

Rosa Manuela do Couto Leite

**Neurotoxicidade da “Ecstasy” na linha celular dopaminérgica
humana SH-SY5Y**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2011

Rosa Manuela do Couto Leite

**Neurotoxicidade da “Ecstasy” na linha celular dopaminérgica
humana SH-SY5Y**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2011

**Neurotoxicidade da “Ecstasy” na linha celular dopaminérgica
humana SH-SY5Y**

**Trabalho apresentado á Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Licenciatura com Mestrado Integrado em Ciências
Farmacêuticas.**

Rosa Manuela do Couto Leite

Sumário

A “ecstasy” (3,4-metilenodioximetanfetamina ou MDMA) é uma droga de abuso psicoestimulante usada, principalmente pelos jovens em contextos recreativos. São conhecidos os efeitos neurotóxicos tanto em animais de laboratório, como em humanos.

A maioria dos estudos experimentais em animais de laboratório e estudos clínicos em humanos foca essencialmente os efeitos agudos e a longo prazo da MDMA na função serotoninérgica, embora se encontre reportada toxicidade dopaminérgica e noutros neurónios pertencentes a outros sistemas cerebrais.

Por outro lado, as experiências em modelos animais demonstram que não só a MDMA, mas também os seus metabolitos podem desempenhar um papel fulcral na sua neurotoxicidade.

Este trabalho teve como objectivo estudar a neurotoxicidade da MDMA em células humanas dopaminérgicas, após uma exposição aguda e crónica à substância. A linha celular usada como modelo *in vitro* foi a SH-SY5Y, derivada de um neuroblastoma humano, sendo um modelo *in vitro* bastante usado na investigação de fenómenos neurotóxicos que envolvam o sistema dopaminérgico.

Após exposição das células às concentrações de MDMA de respectivamente 1,0 mM, 0,1 mM e 0,01 mM, por diferentes períodos de incubação (24 horas, 72 horas e 1 semana). Após avaliação da função mitocondrial, pelo teste do MTT verificou-se que a MDMA não produzia perda da viabilidade celular em nenhuma das concentrações e tempos usados. Os resultados obtidos, embora não apresentem significado estatístico, verificou-se uma ligeira diminuição da actividade mitocondrial com o aumento da dose e frequência de consumo de MDMA.

A partir destes resultados, pode concluir-se que a neurotoxicidade induzida pela MDMA não é provocada apenas pela sua acção directa mas sim pela acção conjunta dos seus metabolitos tóxicos, associados à hipertermia e ao aumento do stress oxidativo a nível cerebral.

Abstract

“Ecstasy” (3,4-methylenedioxyamphetamine or MDMA) is a psychostimulant drug of abuse used, mainly, by the young people in recreational settings. Neurotoxic effects are known both in animals and humans.

Most experimental studies in laboratory animals and human clinical studies, focuses mainly on the acute and long-term effects of MDMA on serotonergic function, although dopaminergic toxicity is also reported, as well is reported in neurons which belongs to other cerebral systems.

Moreover, experiments in animal models demonstrate that not only MDMA but also its metabolites may play a pivotal role in its neurotoxicity.

This work aimed to study the neurotoxicity of MDMA in dopaminergic human cells after an acute and chronic exposure to the substance. The cell line used as *in vitro* model was the SH-SY5Y, derived from a human neuroblastoma. This cell line is an *in vitro* model widely used in the investigation of neurotoxic phenomena involving the dopaminergic system.

After exposure of cells to concentrations of MDMA of respectively 1,0 mM, 0,1 mM and 0,01 mM, for different incubation periods (24 hours, 72 hours and 1 week). After evaluation of mitochondrial function by MTT test, showed that MDMA produced no loss of cell viability in any of the concentrations and times used. The obtained results, although not statistical significance, there was a slight decrease in mitochondrial activity with increasing dose and frequency of use of MDMA.

From these results, it can be concluded that the neurotoxicity induced by MDMA is not caused only by its direct action, but by the joint action of their toxic metabolites, associated with hipertermia and increased oxidative stress in the brain.

Dedicatórias

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Eng. Fernando Leite e Eng^a. Rufina Couto por toda a dedicação e ajuda ao longo da minha formação.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Paulo Soares Capela, pela orientação deste trabalho e por todo o apoio prestado ao longo deste percurso. Agradeço-lhe a disponibilidade prestada, bem como todo o conhecimento científico que me transmitiu e a forma com que sempre me motivou.

A algumas pessoas do laboratório de investigação (CEBIMED), pelo bom ambiente e constante disponibilidade para ajuda.

Ao meu namorado pela paciência e incentivo em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional, ajuda e paciência em todas as fases da minha vida. Sem o seu apoio e ajuda nada teria sido possível, a eles devo quem hoje sou.

