 to accumulate to toxic levels.

The ultimate toxic event observed in cells exposed to N-Me-α-MeDA or α-MeDA was the onset of rigor shortening resulting in loss of rod-shaped morphology (Figures 2 and 3), which is an index of cardiomyocyte injury. Importantly, cell contracture occurred without loss of sarcolemmal integrity, which indicates that this injury is clearly distinct from the common measure of cell death defined by trypan blue exclusion or other sarcolemma permeability changes. Hypercontracture of isolated myocytes may correspond to the formation of contraction bands in hearts of individuals who died after using MDMA (*2*). There are some mechanisms that may be responsible for cell contracture, namely, intracellular Ca^{2+} overload as well as GSH or ATP depletion. A complex link exists between intracellular thiol status and Ca^{2+} homeostasis. Indeed, oxidation of sulfhydryl groups of membrane-associated proteins in either mitochondria and/or other intracellular compartments may lead to a disruption of ion homeostasis, especially Ca^{2+} (*42*).

Regulation of intracellular Ca^{2+} is essential for normal function of the myocardium, and alterations of Ca^{2+} homeostasis have been linked to the development of pathological conditions, such as arrhythmias (*43*). In this study, N-Me-α-MeDA-induced rigor shortening occurs without loss of sarcolemmal integrity. Cell contracture, therefore, is not secondary to a massive loss of ATP and gain in Ca^{2+} following breakdown of the sarcolemmal barrier. This suggests that increases in cytosolic Ca^{2+} levels may result from Ca^{2+} release from intracellular

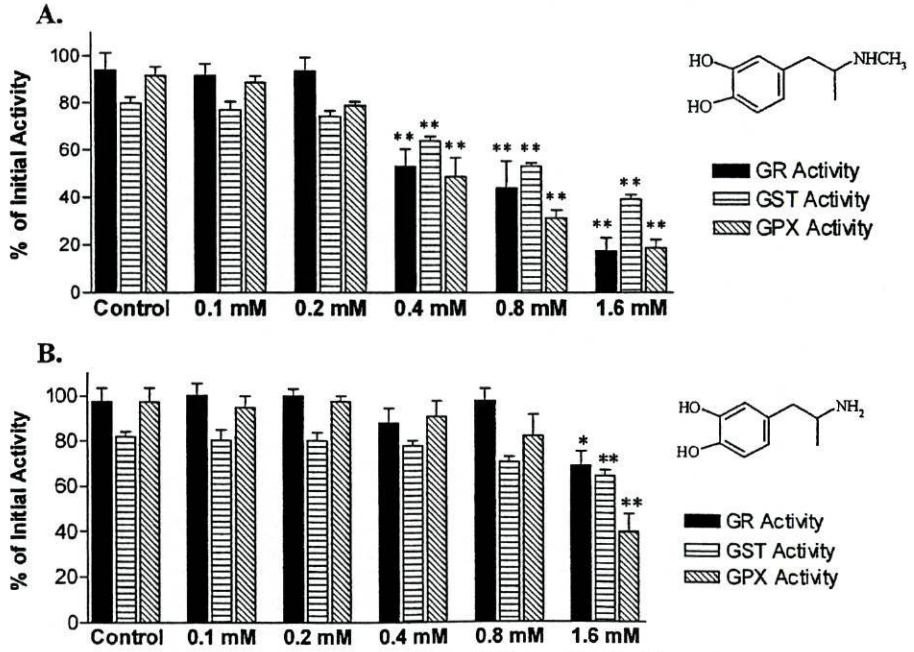


Figure 10. Percentage of GR, GST, and GPX activities after 2 h of N-Me-α-MeDA (A) or α-MeDA (B) incubation in cardiomyocyte suspensions relative to initial activities. Data represent means ± SEM; $n = 6$; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, as compared with control.

stores, namely, mitochondria and sarcoplasmic reticulum. Indeed, quinones are known to cause disruption of intracellular Ca^{2+} homeostasis by release of Ca^{2+} from intracellular stores (mitochondria and endoplasmatic reticulum) and inhibition of Ca^{2+} efflux from the cell (*44*). Additionally, aminochromes have been reported to inhibit the mitochondrial and sarcoplasmic reticular Ca^{2+} uptake system (*23*).

The onset of contracture in cells exposed to N-Me-α-MeDA or α-MeDA (Figure 3A,B) could be also correlated with decreases in intracellular ATP levels (Figure 9A,B). Aminochromes have been reported to affect mitochondrial energy processes (*23*, *45*). Our results suggest that N-Me-α-MeDA, α-MeDA, or their oxidation products in the myocardial cell may impair the process of energy production in mitochondria (which unable cell myofibrils to return to the resting state). The overall process may result in contractile failure of hearts exposed to these cardiotoxic metabolites of MDMA.

It is worthwhile to refer that in this study a drastic depletion of GSH and ATP levels were observed without loss of sarcolemma integrity. Thus, it appears that the observed depletion of nonprotein thiols, such as GSH, or ATP depletion are not sufficient per se to induce death of cardiac myocytes. In agreement, previous reports of Timerman et al. (*42*) showed that total GSH could be depleted from 11 to 1 nmol/mg protein without affecting the integrity of the sarcolemmal barrier. Also, adult myocytes depleted of even 70% of their ATP were reported to retain essentially normal rod-shaped morphology (*46*). Given the predominant role of mitochondria in cardiac muscle metabolism, mitochondrial dysfunction may be particularly important to mechanisms of cell death in cardiomyocytes. It was already shown that peroxidative damage originating in the mitochondria is a major event in the onset of cell death in cardiomyocytes depleted of GSH (*47*). Thus, our results seem to indicate that cell death provoked by N-Me-α-MeDA or α-MeDA would occur as a late stage event, which probably will be due to the depletion of mitochondrial GSH. Mitochondria would then be unable to detoxify H_2O_2 and organic peroxides being formed within this organelle; this may result in membrane peroxidative damage and initiation of a cascade of events leading to necrosis or apoptosis, depending on several factors, namely, the putative efflux of mitochondrial apoptotic factors and cellular energy status.

The concentrations of MDMA metabolites used in the present study may be considered above those found in human abusers, usually in the low micromolar range (*48*). However, the evaluation of acute toxicity of MDMA and/or its metabolites as is the case of the present study (this type of study with freshly isolated cardiomyocytes is only reliable in incubations up to 4 h since the biochemical characteristics of the cells tend to be lost after this time) needs to address higher concentrations than those usually obtained during chronic use of this drug. In fact, it is important to evaluate the mechanistic interactions of MDMA and/or its metabolites with cellular components, which is only possible at the concentrations used. A lower but longer effect during in vivo chronic exposure may also be exceptionally deleterious to the heart, although further studies are needed to confirm this hypothesis. Importantly, tissue concentrations of MDMA and its metabolites have been reported to be substantially higher (up to 18 times) than blood concentrations (*48*, *49*). Thus, new studies are also needed to verify which heart concentrations are achieved for MDMA and its toxic metabolites during intoxications with this drug of abuse. Notably, it was already reported that in humans, N-Me-α-MeDA, a major toxic metabolite in the present study, reaches plasma concentrations similar to those of MDMA (*50*).

In conclusion, the present findings show that MDMA metabolites, N-Me-α-MeDA and α-MeDA, but not the parent compound, induce significant toxicity to freshly isolated rat cardiomyocytes, N-Me-α-MeDA being the most toxic of the metabolites studied. The loss of GSH and the modification of enzyme activities induced by N-Me-α-MeDA, α-MeDA, and/or their oxidation products, clearly show that one of the early consequences of MDMA metabolism is a disruption of thiol homeostasis, which may result in disruption of Ca^{2+} homeostasis, ATP depletion, and cell contracture. Thus, metabolism of MDMA, resulting in the formation of the highly reactive compounds N-Me-α-MeDA and α-MeDA, is required for the expression of MDMA-induced cardiotoxicity in vitro.

Acknowledgment. This work was supported by Ph.D. grants from FCT (Praxis XXI/BD/20087/99 and Praxis XXI/BD/18520/98) and POCTI, Portugal, and by FEDER European Community funding (Project POCTI/36099/FCB/2000).

References

(1) Henry, J. A., Jeffreys, K. J., and Dawling, S. (1992) Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet 340*, 384–387.
(2) Milroy, C. M., Clark, J. C., and Forrest, A. R. W. (1996) Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *J. Clin. Pathol. 49*, 149–153.
(3) Suarez, R., and Riemersma, R. (1988) "Ecstasy" and sudden cardiac death. *Am. J. Forensic Med. Pathol. 9*, 339–341.
(4) O'Cain, P., Hletko, S., Ogden, B., and Varner, K. (2000) Cardiovascular and sympathetic responses and reflex changes elicited by MDMA. *Physiol. Behav. 70*, 141–148.
(5) 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.
(6) 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.
(7) Varner, K. Y., Delcarpio, J. B., and Moerschbaecher, J. M. (1998) Cardiac toxicity elicited by repeated administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *NIDA Res. Monogr. 179*, 214.
(8) Rona, G. (1985) Catecholamine cardiotoxicity. *J. Mol. Cell Cardiol. 17*, 291–306.
(9) Wheatley, A. M., Thandroyen, F. T., and Opie, L. H. (1985) Catecholamine-induced myocardial cell damage: catecholamines or adrenochrome? *J. Mol. Cell Cardiol. 17*, 349–359.
(10) Gesi, M., Lenzi, P., Soldani, P., Ferrucci, M., Giusiani, A., Fornai, F., and Paparelli, A. (2002) Morphological effects in the mouse myocardium after methylenedioxymethamphetamine administration combined with loud noise exposure. *Anat. Rec. 267*, 37–46.
(11) He, S. Y. (1995) Methamphetamine-induced toxicity in cultured adult rat cardiomyocytes. *Nippon Hoigaku Zasshi 49*, 175–186.
(12) Bai, F., Lau, S. S., and Monks, T. J. (1999) Glutathione and *N*-acetylcysteine conjugates of α-Methyldopamine produce serotoninergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol. 12*, 1150–1157.
(13) Bai, F., Jones, D. C., Lau, S. S., and Monks, T. J. (2001) Serotonergic Neurotoxicity of 3,4-(±)-Methylenedioxyamphetamine and 3,4-(±)-Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) Is Potentiated by Inhibition of gamma-Glutamyl Transpeptidase. *Chem. Res. Toxicol. 14*, 863–870.
(14) Miller, R. T., Lau, S. S., and Monks, T. J. (1996) Effects of intracerebroventricular administration of 5-(glutathion-S-yl)-α-Methyldopamine on brain dopamine, serotonin, and norepinephrine concentrations in male sprague-dawley rats. *Chem. Res. Toxicol. 9*, 457–465.

(15) Miller, R. T., Lau, S. S., and Monks, T. J. (1997) 2,5-bis-(Glutathion-S-yl)-α-Methyldopamine, a putative metabolite of (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. *Eur. J. Pharmacol. 323*, 173−180.
(16) Carvalho, M., Milhazes, N., Remião, F., Borges, F., Fernandes, E., Monks, T., Amado, F., Carvalho, F., and Bastos, M. L. (2004) Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and α-Methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch. Toxicol. 78*, 16−24.
(17) Carvalho, M., Hawksworth, G., Milhazes, N., Borges, F., Monks, T., Fernandes, E., Carvalho, F., and 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.
(18) 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.
(19) 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.
(20) Marquardt, G. M., DiStefano, V., and Ling, L. L. (1978) Metabolism of beta-3,4-methylenedioxyamphetamine in the rat. *Biochem. Pharmacol. 27*, 1503−1505.
(21) 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.
(22) Bindoli, A., Rigobello, M. P., and Galzigna, L. (1989) Toxicity of aminochromes. *Toxicol. Lett. 48*, 3−20.
(23) Bindoli, A., Rigobello, M. P., and Deeble, D. J. (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biol. Med. 13*, 391−405.
(24) 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.
(25) Remião, F., Carmo, H., Carvalho, F., and Bastos, M. L. (2001) Cardiotoxicity studies using freshly isolated calcium-tolerant cardiomyocytes from adult rat. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 37*, 1−4.
(26) Remião, F., Carvalho, M., Carmo, H., Carvalho, F. D., and Bastos, M. L. (2002) Cu2+-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chem. Res. Toxicol. 15*, 861−869.
(27) Stocchi, V., Cucchiarini, L., Magnani, M., Chiarantini, L., Palma, P., and Crescentini, G. (1985) Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal. Biochem. 146*, 118−124.
(28) Carvalho, M., Carvalho, F., Remião, F., Pereira, M. L., Pires-das-Neves, R., and Bastos, M. L. (2002) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch. Toxicol. 76*, 166−172.
(29) Boston, D., Koyama, T., Rodriguez-Larrain, J., Zou, A., Su, Z., and Barry, W. (1998) Effects of angiotensin II on intracellular calcium and contracture in metabolically inhibited cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther. 285*, 716−723.
(30) DiVirgilio, F., Steinberg, T. H., and Silverstein, S. C. (1990) Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium 11*, 57−62.
(31) Lemos-Amado, F., Domingues, P., Ferrer-Correia, A., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Carvalho, F. D., and Bastos, M. L. (2001) Electrospray tandem mass spectrometry of aminochromes. *Rapid Commun. Mass Spectrom. 15*, 2466−2471.
(32) Kreth, K.-P., Kovar, K.-A., 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.
(33) 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.
(34) 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.
(35) Carstam, R., Brinck, C., Hindemith-Augustsson, A., Rorsman, H., and Rosengren, E. (1991) The neuromelanin of the human substancia nigra. *Biochim. Biophys. Acta 1097*, 152−160.
(36) 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.
(37) Ben-Shachar, D., Riederer, P., and Youdim, M. B. (1991) Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem. 57*, 1609−1614.
(38) DiMascio, P., Murphy, M. E., and Sies, H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr. 53*, 194S−200S.
(39) Ommen, B. V., Ploemen, J. H. T. M., Bogaards, J. J. P., Monks, T. J., Lau, S. S., and Bladeren, P. J. V. (1991) Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. Structure−activity relationship and mechanism. *Biochem. J. 276*, 661−666.
(40) Monks, T. J., and Lau, S. S. (1992) Toxicology of quinone-thioethers. *Crit. Rev. Toxicol. 22*, 243−270.
(41) Remião, 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.
(42) Timerman, A. P., Altschuld, R. A., Hohl, C. M., Brierley, G. P., and Merola, A. J. (1990) Cellular glutathione and the response of adult rat heart myocytes to oxidant stress. *J. Mol. Cell Cardiol. 22*, 565−575.
(43) Kang, Y. J. (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. *Environ. Health Perspect. 109*, 27−34.
(44) Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., and Nicotera, P. (1989) Role of Ca2+ in toxic cell killing. *TIPS 10*, 281−285.
(45) Taam, G. M., Takeo, S., Ziegelhoffer, A., Singal, P. K., Beamish, R. E., and Dhalla, N. S. (1986) Effect of adrenochrome on adenine nucleotides and mitochondrial oxidative phosphorylation in rat heart. *Can. J. Cardiol. 2*, 88−93.
(46) Haworth, R. (1990) Use of isolated adult myocytes to evaluate cardiotoxicity. II. Preparation and properties. *Toxicol. Pathol. 18*, 521−530.
(47) Dhanbhoora, C. M., and Babson, J. R. (1992) Thiol depletion induces lethal cell injury in cultured cardiomiocytes. *Arch. Biochem. Biophys. 293*, 130−139.
(48) 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.
(49) Sticht, G., Pluisch, F., Bierhoff, E., and Kaferstein, H. (2003) Fatal outcome of Ecstasy overdose. *Arch. Kriminol. 211*, 73−80.
(50) Segura, M., Ortuno, J., Farre, M., McLure, J. A., Pujadas, M., Pizarro, N., Llebaria, A., Joglar, J., Roset, P. N., Segura, J., and Torre, R. d. L. (2001) 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem. Res. Toxicol. 14*, 1203−1208.

TX049960F

PARTE III

DISCUSSÃO GERAL E REFERÊNCIAS

13. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O consumo de "ecstasy" constitui actualmente um grave problema de saúde pública e de ordem social em muitos países da União Europeia e nos Estados Unidos da América. O esclarecimento dos mecanismos de toxicidade que levam ao aparecimento de distúrbios psíquicos e neuropsiquiátricos, hipertermia, falência hepática ou renal aguda, rabdomiólise, hiponatrémia, coagulação intravascular disseminada e complicações cardiovasculares poderá constituir um auxiliar precioso no combate ao seu abuso e permitir o desenvolvimento de meios de tratamento específicos para as lesões resultantes da sua utilização.

Quando se efectuou a pesquisa bibliográfica que precedeu os trabalhos experimentais desta dissertação, verificou-se que, embora a toxicidade da MDMA a nível neuronal tenha sido alvo de estudo intenso nas últimas duas décadas, pouca atenção tem sido dada à investigação dos seus efeitos tóxicos ao nível de outros órgãos, nomeadamente o fígado, rim e coração. Assim, afigurou-se pertinente aprofundar os conhecimentos relativos aos efeitos e mecanismos envolvidos na toxicidade da MDMA ao nível desses órgãos, que são reiteradamente referidos na literatura científica como estando associados ao consumo de "ecstasy". Para a sua concretização foram desenvolvidos ou adaptados vários modelos experimentais entre os quais se destacam: 1) a preparação de suspensões de hepatócitos isolados de ratinho e de rato, 2) a preparação de culturas primárias de células tubulares proximais renais de rato e humanas e 3) a preparação de suspensões de cardiomiócitos isolados de rato.

Como referido na introdução, os mecanismos envolvidos na expressão da toxicidade da MDMA são complexos, envolvendo vários factores, entre os quais: i) a estimulação simpática resultante da libertação de aminas biogénicas, principalmente serotonina mas também das catecolaminas adrenalina, noradrenalina e dopamina a partir dos terminais nervosos e da medula supra-renal, ii) a oxidação enzimática e não-enzimática das aminas biogénicas libertadas, iii) o metabolismo da MDMA e iv) a hipertermia. Nos trabalhos experimentais integrados nesta dissertação foi dado particular ênfase ao estudo da contribuição da hipertermia e de um possível efeito tóxico directo da MDMA e/ou dos seus metabolitos na expressão da toxicidade desta anfetamina ao nível do fígado, rim e coração. Os resultados obtidos foram amplamente discutidos nos trabalhos apresentados nesta dissertação. O que se pretende neste capítulo é integrar os resultados obtidos nos diferentes

estudos, realçando os factores que poderão ter um papel determinante na toxicidade da MDMA.

A importância da hipertermia na toxicidade induzida pela MDMA

Tal como referido na introdução, a hipertermia é uma complicação observada frequentemente em indivíduos intoxicados com "ecstasy" (Henry *et al.*, 1992; Murthy *et al.*, 1997a; Walubo and Seger, 1999) e pensa-se que poderá ter origem em vários factores, nomeadamente a estimulação das vias serotoninérgicas do hipotálamo (Gordon *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1995; Walubo and Seger, 1999), o aumento da actividade motora acompanhado por um estado hipermetabólico do músculo esquelético (Woods and Henry, 1992), a estimulação da lipólise (Nonogaki, 2000) e da glicogenólise (Darvesh *et al.*, 2002), a diminuição da perda de calor através da pele devido à vasoconstrição periférica induzida pelas catecolaminas (Gordon *et al.*, 1991; Pedersen and Blessing, 2001; Blessing *et al.*, 2003) e a produção de calor resultante da activação da proteína dissociadora mitocondrial UCP-3 (Mills *et al.*, 2003).

Nos estudos experimentais realizados *in vivo* em ratinhos (Carvalho *et al.*, 2002) e em ratos (Gordon *et al.*, 1991; Dafters, 1995; Dafters and Lynch, 1998; Malberg and Seiden, 1998) verificou-se que a administração de MDMA induz um aumento da temperatura corporal dos animais de forma dependente da dose e da temperatura ambiente, atingindo valores na ordem dos 41°C. Nesses estudos verificou-se igualmente que a letalidade induzida pela MDMA é potenciada pelo aumento da temperatura ambiente. Estes resultados são de elevada importância visto a "ecstasy" ser normalmente consumida em locais de temperatura ambiente elevada (por exemplo, nas festas "rave"), o que, conjuntamente com a hiperactividade motora e o estado de desidratação, poderá potenciar os seus efeitos no sistema termorregulador.

Tem sido sugerido que a elevação da temperatura corporal a níveis não letais induzida pela MDMA pode agravar muitas das complicações observadas em consumidores de "ecstasy", tais como a rabdomiólise, a CID e a falência hepática ou renal aguda, entre outras (Brown and Osterloh, 1987; Chadwick *et al.*, 1991; Green *et al.*, 2003). Nesta dissertação, a contribuição da hipertermia nos efeitos tóxicos induzidos pela MDMA *in vitro* foi avaliada usando suspensões de hepatócitos isolados de ratinho Charles-River incubados a diferentes temperaturas, 37°C e 41°C, de forma a simular condições de normotermia e de hipertermia, respectivamente (Trabalho I). Neste estudo demonstrou-se

que a hipertermia *per se* é um factor determinante na toxicidade celular, visto que um aumento da temperatura de incubação de 37°C para 41°C induziu stresse oxidativo nos hepatócitos isolados de ratinho, traduzido por peroxidação lipídica e consequente perda de viabilidade celular. Também foi demonstrado por outros autores que a hipertermia induz peroxidação lipídica em fígado de rato (Skibba *et al.*, 1991; Ando *et al.*, 1994) e em suspensões de hepatócitos isolados de rato (Carvalho *et al.*, 1997). Os mecanismos responsáveis pelo stresse oxidativo induzido pela hipertermia não estão ainda completamente esclarecidos mas sabe-se que envolvem a formação de ROS, nomeadamente de radicais superóxido e hidroxilo (Powers *et al.*, 1992; Flanagan *et al.*, 1998). Estes radicais podem formar-se após a conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase induzida pela hipertermia e em presença de ferro, que funciona como catalisador na reacção de Fenton (Skibba *et al.*, 1989; Powers *et al.*, 1992). Neste trabalho, verificou-se a ocorrência de peroxidação lipídica, apesar dos níveis de GSH e GSSG se situarem dentro dos valores encontrados em condições de normotermia. É de referir que num estudo realizado em hepatócitos isolados de rato nas mesmas condições de hipertermia (Carvalho *et al.*, 1997) verificou-se que, paralelamente à peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular, ocorria oxidação da GSH (depleção de GSH e aumento de GSSG). Esta diferença poderá dever-se a uma maior capacidade dos hepatócitos de ratinho para a manutenção dos níveis basais de GSH ou a uma diferente distribuição intracelular dos locais de formação de ROS (por exemplo, na imediação dos lípidos membranares).

A incubação, a 37°C, dos hepatócitos isolados de ratinho com MDMA induziu depleção de GSH de forma dependente da concentração e do tempo de exposição mas praticamente não teve repercussão a nível da peroxidação lipídica e da viabilidade celular (Trabalho I). No entanto, em condições de hipertermia (41°C), verificou-se a potenciação da depleção de GSH induzida pela MDMA, peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular. A potenciação pela hipertermia da depleção de GSH induzida pela MDMA poderá estar associada a um aumento do seu metabolismo (etapa da desmetilenação) uma vez que a GSSG não aumentou proporcionalmente, embora esta hipótese necessite de ser investigada no futuro. Estes resultados sugerem a potenciação da toxicidade da MDMA pela hipertermia, pelo menos, *in vitro*. Dado o papel crucial da GSH na prevenção da peroxidação lipídica (Di Mascio *et al.*, 1991), a sua depleção torna as células mais expostas ao stresse oxidativo induzido pelas altas temperaturas de incubação, podendo resultar em peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular.

O efeito da hipertermia na toxicidade induzida pela MDMA no rim e coração não foi ainda investigado. Seria igualmente de grande relevância avaliar e comparar o efeito da MDMA na expressão das proteínas de choque térmico em células desses órgãos. A diferente susceptibilidade das células ao stresse oxidativo induzido pela hipertermia poderá ser crucial na expressão da toxicidade da MDMA nos referidos órgãos.

A importância do metabolismo na toxicidade induzida pela MDMA

O metabolismo da MDMA envolve a sua N-desmetilação dando origem à MDA, sendo esta etapa catalisada, no Homem, predominantemente pela *CYP*2B6 (Kreth *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2000). A MDMA e a MDA sofrem O-desmetilenação, a qual por acção do sistema enzimático citocromo P450 promove a quebra do anel metilenodioxol, com formação da N-Me-α-MeDA e da α-MeDA, respectivamente (Lim and Foltz, 1988; Kreth *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2000). A etapa da desmetilenação da MDMA pode ser catalisada, no Homem, pelas isoenzimas *CYP*2D6, *CYP*1A2, *CYP*2B6 e *CYP*3A4 (Kreth *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2000) ou pode igualmente ser mediada por mecanismos independentes do citocromo P450, nomeadamente pelo radical hidroxilo (Kumagai *et al.*, 1991). Estes metabolitos da MDMA possuem um grupo catecol na sua estrutura química que os torna muito reactivos e instáveis, sendo facilmente oxidados a *o*-quinonas (ver Fig. 7, Trabalho II). Dado que as quinonas são compostos electrofílicos (do tipo aceitadores de Michael), a danificação celular pode ocorrer através da alquilação de biomoléculas tais como proteínas cruciais às células e/ou DNA (Bolton *et al.*, 2000). Na presença de GSH, estas quinonas reagem rapidamente formando aductos estáveis com a GSH (Hiramatsu *et al.*, 1990; Patel *et al.*, 1991).

Os estudos realizados *in vivo* em ratinhos Charles-River (Carvalho *et al.*, 2002) e os estudos *in vitro* em hepatócitos isolados de ratinhos da mesma estirpe (Trabalho I) e em hepatócitos isolados de rato Wistar (Trabalho III) permitiram verificar que a MDMA induz a depleção dos níveis de GSH hepática. Este efeito está em consonância com os resultados obtidos por Beitia e colaboradores (1999 e 2000). A depleção de GSH foi também observada após incubação de suspensões de hepatócitos isolados de rato com os metabolitos da MDMA, nomeadamente a MDA (Trabalho II), a N-Me-α-MeDA (Trabalho III) e a α-MeDA (Trabalho II). Para todos os compostos estudados, a diminuição dos níveis de GSH foi dependente da concentração e do tempo de incubação. Verificou-se, no entanto, que enquanto a depleção de GSH induzida pela MDMA foi semelhante à obtida para o seu

metabolito MDA, os catecóis N-Me-α-MeDA (nas concentrações de 0,8 mM e 1,6 mM) e α-MeDA (na concentração de 1,6 mM) induziram uma depleção mais acentuada de GSH a qual foi acompanhada pela perda de viabilidade celular e diminuição da actividade das enzimas antioxidantes GPX, GR e GST. É importante realçar que nestes estudos, ao contrário do que se verificou para as concentrações mais elevadas, nas concentrações mais baixas não se observaram diferenças significativas entre a depleção da GSH induzida pela MDMA ou MDA e a dos seus metabolitos. Estes resultados sugerem a metabolização da MDMA e da MDA nos hepatócitos para as concentrações mais baixas e a saturação do metabolismo hepático (etapa da desmetilenação) na presença de concentrações mais elevadas destes compostos. Tal foi já sugerido em estudos recentes da farmacocinética da MDMA no rato e no Homem (De la Torre *et al.*, 2000a; Farré *et al.*, 2004). Alternativamente, pode haver inibição desta via metabólica por um metabolito formado. A corroborar esta hipótese, foi demonstrado em microssomas hepáticos de rato e humanos que a MDMA pode actuar como um inibidor competitivo da *CYP*2D6, pela formação de um complexo metabolito-enzima (Wu *et al.*, 1997; Delaforge *et al.*, 1999).

Nos estudos realizados no âmbito desta dissertação verificou-se que a depleção de GSH induzida pela MDMA e seus metabolitos não foi acompanhada por um aumento proporcional de formação de GSSG (Trabalhos I, II, III e V), o que indicia a formação de conjugados com a GSH. Em concordância, foram identificados e caracterizados os aductos da GSH com a α-MeDA, nomeadamente a 2-(glutation-S-il)-α-MeDA e a 5-(glutation-S-il)-α-MeDA, em hepatócitos isolados incubados com a MDA ou a α-MeDA (Trabalho II). A formação de conjugados da α-MeDA (Easton *et al.*, 2003) e da N-Me-α-MeDA (Hiramatsu *et al.*, 1990) com a GSH foi também observada em preparações de microssomas de fígado humano e de rato, respectivamente.

Apesar da MDMA ser metabolizada extensivamente no fígado, outros órgãos como o rim e o coração poderão também metabolizar a MDMA em alguma extensão. No entanto, parece não existir ainda estudos realizados no sentido de avaliar e comparar a metabolização extra-hepática da MDMA. Alternativamente, os metabolitos formados no fígado poderão atingir os referidos órgãos através da circulação sistémica. A disposição dos catecóis existentes em circulação sistémica será bastante diferente da dos gerados *in situ*, nomeadamente nos hepatócitos. A α-MeDA e a N-Me-α-MeDA, formadas após metabolização hepática da MDMA, podem ser O-metiladas por acção da COMT na corrente sanguínea. É importante referir que os metabolitos resultantes da actividade desta

enzima, como por exemplo a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina, não são desprovidos de toxicidade e foram recentemente implicados no efeito hiponatrémico induzido pela MDMA (Fallon *et al.*, 2002; Forsling *et al.*, 2002). No entanto, se a quantidade de catecóis formados for muito elevada, concomitantemente com a libertação na corrente sanguínea de catecolaminas induzida pela MDMA, poderá haver saturação da COMT plasmática, permitindo assim aos metabolitos α-MeDA e N-Me-α-MeDA atingir e concentrar-se nos órgãos alvo periféricos.

Até ao momento, não existem quaisquer dados na literatura relativos aos níveis dos metabolitos desmetilenados da MDMA (α-MeDA e N-Me-α-MeDA) no fígado, rim ou coração, quer em humanos quer em animais de experiência. No entanto, num estudo realizado recentemente em voluntários humanos, verificou-se que os níveis plasmáticos obtidos para a N-Me-α-MeDA são semelhantes aos da MDMA (Segura *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que as concentrações de MDMA e do seu metabolito MDA encontradas em alguns órgãos ou tecidos são substancialmente superiores (cerca de 18 vezes) às plasmáticas (Chu *et al.*, 1996; García-Repetto *et al.*, 2003; De Letter *et al.*, 2004). Tendo em conta que a maioria dos casos de intoxicações agudas ou fatais pela MDMA descritos na literatura referem valores plasmáticos na ordem de 2,5 a 50 μM (Brown and Osterloh, 1987; Henry *et al.*, 1992; Randall, 1992; De Letter *et al.*, 2004), as concentrações usadas nos trabalhos apresentados nesta dissertação correspondem muito provavelmente às atingidas numa situação *in vivo*. É, no entanto, imperativo em estudos futuros determinar as concentrações de MDMA e dos seus metabolitos nos órgãos de indivíduos intoxicados com esta droga de abuso.

Nos trabalhos realizados no âmbito desta dissertação foi possível verificar que existem diferenças importantes na susceptibilidade dos diferentes tipos de células à toxicidade dos compostos estudados. De facto, ao contrário do observado nos estudos em hepatócitos isolados, verificou-se que a MDMA e a MDA não exercem toxicidade em células tubulares proximais (PTCs) renais de rato e humanas (Trabalho IV) ou em cardiomiócitos isolados de rato (Trabalho V) nas condições adoptadas nos ensaios. No entanto, os metabolitos desmetilenados da MDMA induziram toxicidade significativa em todos os modelos *in vitro* usados (Trabalhos II, III, IV e V). Estes resultados sugerem que o metabolismo da MDMA com formação da N-Me-α-MeDA e α-MeDA é essencial para a expressão da hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade induzida pela MDMA, pelo menos, *in vitro*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos estudos

realizados por outros autores no sentido de avaliar a toxicidade directa da MDMA e seus metabolitos a nível neuronal. Nesses estudos verificou-se que a MDMA e a MDA quando injectadas directamente no cérebro não são neurotóxicas (Molliver *et al.*, 1986; Schmidt and Taylor, 1988), o que sugere que o metabolismo sistémico poderá ter também um papel determinante no desenvolvimento da neurotoxicidade desta droga. Em consonância com esta hipótese, foi demonstrado que o pré-tratamento de ratos com SKF-525A (inibidor do citocromo P450) atenua a depleção de 5-HT induzida pela MDMA, enquanto que o tratamento com um indutor do citocromo P450 (por exemplo, o fenobarbital) potencia a depleção de 5-HT (Gollamudi *et al.*, 1989). A incapacidade da MDMA para inibir a actividade da triptofano hidroxilase *in vitro* é também indicativa da necessidade de activação metabólica para que haja expressão desse efeito (Schmidt and Taylor, 1988). Mais recentemente, foi demonstrado que os tioéteres formados por conjugação 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] são intervenientes importantes nos efeitos neurotóxicos da MDMA (Miller *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 2001).

O fígado tem um papel fundamental na biossíntese e disposição dos conjugados da GSH pois possui uma actividade de glutationa S-transferase muito elevada (Rushmore *et al.*, 1994). Estes conjugados podem acabar por expressar toxicidade no local onde são formados pois verifica-se que, em muitos casos, a actividade pró-oxidante do composto pai é mantida ou mesmo aumentada após conjugação com a GSH ou cisteína (Monks and Lau, 1997; Bolton *et al.*, 2000). Os conjugados polifenólicos com a GSH podem ainda ser oxidados com formação de quinonas-tioéteres, os quais, dada a sua reactividade, podem ligar-se a uma nova molécula de GSH, originando o conjugado 2,5-bis-glutationilo da N-Me-α-MeDA ou da α-MeDA (ver Fig. 7, Trabalho II) (Miller *et al.*, 1997). O posterior efluxo hepático dos metabolitos tioéteres da MDMA e metabolismo de fase III pela γ-GT, dipeptidase e N-acetiltransferase resultam na formação de conjugados com a cisteína e N-acetilcisteína (ácidos mercaptúricos). O cérebro e o rim são potenciais alvos da toxicidade destes compostos devido à actividade particularmente elevada de γ-GT na membrana endotelial da barreira hemato-encefálica (Wolff *et al.*, 1992) e na membrana apical das células tubulares proximais renais (Tate and Meister, 1985). É importante salientar que os conjugados com a GSH, cisteína e N-acetilcisteína formados na metabolização da MDMA são potencialmente tóxicos para o cérebro, rim e outros órgãos dado que o grupo catecol e a estrutura α-metilfeniletilamínica do composto de partida são mantidos. Assim, os

conjugados formados podem originar ciclos redox e induzir stresse oxidativo ou, alternativamente, atacar locais nucleofílicos intracelulares e causar necrose celular.

Embora a síntese de ácidos mercaptúricos a nível renal seja normalmente considerada como uma via de destoxificação, os conjugados com a GSH obtidos de várias quinonas, hidroquinonas e aminofenóis são nefrotóxicos em modelos animais (Lau, 1995; Monks and Lau, 1998). Também os conjugados da α-MeDA com a GSH, nomeadamente a 5-(glutation-S-il)-α-MeDA e a 2,5-bis(glutation-S-il)-α-MeDA, revelaram-se nefrotóxicos potentes nas condições usadas nos ensaios (Trabalho IV). Um factor determinante na nefrotoxicidade expressa por estes compostos é a impossibilidade de ciclizarem internamente (uma vez que o grupo amina do resíduo cisteinil está bloqueado), o que lhes permite manter a sua actividade redox (Monks and Lau, 1997; Bai *et al.*, 1999). A γ-GT e a dipeptidase proporcionam a formação de um metabolito (conjugado com a cisteína) mais facilmente oxidável que o conjugado com a GSH de partida e, assim, mais reactivo para as células tubulares proximais renais. No entanto, contrariamente ao que poderia ser previsto, a pré-incubação de PTCs de rato com a acivicina (inibidor da γ-GT) ou a bestatina (inibidor da aminopeptidase M) resultou num aumento da citotoxicidade do conjugado 5-(glutation-S-il)-α-MeDA (Trabalho IV). Resultados similares foram também obtidos por outros autores para os conjugados com a GSH de clorohidroquinonas (Mertens *et al.*, 1991), p-aminofenol (Anthony *et al.*, 1993) e menadiona (Haenen *et al.*, 1994). Para explicar este efeito, foi hipotetizado que a inibição da γ-GT previne a ciclização intramolecular do conjugado cisteinil ou cisteinilglicina. Nesta reacção, o grupo amina do resíduo cisteinil condensa com o grupo carbonilo da quinona com formação de um composto de estrutura benzotiazólica (ver Fig. 6, Trabalho IV). Esta reacção de ciclização intramolecular pode assim ser considerada uma reacção de destoxificação uma vez que elimina a reactividade da função quinónica do tioéter. Assim, a inibição destas vias metabólicas resulta no aumento das concentrações extracelulares dos conjugados com a GSH. Dado que estes conjugados mantêm a reactividade, podendo entrar num ciclo redox e ser re-oxidados a quinonas-tioéteres, na presença de oxigénio molecular, com formação de ROS, é provável que induzam peroxidação lipídica das membranas celulares. Por outro lado, as quinonas-tioéteres reagem com grupos tióis presentes em proteínas localizadas extracelularmente e vitais à actividade das mesmas. Além disso, é bem conhecido que as quinonas-tioéteres inibem várias enzimas que utilizam a GSH como substrato ou co-substrato, incluindo a γ-GT (Monks and Lau, 1998), o que contribui para o aumento dos níveis extracelulares destes

metabolitos nefrotóxicos da MDMA. Até ao momento não se conhece qualquer mecanismo que permita a passagem do conjugado catecol-GSH através da membrana apical da PTC, o que levanta a hipótese de que a toxicidade induzida por metabolitos tioéter da MDMA a nível da membrana apical seja o resultado de mecanismos extracelulares, presumivelmente associados à formação de ciclos redox e consequente indução de stresse oxidativo. Serão, então, necessários outros estudos para delinear os mecanismos extracelulares pelos quais estes compostos exercem toxicidade nas células renais.

A importância do stresse oxidativo na toxicidade induzida pela MDMA

A importância do stresse oxidativo na neurotoxicidade induzida pela MDMA está amplamente referenciada na literatura (Colado and Green, 1995; Sprague and Nichols, 1995; Colado *et al.*, 1997b; Jayanthi *et al.*, 1999; Shankaran *et al.*, 1999a). Foi demonstrado que a MDMA reduz os níveis de antioxidantes (ácido ascórbico e vitamina E) e a actividade de enzimas antioxidantes (catalase e GPX) a nível cerebral e que a administração, a ratos, de cisteína e ácido ascórbico atenua a neurotoxicidade induzida pela MDMA (Gudelsky, 1996; Jayanthi *et al.*, 1999; Shankaran *et al.*, 2001). A diminuição da actividade da catalase e da GPX foi também observada no fígado de ratinhos tratados com MDMA quando colocados a uma temperatura ambiente de 30°C (Carvalho *et al.*, 2002). Recentemente, Zhou e colaboradores (2003) observaram que indivíduos consumidores de MDMA apresentam níveis mais elevados de peróxidos lipídicos nos eritrócitos, enquanto que os níveis de ácido ascórbico, vitamina E e β-caroteno no plasma, bem como a actividade da superóxido dismutase e catalase nos eritrócitos, encontram-se diminuídos. Estes resultados sugerem que o consumo de MDMA pode induzir stresse oxidativo e causar potenciais danos oxidativos no organismo de consumidores desta droga de abuso.

Tem sido proposto que o stresse oxidativo induzido pela MDMA resulta da formação de ROS durante a oxidação das aminas biogénicas libertadas pela MDMA e/ou durante o metabolismo da MDMA. O metabolismo oxidativo das aminas biogénicas pela MAO leva à formação de H_2O_2 como um dos produtos da reacção (Sinet *et al.*, 1980; Hrometz *et al.*, 2004), o qual pode contribuir para o stresse oxidativo. A corroborar a importância desta via na toxicidade da MDMA, foi demonstrado que a inibição da MAO-B diminui a neurotoxicidade da MDMA *in vivo* em ratos e em macacos (Sprague and Nichols, 1995). Carvalho e colaboradores (2001) verificaram que a produção de H_2O_2 no fígado, rim e coração de ratinhos após a administração de *d*-anfetamina pode ser atenuada pelo pré-

tratamento dos animais com um inibidor da MAO. É importante referir que embora as catecolaminas possam sofrer O-metilação pela COMT, os produtos deste metabolismo continuam a ser substractos da MAO. Quando as enzimas que participam no metabolismo destas aminas ficam saturadas, pode ocorrer a sua auto-oxidação com formação de quinonas e semiquinonas altamente reactivas, que podem entrar num ciclo redox com formação de ROS e RNS e que contribuem para a indução do stresse oxidativo (Bolton *et al.*, 2000). Paralelamente, como já tem vindo a ser referido, a danificação oxidativa induzida pela MDMA pode resultar da formação de catecóis e quinonas por oxidação da própria molécula de MDMA.

Nos estudos realizados em suspensões de hepatócitos isolados verificou-se que a MDMA e a MDA induzem stresse oxidativo que é caracterizado por uma diminuição da razão GSH/GSSG (Trabalhos I, II e III). Atendendo ao papel crucial da GSH na metabolização do H_2O_2 e outros hidroperóxidos como cofactor da GPX, na metabolização de xenobióticos como cofactor da GST e na desactivação de radicais (Sciuto, 1997), a sua depleção assume, do ponto de vista toxicológico, particular relevância podendo constituir uma etapa crucial para a acção tóxica da MDMA. Nestes estudos verificou-se que a viabilidade celular, peroxidação lipídica e a actividade das enzimas antioxidantes GPX, GR e GST não eram afectados pela MDMA (Trabalhos I e III) ou MDA (Trabalho II), o que poderá significar que a concentração de GSH intracelular foi suficiente para proteger as células contra a toxicidade induzida por estes compostos. No entanto, após a redução drástica dos níveis de GSH observada em hepatócitos e cardiomiócitos incubados com a N-Me-α-MeDA (nas concentrações de 0,8 mM e 1,6 mM) ou a α-MeDA (na concentração de 1,6 mM), os níveis de GSH foram insuficientes para prevenir a inibição da actividade das enzimas GPX, GR e GST e a morte celular induzida por estes compostos (ver Trabalhos II, III e V). Estes resultados parecem estar de acordo com estudos prévios realizados *in vivo* e *in vitro* (Reed, 1990a; Tirmenstein *et al.*, 2000) nos quais a citotoxicidade, caracterizada por peroxidação lipídica, libertação de enzimas intracelulares e necrose celular, só foi observada quando a concentração intracelular de GSH era inferior a 10-15% do seu valor inicial (valor que corresponde à fracção da GSH mitocondrial). No estudo realizado em cardiomiócitos, os efeitos tóxicos dos metabolitos desmetilenados da MDMA foram observados após períodos de incubação curtos relativamente ao observado para os hepatócitos. Uma explicação possível para este facto poderá ser o nível mais baixo de GSH encontrado nas suspensões de cardiomiócitos- aproximadamente 20 nmol/mL (ver Trabalho

V) - quando comparados com as suspensões de hepatócitos- aproximadamente 50 nmol/mL (ver Trabalho II). Desta forma, a GSH nos cardiomiócitos esgota-se mais rapidamente, ficando as quinonas e outros produtos de oxidação livres para iniciar uma série de alterações na funcionalidade normal das células.

As quinonas (formadas durante o metabolismo oxidativo da MDMA e/ou das aminas biogénicas) podem também ser oxidadas, num processo que envolve a ciclização 1,4-intramolecular irreversível da molécula, levando à formação de aminocromos (pigmentos corados). Os aminocromos, tal como as quinonas, são compostos altamente reactivos (com propriedades electrofílicas) que reagem rapidamente com nucleófilos intracelulares, tais como a GSH (causando a sua depleção), cisteína, proteínas e enzimas com grupos sulfidrilo vitais à actividade das mesmas (Bolton *et al.*, 2000). Foi já demonstrado que estes compostos são capazes de inibir a actividade de várias enzimas (Ommen *et al.*, 1991; Ploemen *et al.*, 1991; Monks and Lau, 1992; Iio *et al.*, 1993; Remião *et al.*, 1999 e 2002). Nos trabalhos agora realizados em hepatócitos e cardiomiócitos, verificou-se que a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA inibem a actividade das enzimas GR, GPX e GST, sendo este efeito mais expressivo para o metabolito N-Me-α-MeDA (Trabalhos II, III e V). Estes resultados estão em concordância com a conhecida capacidade das quinonas e aminocromos de oxidarem ou alquilarem grupos sulfidrilo presentes nos locais activos das enzimas (Bindoli *et al.*, 1992; Dhalla *et al.*, 2001). A identificação e caracterização do α-metildopaminocromo e do N-metil-α-metildopaminocromo em cardiomiócitos incubados com a α-MeDA e a N-Me-α-MeDA, respectivamente (Trabalho V), vem corroborar a importância destas espécies na expressão da toxicidade destes compostos. A sua presença nas células pode advir da sua captação a partir do meio extracelular ou, então, da oxidação intracelular dos catecóis. Neste estudo, foram observados níveis mais elevados de aminocromo após incubação com a N-Me-α-MeDA relativamente à incubação com a α-MeDA, o que se correlaciona com as diferenças observadas na potência destes metabolitos para produzir efeitos tóxicos.

Os aminocromos podem também sofrer rearranjos intramoleculares originando compostos, tais como o 5,6-diidroxiindole, que podem polimerizar levando ao aparecimento de pigmentos escuros insolúveis, de composição ainda não totalmente esclarecida, que são denominados de melaninas (Bindoli *et al.*, 1989 e 1992). A formação de melaninas foi observada em todos os modelos *in vitro* usados nesta dissertação após incubação com os metabolitos desmetilenados da MDMA. As melaninas representam um

grande grupo de substâncias quimicamente activas e potencialmente tóxicas (Hegedus, 2000), pelo que a sua toxicidade ao nível dos órgãos estudados deverá ser investigada em trabalhos futuros.

É de realçar o facto de praticamente não existir catalase a nível mitocondrial e, por isso, a GPX exercer aí um papel fundamental na metabolização do H_2O_2 (Halliwell and Gutteridge, 1999). Assim, a depleção de GSH e/ou a diminuição da actividade das enzimas antioxidantes pode comprometer esta via, permitindo a acumulação de níveis tóxicos de ROS e RNS. A inibição destas enzimas pode assim contribuir para aumentar o stresse oxidativo resultante da oxidação dos metabolitos da MDMA e/ou das aminas biogénicas libertadas por acção da MDMA.

As quinonas e os aminocromos podem igualmente exercer os seus efeitos tóxicos ao nível da membrana, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo. Um dos efeitos que pode ocorrer é o desacoplamento mitocondrial, com consequente depleção energética e inibição dos mecanismos de controlo do Ca^{2+} intracelular, que induz um fenómeno de sobrecarga de Ca^{2+} (Taam *et al.*, 1986; Bindoli *et al.*, 1992). No estudo realizado em cardiomiócitos isolados de rato (Trabalho V) verificou-se que a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA provocam a hipercontractura das células (perda da morfologia em bastonete característica dos miócitos funcionais). Alguns mecanismos poderão ser responsáveis pela hipercontractura dos cardiomiócitos, nomeadamente o observado aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+}, bem como a depleção de GSH ou de ATP (ver Trabalho V). A contracção das células ocorreu sem perda da integridade do sarcolema, o que indica que a contracção celular não é secundária à perda massiva de ATP e entrada de Ca^{2+} resultante da perda de barreira sarcoplasmática. Assim, a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular resulta muito provavelmente da libertação deste ião dos locais de armazenamento intracelulares. A perda da homeostasia da GSH pode levar à oxidação dos grupos sulfidrilo das proteínas associadas às membranas na mitocôndria e/ou retículo sarcoplasmático e resultar na perda da homeostasia iónica, especialmente do Ca^{2+} (Reed, 1990b). Foi há bastante tempo demonstrado que as quinonas induzem a perda da homeostasia do Ca^{2+} pela libertação deste ião a partir da mitocôndria e retículo endoplasmático e inibição do efluxo de Ca^{2+} da célula (Orrenius *et al.*, 1989). Além disso, os aminocromos inibem a actividade das bombas de Ca^{2+} e de Na^+/K^+ no sarcolema e do sistema uniporte de Ca^{2+} mitocondrial (Bindoli *et al.*, 1992; Dhalla *et al.*, 1996; Tappia *et al.*, 2001), o que leva a um aumento do Ca^{2+} livre intracelular. A sobrecarga de Ca^{2+} poderá ser altamente tóxica para a célula, na medida em

que induz: i) a diminuição dos níveis energéticos por inactivação da fosforilação mitocondrial e por activação excessiva das bombas de Ca^{2+}, ii) a alteração do citoesqueleto por dissociação dos filamentos de actina ou quebras proteolíticas (levando à formação de vesículas na membrana), iii) a activação exacerbada das fosfatases, fosfolipases, proteases e endonucleases e iv) a produção de ROS (Orrenius *et al.*, 1989). A regulação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} é essencial para o funcionamento normal do miocárdio e as alterações na homeostasia deste ião poderão explicar as arritmias que têm sido associadas ao consumo de "ecstasy".

A contractura dos cardiomiócitos expostos à N-Me-α-MeDA ou α-MeDA pode também estar relacionada com a observada diminuição dos níveis intracelulares de ATP (ver Trabalho V). Foi já demonstrado que os aminocromos, e outras espécies oxidadas que derivam destes, têm a capacidade de inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial com reflexo no declínio da razão ATP/AMP e desta forma afectar os processos energéticos das células e contribuir para o stresse oxidativo (Taam *et al.*, 1986; Bindoli *et al.*, 1992). No entanto, não são conhecidos ainda os efeitos directos destes metabolitos nos processos bioenergéticos mitocondriais. Os estudos realizados recentemente em mitocôndrias isoladas de fígado (Rusyniak *et al.*, 2004) ou de coração de rato (Gonçalves *et al.*, 2004) demonstraram que a presença de concentrações elevadas de MDMA (na ordem de 5 mM) inibe a permeabilidade transitória mitocondrial, sem afectar o sistema uniporte de Ca^{2+} mitocondrial, com consequente perda dos mecanismos de regulação do Ca^{2+} e desacoplamento mitocondrial. No estudo agora realizado em cardiomiócitos isolados de rato (Traballho V), verificou-se que a MDMA não teve qualquer efeito nos níveis energéticos das células, o que poderá ser explicado pelo facto das concentrações testadas (0,1 a 1,6 mM) serem inferiores às usadas nos referidos estudos em mitocôndrias.

Tendo em consideração as evidências do stresse oxidativo induzido pela MDMA e seus metabolitos é de esperar que os antioxidantes contrariem os efeitos deletérios não só de espécies reactivas de oxigénio e azoto mas igualmente de quinonas, aminocromos e outros produtos de oxidação das catecolaminas. A eficácia dos antioxidantes no tratamento de lesões hepáticas associadas ao consumo de "ecstasy" não foi ainda investigada, embora a administração intravenosa de N-acetilcisteína seja tida como um procedimento clínico de rotina no tratamento da falência hepática aguda e outras disfunções hepáticas (Greene *et al.*, 2003). No estudo realizado em hepatócitos isolados de rato (Trabalho III) verificou-se que a adição dos antioxidantes ácido ascórbico (0,5 mM) e N-acetilcisteína (1 mM) confere

protecção contra a depleção de GSH e perda de viabilidade celular induzida pela N-Me-α-MeDA nas condições adoptadas nos ensaios. Este resultado poderá estar relacionado com a capacidade destes antioxidantes em manter o grupo catecol na forma reduzida e/ou para sequestrar ROS e RNS formadas no processo de oxidação da N-Me-α-MeDA, o que vem corroborar a importância do stresse oxidativo na toxicidade induzida por este metabolito da MDMA. Os resultados promissores obtidos *in vitro* deverão encorajar estudos futuros delineados no sentido de avaliar o potencial terapêutico de antioxidantes *in vivo*, nomeadamente na prevenção e/ou tratamento de lesões resultantes do consumo desta droga.

Por fim, é de realçar que numa situação *in vivo* vários factores poderão agravar o stresse oxidativo induzido pela MDMA, tais como a hipertermia (já referida neste capítulo) e a anorexia. É bem conhecido que a anorexia é uma consequência do consumo repetido de MDMA (Vollenweider *et al.*, 1998; Parrott *et al.*, 2000) e poderá ter um significado toxicológico importante visto diminuir a ingestão de ácido ascórbico, cisteína, vitamina E, β-caroteno e outros antioxidantes obtidos apenas da dieta, acelerando os danos induzidos por radicais livres e a ocorrência de stresse oxidativo. A cisteína é essencial para a síntese de GSH (aminoácido limitante da sua síntese) (Meister, 1989) e foi demonstrado que animais mantidos em jejum durante 24 horas apresentam uma diminuição do conteúdo hepático em cisteína numa extensão de 30% e que esta depleção está directamente associada à diminuição do conteúdo hepático em GSH (Tateishi *et al.*, 1977). Assim, a ingestão deficitária de alimentos e consequente diminuição dos níveis de GSH e outros antioxidantes pode tornar as células mais vulneráveis aos efeitos tóxicos da MDMA.

Conclusões finais

Em síntese, os resultados obtidos nos estudos apresentados nesta dissertação sugerem que o metabolismo da MDMA, resultando na formação de metabolitos altamente reactivos, como a N-Me-α-MeDA e a α-MeDA, é um factor crucial para a expressão dos danos celulares induzidos por esta droga de abuso no fígado, rim e coração, pelo menos, *in vitro*. Apesar dos diferentes mecanismos envolvidos, o efeito bioquímico inicial - depleção de GSH - é comum nas células do fígado e coração, o que poderá constituir um passo inicial para a acção tóxica da MDMA nestes órgãos. A perda da homeostasia da GSH pode levar à perda das funções proteicas e ao início de uma cascata de eventos que resultam em efeitos deletérios e posterior morte celular. A falência dos mecanismos de defesa celular (depleção de GSH e inibição das enzimas antioxidantes) torna as células mais expostas ao stresse

oxidativo induzido, por exemplo, durante a hipertermia. Uma vez que a hipertermia e o metabolismo da MDMA ocorrem *in vivo*, parece razoável assumir que estes factores são potencialmente letais e que, muito certamente, contribuem para a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade que têm sido descritas em consumidores de "ecstasy".

14. REFERÊNCIAS

Aguirre N, Barrionuevo M, Lasheras B, and Río JD. (1998). The role of dopaminergic systems in the perinatal sensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1159-1165.

Allen RP, McCann UD, and Ricaurte GA. (1993). Persistent effects of (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on human sleep. *Sleep* 16: 560-564.

Ando M, Katagiri K, Yamamoto S, Asanuma S, Usuda M, Kawahara I, and Wakamatsu K. (1994). Effect of hyperthermia on glutathione peroxidase and lipid peroxidative damage in liver. *J Therm Biol* 19: 177-185.

Andreu V, Mas A, Bruguera M, Salmerón JM, Moreno V, Nogué S, and Rodés J. (1998). Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. *J Hepatol* 29: 394-397.

Anthony ML, Beddell CR, Lindon JC, and Nicholson JK. (1993). Studies on the effects of L(alpha S,5S)-alpha-amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT-125) on 4-aminophenol-induced nephrotoxicity in the Fischer 344 rat. *Arch Toxicol* 67: 696-705.

Arriagada C, Dagnino-Subiabre A, Caviedes P, Armero JM, 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.

Auer J, Berent R, Weber T, Lassnig E, and Eber B. (2002). Subarachnoid haemorrhage with "ecstasy" abuse in a young adult. *Neurol Sci* 23: 199-201.

Axt KJ, Mamounas LA, and Molliver ME. (1994). Strutural features of amphetamine neurotoxicity in the brain, pp. 315-367. *In* Cho AK and Segal DS [eds.], Amphetamine and its analogs. Academic Press, San Diego.

Badon LA, Hicks A, Lord K, Ogden BA, Meleg-Smith S, and Varner KJ. (2002). Changes in cardiovascular responsiveness and cardiotoxicity elicited during binge administration of ecstasy. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 898-907.

Baez S, and Segura-Aguilar J. (1994). Formation of reactive oxygen species during one-electron reduction of noradrenochrome catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Redox Report* 1: 65-70.

Bai F, Lau SS, and Monks TJ. (1999). Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of α-methyldopamine produce serotoninergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 12: 1150-1157.

Bai F, Jones DC, Lau SS, and Monks TJ. (2001). Serotonergic neurotoxicity of 3,4-(+/-)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(+/-)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) is potentiated by inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase. *Chem Res Toxicol* 14: 863-870.

Balkovetz DF, Tiruppathi C, Leibach FH, Mahesh VB, and Ganapathy V. (1989). Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* 264: 2195-2198.

Balmelli C, Kupferschmidt H, Rentsch K, and Schneemann M. (2001). Fatal brain oedema after ingestion of ecstasy and benzylpiperazine. *Dtsch Med Wochenschr* 126: 809-811.

Barish P, and Tintinalli J. (1990). Designer drugs, pp. 770-771. *In* Haddad LM and Winchester JF [eds.], Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose, 2nd ed. WB Saunders Company, Philadelphia.

Barrett PJ, and Taylor GT. (1993). "Ecstasy" ingestion: a case report of severe complications. *J R Soc Med* 86: 233-234.

Battaglia G, Yeh SY, O'Hearn E, Molliver ME, Kuhar MJ, and De Sousa EB. (1987). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [^{3}H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites. *J Pharmacol Exp Ther* 242: 911-916.

Battaglia G, Brooks BP, Kulsakdinum C, and De Sousa EB. (1988a). Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur J Pharmacol* 149: 159-163.

Battaglia G, Yeh SY, and De Sousa EB. (1988b). MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 29: 269-274.

Battaglia G, Fornai F, Busceti CL, Aloisi G, Cerrito F, De Blasi A, Melchiorri D, and Nicoletti F. (2002). Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective against methamphetamine neurotoxicity. *J Neurosci* 22: 2135-2141.

Baudot P, Dayre S, Laval R, Viriot M-L, and Carre M-C. (1998). «Ecstasy» (3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA) et dérivés. *Ann Fals Exp Chim* 942: 81-100.

Behan WMH, Madigan M, Clark BJ, Goldberg J, and McLellan DR. (2000). Muscle changes in the neuroleptic malignant syndrome. *J Clin Pathol* 53: 223-227.

Behonick GS, Novak MJ, Nealley EW, and Baskin SI. (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.

Benazzi F, and Mazzoli M. (1991). Psychiatric illness associated with "ecstasy". *Lancet* 338: 1520.

Bengel D, Murphy DL, and Lesch KP. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* 53: 649-655.

Benjamin IJ, and McMillan DR. (1998). Stress (heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83: 117-132.

Better OS, and Stein JH. (1990). Early management of schock and prophylaxis of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 322: 825-829.

Bindoli A, Rigobello MP, and Galzigna L. (1989). Toxicity of aminochromes. *Toxicol Lett* 48: 3-20.

Bindoli A, Rigobello MP, and Galzigna L. (1990). Reduction of adrenochrome by rat liver and brain DT-diaphorase. *Free Radic Res Commun* 8: 295-298.

Bindoli A, Rigobello MP, and Deeble DJ. (1992). Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med* 13: 391-405.

Bingham C, Beaman M, Nicholls A, and Anthony P. (1998). Necrotizing renal vasculopathy resulting in chronic renal failure after ingestion of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). *Nephrol Dial Transplant* 13: 2654-5.

Black PH. (1994a). Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1-6.

Black PH. (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 WW, Seaman B, Pedersen NP, and Ootsuka Y. (2003). Clozapine reverses hyperthermia and sympathetically mediated cutaneous vasoconstrition induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in rabbits and rats. *J Neurosci* 23: 6385-6391.

Bolla KI, McCann U, and Ricaurte GA. (1998). Memory impairment in abstinent MDMA ("ecstasy") users. *Neurology* 51: 1532-1537.

Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, and Monks TJ. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13: 135-160.

Boyd CJ, McCabe SE, and d'Arcy H. (2003). Ecstasy use among college undergraduates: gender, race and sexual identity. *J Subst Abuse Treat* 24: 209-215.

Brauer RB, Heidecke CD, Nathrath W, Beckurts KTE, Vorwald P, Zilker TR, Schweigart U, Holscher AH, and Siewert JR. (1997). Liver transplantation for the treatment of fulminant hepatic failure induced by the ingestion of ecstasy. *Transpl Int* 10: 229-233.

Brodkin J, Malyala A, and Nash JF. (1993). Effect of acute monomine 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 HW, Bowyer JF, and Slikker W. (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 HW, Morford LL, Inman-Wood SL, Fukumura M, and Vorhees CV. (2001). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced learning and memory impairments depend on the age of exposure during early development. *J Neurosci* 21: 3228-3235.

Bronson ME, Barrios-Zambrano L, Jiang W, Clark CR, DeRuiter J, and Newland MC. (1994a). Behavioral and developmental effects of two 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) derivatives. *Drug Alcohol Depend* 36: 161-166.

Bronson ME, Jiang W, Clark CR, and DeRuiter J. (1994b). Effects of designer drugs on the chicken embryo and 1-day-old chicken. *Brain Res Bull* 34: 143-150.

Brown C, and Osterloh J. (1987). Multiple severe complications from recreational ingestion of MDMA ("ecstasy"). *JAMA* 258: 780-781.

Brownfield MS, Greathouse J, Lorens SA, Armstrong J, Urban JH, and Van der Kar LD. (1988). Neuropharmacological characterization of serotoninergic stimulation of vasopressin secretion in conscious rats. *Neuroendocrinology* 47: 277-283.

Budaravi S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, and Kinneary JF. (1996). The Merck Index. Merck & Co., Rahway, USA.

Budisavljevic MN, Stewart L, Sahn SA, and Ploth DW. (2003). Hyponatremia associated with 3,4-methylenedioxymethylamphetamine ("ecstasy") abuse. *Am J Med Sci* 326: 89-93.

Budziszewska B, Jaworska-Feil L, and Lasón W. (1996). The effect of repeated amphetamine and cocaine administration on adrenal, gonadal and thyroid hormone levels in the rat plasma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104: 334-338.

Burgess C, O'Donohoe A, and Gill M. (2000). Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity. *Eur Psychiatry* 5: 287-294.

Burnat P, Le Brumant-Payen C, Huart B, Ceppa F, and Pailler FM. (1996). L'ecstasy: psychostimulant, hallucinogène et toxique. *Presse Med* 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 JL, 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 JL, Ladenheim B, Hirata H, Rothman RB, Ali S, Carlson E, Epstein C, and Moran TH. (1995). Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA): evidence from using Cu-Zn superoxide dismutase transgenic mice. *Synapse* 21: 169-176.

Cadet JL, and Brannock C. (1998). Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* 32: 117-131.

Cadet JL, Thiriet N, and Jayanthi S. (2001). Involvement of free radicals in MDMA-induced neurotoxicity in mice. *Ann Med Interne* 152: IS57-59.

Cahill DW, Knipp H, and Mosser J. (1981). Intracranial hemorrhage with amphetamine abuse. *Neurology* 31: 1058-1059.

Callaway CW, Rempel N, Peng RY, and Geyer MA. (1992). Serotonin 5-HT_1-like receptors mediate hyperactivity in rats induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neuropsychopharmacology* 7: 113-127.

Cami J, De la Torre R, and Ortuno J. (1997). Pharmacokinetics of ecstasy (MDMA) in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 52 (suppl): A168.

Carvalho F. (1998). Estudo da hepatotoxicidade da *d*-anfetamina. Ensaios *in vivo* e *in vitro* (Tese de Doutoramento). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto.

Carvalho F, Remião F, Soares ME, Catarino R, Queiroz G, and Bastos ML. (1997). *d*-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 71: 429-436.

Carvalho F, Duarte JA, Neuparth MJ, Carmo H, Fernandes E, Remião F, and Bastos ML. (2001). Hydrogen peroxide production in mouse tissues after acute *d*-amphetamine administration. Influence of monoamine oxidase inhibition. *Arch Toxicol* 75: 465-469.

Carvalho M. (2000). Estudo da hepatotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina (ecstasy). Ensaios *in vivo* e *in vitro* (Tese de Mestrado). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto.

Carvalho M, Carvalho F, Remião F, Pereira ML, Pires-das-Neves R, and Bastos ML. (2002). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch Toxicol* 76: 166-172.

Cascorbi I. (2003). Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Investigation* 33: 17-22.

Chadwick IS, Curry PD, Linsley A, Freemont AJ, and Doran B. (1991). Ecstasy, 3,4 methylenedioxymethamphetamine (MDMA), a fatality associated with coagulopathy and hyperthermia. *J R Soc Med* 84: 371.

Chavdarian CG, Karashima D, Castagnoli NJ, and Hundley HK. (1978). Oxidative and cardiovascular studies on natural and synthetic catecholamines. *J Med Chem* 21: 548-554.

Che S, Johnson M, Hanson GR, and Gibb JW. (1995). Body temperature effect on methylenedioxymethamphetamine-induced acute decrease in tryptophan hydroxylase activity. *Eur J Pharmacol* 293: 447-453.

Chenard-Neu MP, Boudjema K, Bernuau J, Degott C, Belghiti J, and Cherqui D. (1996). Auxiliary liver transplantation: regeneration of the mative liver and outcome in 30 patients with fulminant hepatic failure - a multicenter european study. *Hepatology* 23: 1119-1127.

Christophersen A. (2000). Amphetamine designer drugs - an overview and epidemiology. *Toxicol Lett* 15: 127-131.

Chu T, Kumagai Y, DiStefano EW, and Cho AK. (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.

Citron BP, Halpern M, McCarron M, Lundberg GD, McCormick R, Pincus IJ, Tatter D, and Haverback BJ. (1970). Necrotizing angiitis associated with drug abuse. *New Eng J Med* 283: 1003-1011.

Cohen RS. (1996). Adverse symptomatology and suicide associated with the use of methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy"). *Biol Psychiatry* 39: 819-820.

Colado MI, Murray TK, and Green AR. (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 MI, and Green AR. (1995). The spin trap reagent α-phenyl-N-tert-butyl nitrone prevents "ecstasy"-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur J Pharmacol* 280: 343-346.

Colado MI, Williams JL, and 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.

Colado MI, O´Shea E, Granados R, Misra A, Murray TK, and Green AR. (1997a). A study of the neurotoxic effect of MDMA ("ecstasy") on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. *Br J Pharmacol* 108: 583-589.

Colado MI, O´Shea E, Granados R, Murray TK, and Green AR. (1997b). *In vivo* evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ("ecstasy") and *p*-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br J Pharmacol* 121: 889-900.

Colado MI, Granados R, O'Shea E, Esteban B, and Green AR. (1998). Role of hyperthermia in the protective action of clomethiazole against MDMA ("ecstasy")-induced neurodegeneration, comparison with novel NMDA channel blocker AR-R15896AR. *Br J Pharmacol* 124: 479-484.

Colado MI, Esteban B, O'Shea E, Granados R, and Green AR. (1999a). Studies on the neuroprotective effect of pentobarbitone on MDMA-induced neurodegeneration. *Psychopharmacology* 142: 421-425.

Colado MI, O'Shea E, Esteban B, Granados R, and Green AR. (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 MI, O'Shea E, Granados R, Esteban B, Martín AB, and Green AR. (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; ecstasy) administration. *Br J Pharmacol* 126: 911-924.

Commins DL, Axt KJ, Vosmer G, and Seiden LS. (1987a). 5,6-Dihydroxytryptamine, a serotonergic neurotoxin, is formed endogenously in the rat brain. *Brain Res* 403: 7-14.

Commins DL, Vosmer G, Virus RM, Woolverton WL, Schuster CR, and Seiden LS. (1987b). Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 241: 338-345.

Connor TJ, McNamara MG, Finn D, Currid A, O'Malley M, Redmond AM, Kelly JP, and Leonard BE. (1998). Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. *Immunopharmacology* 38: 253-260.

Connor TJ, McNamara MG, Kelly JP, and Leonard BE. (1999). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) administration produces dose-dependent neurochemical, endocrine and immune changes in the rat. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 14: 95-104.

Connor TJ. (2004). Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"): a stressor on the immune system. *Immunology* 111: 357-367.

Coore JR. (1996). A fatal trip with ecstasy: a case of 3,4-methylenedioxymethamphetamine/ 3,4-methylenedioxyamphetamine toxicity. *J R Soc Med* 89: 51-52.

Cottler LB, Womack SB, Compton WM, and Ben-Abdallah A. (2001). Ecstasy abuse and dependence among adolescents and young adults: applicability and reliability of DSM-IV criteria. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 16: 599-606.

Creighton FJ, Black DL, and Hyde CE. (1991). "Ecstasy" psychosis and flashbacks. *J Psychiatry* 159: 713-715.

Crino PB, Vogt BA, Chen JC, 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 RI. (1995). Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consuption and chronic dosing. *Physiol Behav* 58: 877-882.

Dafters RI, 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.

Dal Cason TA. (1990). An evaluation of the potential for clandestine manufacture of 3,4-methlylenedioxyamphetamine (MDA) analogs and homologs. *JFSCA* 35: 675-697.

Dar KJ, and McBrien ME. (1996). MDMA induced hyperthermia: report of a fatality and review of current therapy. *Intensive Care Med* 22: 995-996.

Darvesh AS, Shankaran M, and Gudelsky GA. (2002). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine produces glycogenolysis and increases the extracellular concentration of glucose in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 138-144.

Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, and Snyder SH. (1993). Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13: 2651-2661.

Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, and Dawson TM. (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 16: 2479-2487.

Delaforge M, Jaouen M, and Bouille G. (1999). Inhibitory metabolite complex formation of methylenedioxymethamphetamine with rat and human cytochrome P450. Particular involvement of CYP2D. *Environ Toxicol Pharmacol* 7: 153-158.

De la Fuente L, Arenas MAR, Orta JV, Paya JS, and Anta GB. (1997). Epidemiologia del consumo de drogas de deseno en Espana. *Med Clin (Barc)* 108: 54-61.

Delaney P, and Estes M. (1980). Intracranial hemorrhage with amphetamine abuse. *Neurology* 30: 1125-1128.

Del Arco A, González-Mora JL, Armas VR, and Mora F. (1999). Amphetamine increases the extracellular concentration of glutamate in striatum of the awake rat: involvement of high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacology* 38: 943-954.

De la Torre R, Farre M, Ortuno J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, 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 PN, Lopez CH, 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.

Delcarpio JB, Moerschbaecher JM, and Varner KY. (1998). Electron microscopic evaluation of the cardiac toxicity elicited by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *NIDA Res Monogr* 179: 111.

De Letter EA, Bouche MP, Bocxlaerc JFV, Lambertd WE, and Piettea MHA. (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.

DeLeve LD, and Kaplowitz N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52: 287-305.

Denborough MA, and Hopkinson KC. (1997). Dantrolene and "ecstasy". *Med J Aust* 166: 165-166.

Dhalla KS, Rupp H, Beamish RE, and Dhalla NS. (1996). Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca^{2+} transport due to excess catecholamines. *Cardiovasc Drugs Ther* 10: 231-238.

Dhalla NS, Yates JC, Naimark B, Dhalla KS, Beamish RE, and Ostadal B. (1992). Cardiotoxicity of catecholamines and related agents, pp. 239-282. *In* Acosta D [ed.], Cardiovascular Toxicology, 2nd ed. Raven Press, New York.

Dhalla NS, Sasaki H, Mochizuki S, Dhalla KS, Liu X, and Elimban V. (2001). Catecholamine-induced cardiomyopathy, pp. 269-318. *In* Acosta D [ed.], Cardiovascular Toxicity, 3 ed. Raven Press, New York.

Di Mascio P, Murphy ME, and Sies H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 53: 194S-200S.

Dowling GP, McDonough ET, and Bost RO. (1987). "Eve" and "Ecstasy": a report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA. *JAMA* 257: 1615-1617.

Downing SE, and Chen V. (1985). Myocardial injury following endogenous catecholamine release in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 17: 377-387.

Duarte JA, Carvalho F, Fernandes E, Remião F, Bastos ML, Magalhães J, and Appell HJ. (2004). D-amphetamine-induced hydrogen peroxide production in skeletal muscle is modulated by monoamine oxidase inhibition. *Int J Sports Med* 25: 1-4.

Dykhuizen RS, Brunt PW, Atkinson P, Simpson JG, and Smith CC. (1995). Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. *Gut* 36: 939-941.

Easton N, Fry J, O'Shea E, Watkins A, Kingston S, and Marsden CA. (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.

Elayan I, Gibb JW, Hanson GR, Foltz RL, Lim HK, and Johnson M. (1992). Long-term alteration in the central monoaminergic systems of the rat by 2,4,5-trihydroxyamphetamine, but not by 2-hydroxy-4,5-methylenedioxymethamphetamine or 2-hydroxy-4,5-methylenedioxyamphetamine. *Eur J Pharmacol* 221: 281.

Ellis A, Wendon J, Portmann B, and Williams R. (1996). Acute liver damage and ecstasy ingestion. *Gut* 38: 454-458.

Ellis SJ. (1995). Severe hyponatraemia: complications and treatment. *QJM* 88: 905-909.

Ensslin HK, Maurer HH, Gouzoulis E, Hermle L, and Kovar KA. (1996). Metabolism of racemic 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in humans. *Drug Metabol Dispos* 24: 813-820.

Eriksson M, Jonsson B, Steneroth G, and Zetterström R. (1994). Cross-sectional growth of children whose mothers abused amphetamines during pregnancy. *Acta Paediatr* 83: 612-617.

Fahal IH, Sallomi DF, Yaqoob M, and Bell GM. (1992). Acute renal failure after ecstasy. *BMJ* 305: 29.

Fallon JK, Kicman AT, Henry JA, Milligan PJ, Cowan DA, and Hutt AJ. (1999). Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in humans. *Clin Chem* 45: 1058-1069.

Fallon JK, Shah D, Kicman AT, Hutt AJ, Henry JA, Cowan DA, and Forsling M. (2002). Action of MDMA (ecstasy) and its metabolites on arginine vasopressin release. *Ann N Y Acad Sci* 965: 399-409.

Faraj BA, Olkowski ZL, and Jackson RT. (1994). Active [3H]-dopamine uptake by human lymphocytes: correlates with serotonin transporter activity. *Pharmacology* 48: 320-327.

Farfel GM, Vosmer GL, and Seiden LS. (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.

Farfel GM, and Seiden LS. (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.

Farré M, De la Torre R, Mathúna BÓ, Roset PN, Peiró AM, Torrens M, Ortuño J, Pujadas M, and Camí J. (2004). Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology* 173: 364-375.

Fidler H, Dhillon A, Gertner D, and Burroughs A. (1996). Chronic ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) abuse: a recurrent and unpredictable cause of severe acute hepatitis. *J Hepatol* 25: 563-566.

Filep J, and Rosenkranz B. (1987). Mechanism of vasopressin-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 45: 7-15.

Fineschi V, and Masti A. (1996). Fatal poisoning by MDMA (ecstasy) and MDEA: a case report. *Int J Legal Med* 108: 272-275.

Fineschi V, Centini F, Mazzeo E, and Turillazzi E. (1999). Adam (MDMA) and Eve (MDA) misuse: an immunohistochemical study on three fatal cases. *Forensic Sci Int* 104: 65-74.

Fitzgerald JL, and Reid JJ. (1990). Effects of methylenedioxymethamphetamine on the release of monoamines from rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 191: 217-220.

Fitzgerald JL, and Reid JJ. (1994). Sympathomimetic actions of methylenedioxymethamphetamine in rat and rabbit isolated cardiovascular tissues. *J Pharm Pharmacol* 46: 826-832.

Flanagan SW, Moseley PL, and Buettner GR. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.* 431: 285-286.

Foley RJ, Kapatkin K, Verani R, and Weinman EJ. (1984). Amphetamine-induced acute renal failure. *South Med J* 77: 258-260.

Foppoli C, Coccia R, Cini C, and Rosei MA. (1997). Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1334: 200-206.

Forrest ARW, Galloway JH, Marsh ID, Strachan GA, and Clark JC. (1994). A fatal overdose with 3,4-methylenedioxyamphetamine derivatives. *Forensic Sci Int* 64: 57-59.

Forsling M, Fallon JK, Kicman AT, Hutt AJ, Cowan DA, and Henry JA. (2001). Arginine vasopressin release in response to the administration of 3,4-methylenedioxyethamphetamine ("ecstasy"): is metabolism a contributory factor? *J Pharm Pharmacol* 53: 1357-1363.

Forsling ML, Fallon JK, Shah D, Tilbrook GS, Cowan DA, Kicman AT, and Hutt AJ. (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.

Frederick DL, Ali SF, Slikker W, Gillam MP, Allen RR, and Paule MG. (1995). Behavioral and neurochemical effects of chronic methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol* 17: 531-543.

Freire-Garabal M, Núñez MJ, Balboa JL, Fernández-Rial JC, and Belmonte A. (1992). Effects of amphetamine on the activity of phagocytosis in mice. *Life Sci.* 51: 145-148.

Frishman WH, Vecchio AD, Sanal S, and Ismail A. (2003). Cardiovascular manifestations of substance abuse Part 2: alcohol, amphetamines, heroin, cannabis, and caffeine. *Heart Dis* 5: 253-271.

Frith CH, Chang LW, Lattin DL, Walls RC, Hamm J, and Doblin R. (1987). Toxicity of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the dog and the rat. *Fundam Appl Toxicol* 9: 110-119.

Fuller RW, and Henderson MG. (1994). Neurochemistry of halogenated amphetamines. *In* Cho AK and Segal DS [eds.], Amphetamine and its analogs. Academic Press, San Diego.

Ganapathy V, Prasad PD, Ganapathy ME, and Leibach FH. (1999). Drugs of abuse and placental transport. *Adv Drug Deliv Rev* 1: 99-100.

García-Repetto R, Moreno E, Soriano T, Jurado C, Giménez MP, and Menéndez M. (2003). Tissue concentrations of MDMA and its metabolite MDA in three fatal cases of overdose. *Forensic Sci Int* 135: 110–114.

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.

Giulivi C, and Cadenas E. (1998). Oxidation of adrenaline by ferrylmyoglobin. *Free Radic Biol Med* 25: 175-183.

Gledhill JA, Moore DF, Bell D, and Henry JA. (1993). Subarachnoid haemorrhage associated with MDMA abuse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 1036-1037.

Glennon RA. (1999). Arylalkylamine drugs of abuse: an overview of drug discrimination studies. *Pharmacol Biochem Behav* 64: 251-256.

Gollamudi R, Ali SF, Lipe G, Newport G, Webb P, Lopez M, Leakey JE, Kolta M, and Slikker W. (1989). Influence of inducers and inhibitors on the metabolism in vitro and neurochemical effects in vivo of MDMA. *Neurotoxicology* 10: 455-466.

Gonçalves DIR, Moreno AJM, Carvalho M, Carvalho F, Bastos ML, and Custódio JBA. (2004). Ecstasy and *p*-methylthioamphetamine change the Ca^{2+} homeostasis due to inhibition of mitochondrial permeability transition. *Fundam Clin Pharmacol* 18: 121.

Gong D, He Y, Karas M, and Reitman M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β_3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 272: 24129-24132.

Gordon CJ, Watkinson WP, O'Callaghan JP, and Miller DB. (1991). Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 339-344.

Green A, Cross A, and Goodwin G. (1995). Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy"). *Psychopharmacology* 119: 247-260.

Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O'Shea E, and Colado MI. (2003). The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* 55: 463-508.

Green AR, Sanchez V, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, and Colado MI. (2004). Effect of ambient temperature and a prior neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on the hyperthermic response of rats to a single or repeated (binge ingestion) low dose of MDMA. *Psychopharmacology* 173: 264–269.

Greene SL, Dargan PI, O'Connor N, Jones AL, and Kerins M. (2003). Multiple toxicity from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Am J Emerg Med* 21: 121-124.

Grob CS, Bravo GL, Walsh RN, and Liester MB. (1992). The MDMA-neurotoxicity controversy: implications for clinical research with novel psychoactive drugs. *J Nerv Ment Dis* 180: 355-356.

Grob CS, Poland RE, 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.

Grynberg A, Ziegler D, and Rupp H. (1996). Sympathoadrenergic overactivity and lipid metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 10: 223-230.

Gudelsky GA, Yamamoto BK, and Nash JF. (1994). Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by 5-HT_2 receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 264: 325-330.

Gudelsky GA. (1996). Effect of ascorbate and cysteine on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of brain serotonin. *J Neural Transm* 103: 1397-1404.

Gudelsky GA, and Nash JF. (1996). Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J Neurochem* 66: 243-249.

Gunasekar PG, Kanthasamy AG, Borowitz JL, and Isom GE. (1995). NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65: 2016-2021.

Haenen HE, Rogmans P, Temmink JHM, and van Bladeren PJ. (1994). Differential detoxification of two thioether conjugates of menadione in confluent monolayers of rat renal proximal tubular cells. *Toxicol In Vitro* 8: 207-214.

Halachanova V, Sansone R, and McDonald S. (2001). Delayed rhabdomyolysis after ecstasy use. *Mayo Clin Proc* 76: 112-113.

Halliwell B, and Gutteridge JMC. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York.

Hammersley R, Ditton J, Smith I, and Short E. (1999). Patterns of ecstasy use by drug users. *Br J Criminol* 39: 625-647.

Hanyu S, Ikeguchi K, Imai H, Imai N, and Yoshida M. (1995). Cerebral infarction associated with 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") abuse. *Eur Neurol* 35: 173.

Harries DP, and Silva RD. (1992). Ecstasy and intracerebral haemorrhage. *Scott Med J* 37: 150-152.

Hartung TK, Schofield E, Short AI, Parr MJA, and Henry JA. (2002). Hyponatraemic states following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") ingestion. *QJM* 95: 431-437.

Hastings TG, Lewis DA, and Zigmond MJ. (1996). Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1956-1961.

Hatzidimitriou G, McCann UD, and Ricaurte GA. (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.

Hayner GN, and McKinney H. (1986). The dark side of ecstasy. *J Psychoact Drugs* 18: 341-346.

He SY. (1995). Methamphetamine-induced toxicity in cultured adult rat cardiomyocytes. *Nippon Hoigaku Zasshi* 49: 175-186.

Hegadoren KM, Baker GB, and Bourin M. (1999). 3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 539-553.

Hegedus ZL. (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.

Helmlin HJ, Bracher K, Bourquin D, Vonlanthen D, Brenneisen R, and Styk J. (1996). Analysis of 3,4-methylenedioximethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. *J Anal Toxicol* 20: 432-440.

Henry JA, Jeffreys KJ, and Dawling S. (1992). Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet* 340: 384-387.

Henry JA, Fallon JK, Kicman AT, Hutt AJ, Cowan DA, and Forsling M. (1998). Low-dose MDMA ("ecstasy") induces vasopressin secretion. *Lancet* 351: 1784.

Henry JA. (2000). Metabolic consequences of drug misuse. *Br J Anaesth* 85: 136-142.

Hewitt KE, and Green AR. (1994). Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA ('ecstasy') to rats. *Neuropharmacology* 33: 1589-1595.

Heye N, and Hankey GJ. (1996). Amphetamine-associated stroke. *Cerebrovasc Dis* 6: 149-155.

Hiramatsu M, Kumagai Y, Unger SE, and Cho AK. (1990). Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 521-527.

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 BB, and Lefkowitz RJ. (1996). Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists, pp. 199-248. *In* Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW and Gilman AG [eds.], Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill, New York.

Hoffman BB, and Taylor P. (2001). The autonomic and somatic motor nervous systems, pp. 115-153. *In* Hardman JG, Limbird LE and Gilman AG [eds.], Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. McGraw-Hill, New York.

Holden R, and Jackson MA. (1996). Near-fatal hyponatraemic coma due to vasopressin over-secretion after "ecstasy" (3,4-MDMA). *Lancet* 347: 1052.

Holt SG, and Moore KP. (2001). Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med* 27: 803-811.

House RV, Thomas PT, and Bhargava HN. (1994). Comparison of immune functional parameters following in vitro exposure to natural and synthetic amphetamines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 16: 1-21.

House RV, Thomas PT, and Bhargava HN. (1995). Selective modulation of immune function resulting from in vitro exposure to methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *Toxicology* 96: 59-69.

Hrometz SL, Brown AW, Nichols DE, and Sprague JE. (2004). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-mediated production of hydrogen peroxide in an in vitro model: the role of dopamine, the serotonin-reuptake transporter, and monoamine oxidase-B. *Neurosci Lett* 367: 56-59.

Huether G, Zhou D, and Rüther E. (1997). Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its congeners. *J Neural Transm* 104: 771-794.

IPDT (2003). Relatório anual 2002 - A situação do país em matéria de drogas e toxicodependências Vol I - Informação estatística. Instituto da Droga e da Toxicodependência, Lisboa.

Iio M, Kawaguchi H, Sakota Y, Otonari J, and Nitahara H. (1993). Effects of polyphenols, including flavonoids, on glutathione S-transferase and glutathione reductase. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1678-1680.

Insel TR, Battaglia G, Johannessen JN, Marra S, and De Souza EB. (1989). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") selectively destroys brain serotonin terminals in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 249: 713-720.

Irwin M, Hauger RL, Jones M, Provencio M, and Britton KT. (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.

James RC, Roberts SM, and Harbison RD. (1983). Perturbation of hepatic glutathione by α_2-adrenergic agonists. *Fundam Appl Toxicol* 3: 303-308.

Jansen KLR. (1999). Ecstasy (MDMA) dependence. *Drug Alcohol Depend* 53: 121-124.

Jayanthi S, Ladenheim B, Andrews AM, and Cadet JL. (1999). Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *Neuroscience* 91: 1379-1387.

Jiang JP, and Downing SE. (1990). Catecholamine cardiomyopathy: review and analysis of pathogenetic mechanisms. *Yale J Biol Med* 63: 581-591.

Johnson EA, Shvedova AA, Kisin E, O'Callaghan JP, Kommineni C, and Miller DB. (2002). *d*-MDMA during vitamin E deficiency: effects on dopaminergic neurotoxicity and hepatotoxicity. *Brain Res* 933: 150-163.

Johnson M, Hanson GR, and Gibb JW. (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, Elayan I, Hanson GR, Foltz RL, Gibb JW, and Lim HK. (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.

Jones AL, Jarvie DR, McDermid G, and Proudfoot AT. (1994). Hepatocellular damage following amphetamine intoxication. *J Toxicol Clin Toxicol* 32: 435-444.

Jones AL, and Simpson KJ. (1999). Review article: mechanisms and management of hepatotoxicity in ecstasy (MDMA) and amphetamine intoxications. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 129-133.

Karch SB. (1993). The pathology of drug abuse, pp. 156-218. *In* Karch SB [ed.]. CRC Press, Boca Raton.

Kelly PA, Ritchie IM, Quate L, McBean DE, and Olverman HJ. (2002). Functional consequences of perinatal exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rat brain. *Br J Pharmacol* 137: 963-970.

Kendrick WC, Hull AR, and Knochel JP. (1977). Rhabdomyolysis and shock after intravenous amphetamine administration. *Ann Int Med* 86: 381-387.

Khakoo S, Coles C, Armstrong J, and Barry R. (1995). Hepatotoxicity and accelerated fibrosis following 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") usage. *J Clin Gastroenterol* 20: 244-247.

Kintz P, and Samyn N. (1999). Determination of "ecstasy" components in alternative biological specimens. *J Chromatogr B* 733: 137-143.

Kish SJ, Furukawa Y, Ang L, Vorce SP, and Kalasinsky KS. (2000). Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (ecstasy) user. *Neurology* 55: 294-296.

Kish SJ. (2002). How strong is the evidence that brain serotonin neurons are damaged in human users of ecstasy? *Pharmacol Biochem Behav* 71: 845-855.

Koesters SC, Rogers PD, and Rajasingham CR. (2002). MDMA ("ecstasy") and other club drugs: the new epidemic. *Pediatr Clin North Am* 49: 415-433.

Koprich JB, Chen EY, Kanaan NM, Campbell NG, Kordower JH, and Lipton JW. (2003). Prenatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) alters exploratory behavior, reduces monoamine metabolism, and increases forebrain tyrosine hydroxylase fiber density of juvenile rats. *Neurotoxicol Teratol* 25: 509–517.

Kraemer T, and Maurer HH. (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 HH. (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 HK, Poblete JC, and Azmitia EC. (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.

Kreth K, Kovar K, Schwab M, and Zanger UM. (2000). Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "ecstasy"-related designer drugs. *Biochem Pharmacol* 59: 1563-1571.

Kuczenski R, and Segal DS. (1994). Neurochemistry of amphetamine. *In* Cho AK and Segal DS [eds.], Amphetamine and its analogs. Academic Press.

Kumagai Y, Lin LY, Schmitz DA, and Cho AK. (1991). Hydroxyl radical mediated demethylenation of (methylenedioxy)phenyl compounds. *Chem Res Toxicol* 4: 330-334.

Kunitz O, Ince A, Kuhlen R, and Rossaint R. (2003). Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after ecstasy (MDMA) intoxication. *Anaesthesist* 52: 511-515.

Kwon C, Zaritsky A, and Dharnidharka VR. (2003). Transient proximal tubular renal injury following ecstasy ingestion. *Pediatr Nephrol* 18: 820-822.

Lai TI, Hwang JJ, Fang CC, and Chen WJ. (2003). Methylene-3,4-dioxymethamphetamine-induced acute myocardial infarction. *Ann Emerg Med* 42: 759-762.

Lapostolle F, Eliez CA, Massioui YE, Adnet F, Leclerc G, Efthymiou ML, and Baud F. (1997). Toxicité de l'ecstasy. *Presse Med* 26: 1881-1884.

Lau S. (1995). Quinone-thioether-mediated nephrotoxicity. *Drug Metab Rev* 27: 125-41.

Leão A, Carvalho F, Bastos ML, Amado FL, Vilarinho L, Quelhas D, Appell HJ, and Duarte JA. (2004). Strenuous exercise aggravates MDMA-induced skeletal muscle damage in mice. *Toxicology (in press)*.

Leonardi ET, and Azmitia EC. (1994). MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and MAO type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 10: 231-238.

Lester SJ, Baggott M, Welm S, Schiller NB, Jones RT, Foster E, and Mendelson J. (2000). Cardiovascular effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 133: 969-973.

Liechti ME, Baumann C, Gamma A, and Vollenweider FX. (2000a). Acute psychological effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") are attenuated by serotonin uptake inhibitor citalopram. *Neuropsychopharmacology* 22: 513-521.

Liechti ME, Saur MR, Gamma A, Hell D, and Vollenweider FX. (2000b). Psychological and physiological effects of MDMA ("ecstasy") after pretreatment with the 5-HT antagonist ketaserin in healthy humans. *Neuropsychopharmacology* 23: 396-404.

Liechti ME, Gamma A, and Vollenweider FX. (2001). Gender differences in the subjective effects of MDMA. *Psychopharmacology* 154: 161-168.

Liester MB, Grob CS, Bravo GL, and Walsh RN. (1992). Phenomenology and sequelae of 3,4-methylenedioxymethamphetamine use. *J Nerv Ment Dis* 180: 345-352.

Lim HK, and Foltz RL. (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 HK, and Foltz RL. (1989). Identification of metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in human urine. *Chem Res Toxicol* 2: 142-143.

Lim HK, and Foltz RL. (1991a). 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 HK, and Foltz RL. (1991b). Ion trap tandem mass spectrometric evidence for the metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) to the potent neurotoxin 2,4,5-trihydroxymethamphetamine and 2,4,5-trihydroxyamphetamine. *Chem Res Toxicol* 4: 626-632.

Lim HK, Zeng S, Chei DM, and Foltz RL. (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.

Lim HK, and Foltz RL. (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.

Losser MR, and Payen D (1996). Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis* 16: 357-367.

Lowell BB, and Spiegelman BM. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-660.

Lu D, and Das DK. (1993). Induction of differential heat schock gene expression in heart, lung, liver, brain and kidney by a sympathomimetic drug, amphetamine. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 808-812.

Luo D, and Vincent SR. (1994). NMDA-dependent nitric oxide release in the hippocampus in vivo: interactions with noradrenaline. *Neuropharmacology* 33: 1345-1350.

Lyles J, and Cadet JL. (2003). Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res Reviews* 42: 155-168.

Lynskey M, White V, Hill D, Letcher T, and Hall W. (1999). Prevalence of illicit drug use among youth: results from the Australian school students' alcohol and drugs survey. *Aust N Z J Public Health* 23: 519-524.

Malberg JE, Sabol KE, and Seiden LS. (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 JE, and Seiden LS. (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.

Mallick A, and Bodenham AR. (1997). MDMA induced hyperthermia: a survivor with an initial body temperature of 42.9°C. *J Accid Emerg Med* 14: 336-338.

Malpass A, White JM, Irvine RJ, Somogyi AA, and Bochner F. (1999). Acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and Dark Agouti rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64: 29-34.

Mas M, Farre M, De la Torre, Roset PN, 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.

Matthews SB, Henderson AH, and Campbell AK. (1985). The adrenochrome pathway: the major route for adrenalin catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *J Mol Cell Cardiol* 17: 339-448.

Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T, and Peters FT. (2000). Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ("ecstasy"). *Toxicol Lett* 112-113: 133-142.

Maxwell DL, Polkey MI, and Henry JA. (1993). Hyponatraemia and catatonic stupor after taking "ecstasy". *Br Med J* 307: 1399.

McCann UD, and Ricaurte GA. (1991). Major metabolites of (±)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) do not mediate its toxic effects on brain serotonin neurons. *Brain Res* 545: 279-282.

McCann UD, and Ricaurte GA. (1992). MDMA ("ecstasy") and panic disorder: induction by a single dose. *Biol Psychiatry* 32: 950-953.

McCann UD, and Ricaurte GA. (1994). Use and abuse of ring-substituted amphetamines, pp. 371-385. *In* Cho AK and Segal DS [eds.], Amphetamine and its analogs. Academic Press, San Diego.

McCann UD, Ridenour A, Shaham Y, and Ricaurte GA. (1994). Serotonin neurotoxicity after (±) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy): a controlled study in humans. *Neuropsychopharmacology* 10: 129-138.

McCann UD, Szabo Z, Scheffel U, Dannals RF, and Ricaurte GA. (1998). Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* 352: 1433-1437.

McCann UD, Mertl M, Eligulashvili V, and Ricaurte GA. (1999). Cognitive performance in (±) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") users: a controlled study. *Psychopharmacol* 143: 417-425.

McCann UD, Eligulashvili V, and Ricaurte GA. (2000). (±) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies. *Neuropsychobiology* 42: 11-16.

McCoy EP, Renfrew C, Johnston JR, and Lavery G. (1994). Malignant hyperpyrexia in an MDMA ("ecstasy") abuser. *Ulster Med J* 63: 103-107.

McDaid J, and Docherty JR. (2001). Vascular actions of MDMA involve α_1 and α_2-adrenoceptors in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 133: 429-437.

McElhatton PR, Bateman DN, Evans C, Pughe KR, and Thomas SH. (1999). Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure. *Lancet* 354: 1441-1442.

McKenna DJ, and Peroutka SJ. (1990). Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J Neurochem* 54: 14-22.

Mechan AO, Esteban B, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, and Green AR. (2002). The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. *Br J Pharmacol* 135: 170-80.

Meister A. (1989). On the biochemistry of glutathione, pp. 3-21. *In* Taniguchi N, Higashi T, Sakamoto Y and Meister A [eds.], Glutathione Centennial. Molecular perspectives and clinical implications. Academic Press, San Diego, California.

Mertens JJ, Temmink JH, van Bladeren PJ, Jones TW, Lo HH, Lau SS, and Monks TJ. (1991). Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase potentiates the nephrotoxicity of glutathione-conjugated chlorohydroquinones. *Toxicol Appl Pharmacol* 110: 45-60.

Meyer A, Mayerhofer A, Kovar K, and Schmidt WJ. (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.

Miller EK, Raese JD, 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 RT, Lau SS, and Monks TJ. (1995). Metabolism of 5-(glutathion-S-yl)-α-methyldopamine following intracerebroventricular administration to male sprague-dawley rats. *Chem Res Toxicol* 8: 634-641.

Miller RT, Lau SS, and Monks TJ. (1996). Effects of intracerebroventricular administration of 5-(glutathion-S-yl)-α-methyldopamine on brain dopamine, serotonin, and norepinephrine concentrations in male sprague-dawley rats. *Chem Res Toxicol* 9: 457-465.

Miller RT, Lau SS, and Monks TJ. (1997). 2,5-bis-(Glutathion-S-yl)-α-methyldopamine, a putative metabolite of (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. *Eur J Pharmacol* 323: 173-180.

Mills EM, Banks ML, Sprague JE, and Finkel T. (2003). Uncoupling the agony from ecstasy. *Nature* 426: 403-404.

Milroy CM, Clark JC, and Forrest ARW. (1996). Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *J Clin Pathol* 49: 149-153.

Milroy CM. (1999). Ten years of "ecstasy". *J R Soc Med* 92: 68-72.

Moeller MR, Steinmeyer S, and Kraemer T. (1998). Determination of drugs of abuse in blood. *J Chromatogr B* 713: 91-109.

Mohan P, and Bloom S. (1999). Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Cardiovasc Pathol* 8: 255–261.

Molliver ME, O'Hearn E, Battaglia G, and De Souza EB. (1986). Direct intracerebral administration of MDA and MDMA does not produce serotonin neurotoxicity. *Soc Neurosci* 12: 1234.

Molliver ME, Berger UV, Mamounas LA, Molliver DC, O'Hearn E, and Wilson MA. (1990). Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann N Y Acad Sci* 600: 661-664.

Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

Monks T, and Lau S. (1987). Commentary: Renal transport processes and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. *Drug Metab Dispos* 15: 437-41.

Monks T, Rivera M, Mertens J, Peters M, and Lau S. (1996). The kidney as a target for biological reactive metabolites: linking metabolism to toxicity. *Adv Exp Med Biol* 387: 203-12.

Monks T, and Lau S. (1998). The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 229-255.

Monks TJ, and Lau SS. (1992). Toxicology of quinone-thioethers. *Crit Rev Toxicol* 22: 243-270.

Monks TJ, and Lau SS. (1997). Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol* 10: 1296-1313.

Montiel-Duarte C, Varela-Rey M, Oses-Prieto J, Lopez-Zabalza M, Beitia G, Cenarruzabeitia E, and Iraburu M. (2002). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1588: 26-32.

Montiel-Duarte C, Ansorena E, Lopez-Zabalza M, Cenarruzabeitia E, and Iraburu M. (2004). Role of reactive oxygen species, glutathione and NF-KB in apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 67: 1025-1033.

Moore KA, Mozayani A, Fierro MF, 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.

Morgan MJ. (1999). Memory deficits associated with recreational use of "ecstasy" (MDMA). *Psychopharmacology* 141: 30-36.

Morgan MJ. (2000). Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology* 152: 230–248.

Murthy BVS, Roberts NB, and Wilkes RG. (1997a). Biochemical implications of ecstasy toxicity. *Ann Clin Biochem* 34: 442-445.

Murthy BVS, Wilkes RG, and Roberts NB. (1997b). Creatine kinase isoform changes following ecstasy overdose. *Anaesth Intens Care* 25: 156-159.

Nakagawa Y, and Moldéus P. (1992). Cytotoxic effects of phenyl-hydroquinone and some hydroquinones on isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 44: 1059-1065.

Nash JF, Meltzer HY, and Gudelsky GA. (1990). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem* 54: 1062-1067.

Nash JF, 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 JF, and Yamamoto BK. (1993). Effect of *d*-amphetamine on the intracellular concentrations of glutamate and dopamine in iprindole-treated rats. *Brain Res* 627: 1-8.

Nichols DE, Lloyd DH, Hoffman AJ, Nichols MB, and Yim GKW. (1982). Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [^{3}H] serotonin from rat brain synaptosomes. *J Med Chem* 25: 530-535.

Nichols DE, Hoffman AJ, Oberlender RA, Jacob P, and Shulgin AT. (1986). Derivatives of 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine: representative of a novel therapeutic class. *J Med Chem* 29: 2009-2015.

Nichols DE, and Oberlender R. (1989). Structure-activity relationships of MDMA-like substances. *NIDA Res Monogr* 94: 1-29.

Nichols DE, and Oberlender R. (1990). Structure-activity relationships of MDMA and related compounds: a new class of psychoactive drugs? *Ann N Y Acad Sci* 600: 613-623.

Nishisawa S, Mzengeza S, and Diksic M. (1999). Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on brain serotonin synthesis in the dog studied by positron emission tomography. *Neurochem Int* 34: 33-40.

Nonogaki K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43: 533-549.

Núñez O, Bañares R, Barrio J, Menchén L, Diego A, Salinero E, and Clemente G. (2002). Variabilidad de la expresión clínica de la toxicidad hepática por éxtasis. *Gastroenterol Hepatol* 25: 497-500.

OEDT (2001). Relatório anual 2001 - A evolução do fenómeno da droga na União Europeia. Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, Lisboa.

OEDT (2003). Relatório anual 2003 - A evolução do fenómeno da droga na União Europeia e na Noruega. Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, Lisboa.

O´Brien CP. (1996). Drug addiction and drug abuse, pp. 557-577. *In* Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW and Gilman AG [eds.], Goodman & Gilman´s. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill, New York.

O´Cain P, Hletko S, Ogden B, and Varner K. (2000). Cardiovascular and sympathetic responses and reflex changes elicited by MDMA. *Physiol Behav* 70: 141-148.

O´Connor A, Cluroe A, Couch R, Galler L, and Lawrence J. (1999). Death from hyponatraemia-induced cerebral oedema associated with MDMA ("ecstasy") use. *N Z Med J* 112: 255-256.

O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, Kuhar MJ, and Molliver ME. (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'Loinsigh E, Boland G, Kelly J, and O'Boyle K. (2001). Behavioural, hyperthermic and neurotoxic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine analogues in the wistar rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 621-638.

O'Neill ME, Arnolda LF, Coles DM, and Nikolic G. (1983). Acute amphetamine cardiomyopathy in a drug addict. *Clin Cardiol* 6: 189-191.

O'Shea E, Granados R, Esteban B, Colado MI, and Green AR. (1998). The relationship between the degree of neurodegeneration of rat brain 5-HT nerve terminals and the dose and frequency of administration of MDMA ('ecstasy'). *Neuropharmacology* 37: 919-926.

Odeh M. (1991). The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *N Engl J Med* 324: 1417-1422.

Ommen BV, Ploemen JH, Bogaards JJ, Monks TJ, Lau SS, and van Bladeren PJ. (1991). Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. Structure-activity relationship and mechanism. *Biochem J* 276: 661-666.

Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, and Nicotera P. (1989). Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *TIPS* 10: 281-285.

Ortuño J, Pizarro N, Farré M, Mas M, Segura J, Camí J, Brenneisen R, and De la Torre. (1999). Quantification of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr B* 723: 221-232.

Ozden N, Carale J, Mukherjee S, and Zetterman R. (2001). Ecstasy induced fulminant liver failure - half is enough. *AJG* 96: S230-S231.

Pacifici R, Zuccaro P, Farre M, Pichini S, Di Carlo S, Roset PN, 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: 309-316.

Pacifici R, Zuccaro P, Farre M, Pichini S, Di Carlo S, Roset PN, Lopez CH, 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 PN, 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, Lopez CH, Pichini S, Di Carlo S, Farre M, Roset PN, 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.

Pacifici R, Zuccaro P, Farre M, Pichini S, Di Carlo S, Roset PN, 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, Pichini S, Zuccaro P, Farre M, Segura M, Ortuno J, Di Carlo S, Bacosi A, Roset PN, Segura J, and De la Torre R. (2004). Paroxetine inhibits acute effects of MDMA on the immune system in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 285-292.

Pallanti S, and Mazzi D. (1992). MDMA (ecstasy) precipitation of panic disorder. *Biol Psychiatry* 32: 91-95.

Palumbo A, d'Ischia M, Misuraca G, and Prota G. (1989). A new look at the rearrangement of adrenochrome under biomimetic conditions. *Biochim Biophys Acta* 990: 297-302.

Parker MA, Marona-Lewicka D, Kurrasch D, Shulgin AT, and Nichols DE. (1998). Synthesis and pharmacological evaluation of ring-methylated derivatives of 3,4-(methylenedioxy)amphetamine (MDA). *J Med Chem* 41: 1001-1005.

Parr MJ, Low HM, and Botterill P. (1997). Hyponatraemia and death after "ecstasy" ingestion. *Med J Aust* 166: 136-137.

Parrott A, Sisk E, and Turner J. (2000). Psychobiological problems in heavy 'ecstasy' (MDMA) polydrug users. *Drug Alcohol Depend* 60: 105-110.

Parrott AC. (2001). Human psychopharmacology of ecstasy (MDMA): a review of 15 years of empirical research. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 16: 557-577.

Parrott AC. (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.

Patel N, Kumagai Y, Unger SE, Fukuto JM, and Cho AK. (1991). Transformation of dopamine and alpha-methyldopamine by NG108-15 cells: formation of thiol adducts. *Chem Res Toxicol* 4: 421-426.

Paterson DJ. (1996). Antiarrhythmic mechanisms during exercise. *J Appl Physiol* 80: 1853-1862.

Pattison DI, Dean RT, and Davies MJ. (2002). Oxidation of DNA, proteins and lipids by DOPA, protein-bound DOPA, and related catechol(amine)s. *Toxicology* 177: 23-37.

Pedersen NP, and Blessing WW. (2001). Cutaneous vasoconstriction contributes to hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in conscious rabbits. *J Neurosci* 21: 8648-8654.

Pedersen W, and Skrondal A. (1999). Ecstasy and new patterns of drug use: a normal population study. *Addiction* 94: 1695-1706.

Pentel PR, Jentzen J, and Sievert J. (1987). Myocardial necrosis due to intraperitoneal administration of phenylpropanolamine in rats. *Fundam Appl Toxicol* 9: 167-172.

Plessinger MA. (1998). Prenatal exposure to amphetamines. Risks and adverse outcomes in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 25: 119-138.

Pletscher A, Bartholini G, Bruderer H, Burkard WP, and Gey KF. (1964). Chlorinated arylalkylamines affecting the cerebral metabolism of 5-hydroxytryptamine. *J Pharmacol Exp Ther* 145: 344-350.

Ploemen JH, Ommen BV, and Bladeren PJV. (1991). Irreversible inhibition of human glutathione S-transferase isoenzymes by tetrachloro-1,4-benzoquinone and its glutathione conjugate. *Biochem Pharmacol* 41: 1665-1669.

Poblete JC, and Azmitia EC. (1995). Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methtlenedioxymethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT_{2A} receptor. *Brain Res* 680: 9-15.

Powers RH, Stadnicka A, Kalbfleish JH, and Skibba JL. (1992). Involvement of xanthine oxidase in oxidative stress and iron release during hyperthermic rat liver perfusion. *Cancer Res* 52: 1699-1703.

Ramamoorthy JD, Ramamoorthy S, Leibach FH, and Ganapathy V. (1995). Human placental monoamine transporters as targets for amphetamines. *Am J Obstet Gynecol* 173: 1782-1787.

Ramamoorthy S, Leibach FH, Mahesh VB, and Ganapathy V. (1992). Active transport of dopamine in human placental brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 262: 1189-1196.

Ramcharan S, Meenhorst PL, Otten JM, Koks CHW, Boer D, Maes RA, and Beijnen JH. (1998). Survival after massive ecstasy overdose. *J Toxicol Clin Toxicol* 36: 727-731.

Randall T. (1992). Ecstasy-fueled "rave" parties become dances of death for english youths. *JAMA* 268: 1505-1506.

Reed DJ. (1990a). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Toxicol* 30: 603-631.

Reed DJ. (1990b). Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem Res Toxicol* 3: 495-502.

Remião F. (2002). Cardiotoxicidade do isoproterenol e dos produtos da sua oxidação. Estudos mecanísticos de suspensões de cardiomiócitos isolados de rato adulto (Tese de Doutoramento). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto

Remião F, Carmo H, Carvalho FD, and Bastos ML. (1999). Inhibition of glutathione reductase by isoproterenol oxidation products. *J Enzym Inhib* 15: 47-61.

Remião F, Carvalho M, Carmo H, Carvalho FD, and Bastos ML. (2002). Cu^{2+}-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol* 15: 861-869.

Reneman L, Booij J, Schmand B, Brink W, and Gunning B. (2000). Memory disturbances in "Ecstasy" users are correlated with an altered brain serotonin neurotransmission. *Psychopharmacology* 148: 322-324.

Reneman L, Booij J, Bruin K, Reitsma JB, Wolff FA, Gunning WB, Heeten GJ, and 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: 1864-1869.

Reneman L. (2003). Designer drugs: how dangerous are they? *J Neural Transm Suppl* 66: 61-83.

Ricaurte G, McCann U, 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 GA, DeLanney LE, Irwin I, and Langston JW. (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 GA, and McCann UD. (1992). Neurotoxic amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. *Ann N Y Acad Sci* 648: 371-382.

Ricaurte GA, Sabol KE, and Seiden LS. (1994). Functional consequences of neurotoxic amphetamine exposure, pp. 297-313. *In* Cho AK and Segal DS [eds.], Amphetamine and its analogs. Academic Press, San Diego.

Ricaurte GA, Yuan J, and McCann UD. (2000b). (±) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology* 42: 5-10.

Rieder MJ. (2000). Some light from the heat: implications of rave parties for clinicians. *CMAJ* 162: 1829-1830.

Riordan SM, and Williams R. (1999). Cause and prognosis in acute liver failure. *Liver Transpl Surg* 5: 86-89.

Rochester JA, and Kirchner JT. (1999). Ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine): history, neurochemistry, and toxicology. *J Am Board Fam Pract* 12: 137-142.

Rohrig TP, and Prouty RW. (1992). Tissue distribution of methylenedioxymethamphetamine. *J Anal Toxicol* 16: 52-53.

Roques V, Perney P, Beaufort P, Hanslik B, Ramos J, Durand L, Bricquir YL, and Blanc F. (1998). Hépatite aigue à l'ecstasy. *Presse Med* 27: 468-470.

Rosei MA, Blarzino C, Foppoli C, Mosca L, and Coccia R. (1994). Lipoxygenase-catalyzed oxidation of catecholamines. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 344-350.

Rudnick G, and Wall SC. (1992). The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1817-1821.

Rupp H, Dhalla KS, and Dhalla NS. (1994). Mechanisms of cardiac cell damage due to catecholamines: significance of drugs regulating central sympathetic outflow. *J Cardiovasc Pharmacol* 24: S16-S24.

Rushmore TH, Pickett CB, and Lu AYH. (1994). Conjugation-deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity: regulation of expression of rat liver glutathione S-transferases, pp. 79-107. *In* Kauffman FC [ed.], Handbook of experimental pharmacology. Springer Verlag, Berlin.

Rusyniak DE, Tandy SL, Kamendulis LM, Sprague JE, and Klaunig JE. (2004). The effects of ecstasy on rat liver bioenergetics. *Acad Emerg Med* 11: 723-729.

Sabol KE, Lew R, Richards JB, Vosmer GL, and Seiden LS. (1996). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part I: synaptosomal uptake and tissue concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 846-854.

Salminen WF, Voellmy R, and Roberts SM. (1997). Protection against hepatotoxicity by a single dose of amphetamine: the potential role of heat shock protein induction. *Toxicol Appl Pharmacol* 147: 247-258.

Schardein JL. (1980). Drugs as teratogens. CRC Press, Florida.

Schechter MD. (1988). Serotonergic-dopaminergic mediation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy"). *Pharmacol Biochem Behav* 31: 817-824.

Schifano F. (1991). Chronic atypical psychosis associated with MDMA ("ecstasy") abuse. *Lancet* 338: 1335.

Schifano F, Furia LD, 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.

Schifano F, Oyefeso A, Corkery J, Cobain K, Jambert-Gray R, Martinotti G, and Ghodse AH. (2003). Death rates from ecstasy (MDMA, MDA) and polydrug use in England and Wales 1996-2002. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 18: 519-524.

Schmidt CJ. (1987). Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 1-7.

Schmidt CJ, and Taylor VL. (1988). Direct central effects of acute methylenedioxymethamphetamine on serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 156: 121-131.

Schmidt CJ, Abbate GM, Black CK, and Taylor VL. (1990a). Selective 5-hydroxytryptamine$_2$ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 478-483.

Schmidt CJ, Black CK, Abbate GM, and Taylor VL. (1990b). Methylenedioxymethamphetamine-induced hyperthermia and neurotoxicity are independently mediated by 5-HT_2 receptors. *Brain Res* 529: 85-90.

Schmidt CJ, Black CK, and Taylor VL. (1990c). Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of methylenedioxymethamphetamine. *Eur J Pharmacol* 181: 59-70.

Schmidt CJ, Taylor VL, Abbate GM, and Nieduzak TR. (1991). 5-HT_2 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.

Schmidt CJ. (1994). Neurochemistry of ring-substituted amphetamine analogs, pp. 151-175. *In* Cho AK and Segal DS [eds.], Amphetamine and its analogs. Academic Press, San Diego.

Schwartz RH, and Miller NS. (1997). MDMA (ecstasy) and the rave: a review. *Pediatrics* 100: 705-708.

Schweigert N, Zehnder AJB, and Eggen RIL. (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol* 3: 81-91.

Sciuto AM. (1997). Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection. *In* Baskin SI and Salem H [eds.], Oxidants, antioxidants and free radicals. Taylor & Francis, London.

Screaton GR, Cairns HS, Sarner M, Singer M, Thrasher A, and Cohen SL. (1992). Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after MDMA ("ecstasy") abuse. *Lancet* 339: 677-678.

Segal DS, and Kuczenski R. (1994). Behavioral pharmacology of amphetamine, pp. 115-150. *In* Cho AK and Segal DS [eds.], Amphetamine and its analogs. Academic Press, San Diego.

Segura M, Ortuno J, Farre M, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, Llebaria A, Joglar J, Roset PN, Segura J, and De la Torre. (2001). 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol* 14: 1203-1208.

Segura-Aguilar J, and Lind C. (1989). On the mechanism of the Mn^{3+}-induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT-diaphorase and superoxide dismutase. *Chem Biol Interact* 72: 309-324.

Segura-Aguilar J, Metodiewa D, and Welch CJ. (1998). Metabolic activation of dopamine o-quinones to o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochim Biophys Acta* 1381: 1-6.

Seiden LS, Sabol KE, and Ricaurte GA. (1993). Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 639-677.

Semple DM, Ebmeier KP, Glabus MF, O'Carroll RE, and Johnstone EC. (1999). Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA ('ecstasy') users. *Br J Psychiatry* 175: 63-69.

Series H, Boeles S, Dorkins E, and Peveler R. (1994). Psychiatric complications of "ecstasy" use. *J Psychopharmacol* 8: 60-61.

Shankaran M, Yamamoto BK, and Gudelsky GA. (1999a). 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 BK, and Gudelsky GA. (1999b). 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 BK, and Gudelsky GA. (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.

Shields RO. (1990). Amphetamines, pp. 771-780. *In* Haddad LM and Winchester JF [eds.], Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose, 2nd ed. WB Saunders Company, Philadelphia.

Sies H, and Graf P. (1985). Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenilephrine and adrenaline. *Biochem J* 226: 545-549.

Simantov R, and Tauber M. (1997). The abused drug MDMA (ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *FASEB J* 11: 141-146.

Simons M, and Downing SE. (1985). Coronary vasoconstriction and catecholamine cardiomyopathy. *Am Heart J* 109: 297-304.

Sinet PM, Heikkita RE, and Cohen G. (1980). Hydrogen peroxide production by rat brain *in vivo*. *J Neurochem* 34: 1421-1428.

Singarajah C, and Lavies NG. (1992). An overdose of ecstasy. A role for dantrolene. *Anaesthesia* 47: 686-687.

Skibba JL, Stadnicka A, Kalbfleisch JH, and Powers RH. (1989). Effects of hyperthermia on xanthine oxidase activity and glutathione levels in the perfused rat liver. *J Biochem Toxicol* 4: 119-125.

Skibba JL, Powers RH, Stadnicka A, Cullinane DW, Almagro UA, and Kalbfleisch JH. (1991). Oxidative stress as a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 7: 749-761.

Smith HJ, Roche AHG, Jagusch MF, and Herdson PB. (1976). Cardiomyopathy associated with amphetamine administration. *Am Heart J* 91: 792-797.

Smythies J, and Galzigna L. (1998). The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim Biophys Acta* 1380: 159-162.

Sonsalla PK, Riordan DE, and Heikkila RE. (1991). Competitive and noncompetitive antagonists at N-methyl-D-aspartate receptors protect against methamphetamine-induced dopaminergic damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 506-512.

Sprague JE, and Nichols DE. (1995). Inhibition of MAO-B protects against MDMA-induced neurotoxicity in the striatum. *Psychopharmacology* 118: 357-359.

Sprague JE, Everman SL, and Nichols DE. (1998). An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology* 19: 427-442.

Sprague JE, Banks ML, Cook VJ, and Mills EM. (2003). Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and sympathetic nervous system involvement in the hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy). *J Pharmacol Exp Ther* 305: 159-166.

St Omer VE, Ali SF, Holson RR, Duhart HM, Scalzo FM, and Slikker W. (1991). Behavioral and neurochemical effects of prenatal methylenedioxymethamphetamine (MDMA) exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol* 13: 13-20.

Steele TD, Brewster WK, Johnson MP, Nichols DE, and Yim GK. (1991). Assessment of the role of alpha-methylepinine in the neurotoxicity of MDMA. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 345-351.

Stephans SE, and Yamamoto BK. (1994). Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse* 17: 203-209.

Steranka LR, and Sanders-Bush E. (1980). Long-term effects of continuous exposure to amphetamine on brain dopamine concentration and synaptosomal uptake in mice. *Eur J Pharmacol* 65: 439-443.

Stewart JL, and Meeker JE. (1997). Fetal and infant deaths associated with maternal methamphetamine abuse. *J Anal Toxicol* 21: 515-517.

Stewart VC, Heslegrave AJ, Brown GC, Clark JB, and Heales SJ. (2002). Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. *Eur J Neurosci* 15: 458-464.

Stone DM, Hanson GR, and Gibb JW. (1987). Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology* 26: 1657-1661.

Stone DM, Johnson M, Hanson GR, and Gibb JW. (1988). Role of endogenous dopamine in the central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 79-87.

Strote J, Lee JE, and Wechsler H. (2002). Increasing MDMA use among college students: results of a national survey. *J Adolesc Health* 30: 64-72.

Suarez R, and Riemersma R. (1988). "Ecstasy" and sudden cardiac death. *Am J Forensic Med Pathol* 9: 339-341.

Sydow K, Lieb R, Pfister H, Hofler M, and Wittchen HU. (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.

Taam GM, Takeo S, Ziegelhoffer A, Singal PK, Beamish RE, and Dhalla NS. (1986). Effect of adrenochrome on adenine nucleotides and mitochondrial oxidative phosphorylation in rat heart. *Can J Cardiol* 2: 88-93.

Taffe M, Weed M, Davis S, Huitron-Resendiz S, Schroeder R, Parsons L, Henriksen S, and Gold L. (2001). Functional consequences of repeated (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 24: 230-239.

Tappia PS, Hata T, Hozaima L, Sandhu MS, Panagia V, and Dhalla NS. (2001). Role of oxidative stress in catecholamine-induced changes in cardiac sarcolemmal Ca^{2+} transport. *Arch Biochem Biophys* 387: 85-92.

Taraska T, and Finnegan KT. (1997). Nitric oxide and the neurotoxic effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 941-947.

Tate SS. (1980). Enzymes of mercapturic acid formation, pp. 95-120. *In* Jakoby WB [ed.], Enzymatic basis of detoxification. Academic Press, Orlando.

Tate SS, and Meister A. (1985). gamma-Glutamyl transpeptidase from kidney. *Methods Enzymol* 113: 400-419.

Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, and Shiozaki H. (1977). Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 107: 51-60.

Taylor WM, Reinhart PH, and Bygrave FL. (1983). Stimulation by α-adrenergic agonists of Ca^{2+} fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem J* 212: 555-565.

Terada Y, Shinohara S, Matui N, and Ida T. (1988). Amphetamine-induced myoglobinuric acute renal failure. *Jpn J Med* 27: 305-308.

Terland O, Flatmark T, Tangeras A, and Gronberg M. (1997). Dopamine oxidation generates an oxidative stress mediated by dopamine semiquinone and unrelated to reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1731-1738.

Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemski FA, Zhang JG, and Fariss MW. (2000). Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocytes suspensions. *Chem Biol Interact* 127: 201-217.

Traub SJ, Hoffman RS, and Nelson LS. (2002). The "ecstasy" hangover: hyponatremia due to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Urban Health* 79: 549-555.

Tse DC, McCreery RL, and Adams RN. (1976). Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J Med Chem* 19: 37-40.

Tseng L, Menon MK, and Loh HH. (1976). Comparative actions of monomethoxyamphetamines on the release and uptake of biogenic amines in brain tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 197: 263-271.

Tucker GT, Lennard MS, Ellis SW, Woods HF, Cho AK, Lin LY, Hiratsuka A, Schmitz DA, and Chu TYY. (1994). The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem Pharmacol* 47: 1151-1156.

van Bladeren PJ. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* 129: 61-76.

Varela-Rey M, Montiel-Duarte C, Beitia G, Cenarruzabeitia E, and Iraburu MJ. (1999). 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") stimulates the expression of α1 (I) procollagen mRNA in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 678-682.

Varner KY, Delcarpio JB, and Moerschbaecher JM. (1998). Cardiac toxicity elicited by repeated administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *NIDA Res Monogr* 179: 214.

Velea D, Hautefeuille M, Vazeille G, and Lantran-Davoux C. (1999). Nouvelles drogues synthétiques empathogènes. *L'Encéphale* 25: 508-514.

Verebey K, Alrazi J, and Jaffe JH. (1988). The complications of "ecstasy" (MDMA). *JAMA* 259: 1649-1650.

Vollenweider FX, 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.

Walder P, and Amendt G. (1999). Ecstasy & C.ª. Campo das Letras, Porto.

Walubo A, and Seger D. (1999). Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "ecstasy": case report and review of the literature. *Hum Exp Toxicol* 18: 119-125.

Webber J, and Macdonald IA. (2000). Signalling in body-weight homeostasis: neuroendocrine efferent signals. *Proc Nutr Soc* 59: 397-404.

Welder AA. (1992). A primary culture system of postnatal rat heart cells for the study of cocaine and methamphetamine toxicity. *Toxicol Lett* 60: 183-196.

White JM, Bochner F, and Irvine RJ. (1997). The agony of "ecstasy". *Med J Aust* 166: 117-118.

White SR, Duffy P, and Kalivas PW. (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 SR, Obradovic T, Imel KM, and Wheaton MJ. (1996). The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 49: 455-479.

Williams A, and Unwin R. (1997). Prolonged elevation of serum creatinine kinase (CK) without renal failure after ingestion of ecstasy. *Nephrol Dial Transplant* 12: 361-362.

Williamson S, Gossop M, Powis B, Griffiths P, Fountain J, and Strang J. (1997). Adverse effects of stimulant drugs in a community of drug users. *Drug Alcohol Depend* 44: 87-94.

Wills EJ, Findlay JM, and McManus JPA. (1976). Effects of hyperthermia therapy on the liver. *J Clin Pathol* 29: 1-10.

Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE, and Ford PC. (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, 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 AR, and King LA. (1996). Tablets often contain substances in addition to, or instead of, ecstasy. *BMJ* 313: 423-424.

Wolff JEA, Belloni-Olivi L, Bressler JP, and Goldstein GW. (1992). γ-Glutamyl transpeptidase activity in brain microvessels exhibits regional heterogeneity. *J Neurochem* 58: 909-915.

Woodrow G, Harnden P, and Turney JH. (1995). Acute renal failure due to accelerated hypertension following ingestion of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). *Nephrol Dial Transplant* 10: 399-400.

Woods JD, and Henry JA. (1992). Hyperpyrexia induced by 3,4-methylenedioxyamphetamine ("Eve"). *Lancet* 340: 305.

Wu D, Otton SV, Inaba T, Kalow W, and Sellers EM. (1997). Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem Pharmacol* 53: 1605-1612.

Yamamoto BK, Nash JF, and Gudelsky GA. (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.

Yau JLW, Noble J, and Seckl JR. (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.

Yeh SY. (1999). N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of serotonin in rats. *Synapse* 31: 169–177.

Yen DJ, Wang SJ, Ju TH, Chen CC, Liao KK, Fuh JL, and Hu HH. (1994). Stroke associated with methamphetamine inhalation. *Eur Neurol* 34: 16-22.

Yuan J, Callahan BY, McCann UD, and Ricaurte GA. (2001). Evidence against an essential role of endogenous brain dopamine in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J Neurochem* 77: 1338-1347.

Yuan J, Cord BJ, McCann UD, Callahan T, and Ricaurte GA. (2002). Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *J Neurochem* 80: 960-969.

Zakzanis KK, and Young DA. (2001). Memory impairment in abstinent MDMA ("ecstasy") users: a longitudinal investigation. *Neurology* 56: 966-969.

Zalis EG, Lundberg GD, and Knutson RA. (1967). The pathophysiology of acute amphetamine poisoning with pathologic correlation. *J Pharmacol Exp Ther* 158: 115-127.

Zenenberg R, and Goldfarb DS. (2000). Evaluation of hyponatremia associated with use of methylenedioxymethylamphetamine (MDMA). *Int J Med Toxicol* 3: 30.

Zhao Z, Castagnoli N, Ricaurte GA, 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.

Zhou JF, Chen P, Zhou YH, Zhang L, and Chen HH. (2003). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) abuse may cause oxidative stress and potential free radical damage. *Free Radic Res* 37: 491-497.

Estudos *in vitro* da hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade da 3,4-metilenodioximetanfetamina e dos seus metabolitos
Márcia Cláudia Dias de Carvalho
F.S.481 | 30 Exemplares | Produção Gráfica: A.JNet | www.ajnet.net