Índice

Capítulo I – Introdução.....	18
1. Introdução geral.....	18
2. Perspectiva Histórica.....	21
3. Epidemiologia.....	27
4. Mecanismo de Acção das Anfetaminas.....	31
4.1. Mecanismo de Acção da Anfetamina.....	32
4.2. Mecanismo de Acção da MDMA.....	34
5. Farmacocinética.....	36
6. Efeitos Agudos em Humanos.....	40
7. Neurotoxicidade em animais de laboratório.....	42
8. Neurotoxicidade em humanos.....	48
9. Mecanismos de Neurotoxicidade.....	55
9.1. Formação de um metabolito tóxico da MDMA.....	55
9.2. Hipertermia.....	57
9.3. A Dopamina (DA) como promotor de neurotoxicidade.....	58
9.4. Influência do 5-HTT	60
9.5. Importância da formação de espécies reactivas.....	62
Capítulo II – Parte Experimental.....	63
1. Objectivo.....	63
Materiais.....	63
2. Métodos <i>in vitro</i>	64
2.1. Cultura celular.....	64
2.2. Determinação da viabilidade celular.....	65
2.3. Apresentação e análise estatística dos resultados.....	67
3. Resultados.....	68
4.1 – Neurotoxicidade da MDMA nas células SH-SY5Y após 24 horas de exposição.....	68

4.2 - Neurotoxicidade da MDMA nas células SH-SY5Y após 72 horas de exposição.....	69
4.3 - Neurotoxicidade da MDMA nas células SH-SY5Y após 1 semana de exposição.....	70
Capítulo III – Discussão e conclusão.....	71
1. Discussão.....	71
2. Conclusão.....	75
Capítulo IV – Bibliografia.....	76

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT, após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de MDMA (0,01 mM; 0,1 mM e 1,0 mM).....**68**

Gráfico 2 – Viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT, após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de MDMA (0,01 mM; 0,1 mM e 1,0 mM).....**69**

Gráfico 3 – Viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT, após 1 semana de exposição a diferentes concentrações de MDMA (0,01 mM; 0,1 mM e 1,0 mM).....**70**

Índice de figuras

Figura 1 (Fig. 1): Estrutura química da anfetamina e de alguns dos seus análogos metilados: metafetamina (MA), MDMA, MDA.....	19
Figura 2 (Fig. 2): Sistema monoaminérgico.....	32
Figura 3 (Fig. 3): Mecanismo de acção da anfetamina.....	33
Figura 4 (Fig. 4): Mecanismo de acção da MDMA.....	35
Figura 5 (Fig. 5): Principais vias do metabolismo e metabolitos da MDMA.....	39
Figura 6 (Fig. 6): Neurónios serotoninérgicos do córtex cerebral de macacos Squirrel.....	47
Figura 7 (Fig. 7): Formação de radicais livres provenientes da desaminação da DA pela acção da enzima MAO.....	60
Figura 8 (Fig. 8): Representação das condições em que foram realizados os ensaios nas placas de 48 poços.....	65

Abreviaturas

5-HIAA: Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT: Serotonina e 5-hidroxitriptamina

5-HT_{2A}; 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}: Receptores pós-sinápticos da serotonina

5-HTT: Transportadores da serotonina ou serotoninérgicos

ADHD: Distúrbio com défice de atenção e hiperactividade

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BHE: Barreira hemato-encefálica

COMT: Enzima catecol-*O*-metiltransferase

CSF: Fluido cerebrospinal

CYP: Enzima hepática do citocromo P450

DA: Dopamina

DAT: Transportadores da dopamina ou dopaminérgicos

DMEM: Meio Eagle modificado por Dubelcco

DOPAL: Dihidroxifenilacetaldeído

ECATD: Estudo sobre o Consumo de Álcool, Tabaco e Droga

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

MAO: Monoamina oxidase

ESPAD: “*European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs*”

FBS: Soro bovino fetal

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GBR 12909: Vanoxerina (Inibidor dos transportadores de dopamina)

GLU: Glutamato

GSH: Glutathione

H₂O₂: Peróxido de hidrogénio

HCL: Ácido clorídrico

HHA; α -metildopamina e α -MeDA: 3,4-dihidroxianfetamina

HHMA; N-metil- α -metildopamina e N-Me- α -MeDA: 3,4-dihidroximetanfetamina

HMA e 3-O-Me- α -MeDA: 4-hidroxi-3-metoxianfetamina

HMMA e 3-O-Me-N-Me- α -MeDA: 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina

HVA: Ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, Ácido homovanílico

L-DOPA: Precursor da dopamina

L-NAME: Éster metílico N ω -nitro-L-arginina

L-NNA: N ω -nitro-L-arginina

MA: Metanfetamina

MAO-B: Monoamina oxidase B

MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina

MDEA: 3,4-metilenodioxietanfetamina

MDMA; “ADAM”; “Ecstasy” e XTC: 3,4-metilenodioximetanfetamina

MK-801: Dizocilpina

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NA: Noradrenalina e Norepinefrina

NAC: N-acetilcisteína

NAT: Transportadores da noradrenalina ou noradrenérgicos

NEAA: Aminoácidos não essenciais

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NO: Óxido nítrico

NOS: NO sintetase

OEDT: Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência

PBN: N-tert-butil-alfa-fenilnitrona

PBS: Tampão fosfato salino

Pen/Estrep: Penicilina/Estreptomicina

PET: Tomografia de emissão de protões

PKC: Proteína cínase C

RNS: Espécies reactivas de azoto

ROS: Espécies reactivas de oxigénio

SDS: Dodecil sulfato de sódio

S-MTC: S-metil-L-tiocitrulina

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

SPECT: Tomografia computadorizada de emissão de simples protões

T_{1/2}: Tempo de semi-vida

TPH: Triptofano hidroxilase

Vmat: Transportadores vesicular das monoaminas

Y-GT: γ -glutamyltranspeptidase

Capítulo I – Introdução

1. Introdução geral

As propriedades estimulantes das fenilisopropilaminas, grupo que inclui a efedrina, a anfetamina e seus análogos, são desde há muito conhecidas (Silva e Tavares, 1999).

A efedrina pode ser obtida naturalmente a partir da planta *Ephedra Vulgaris*, planta relativamente abundante no mediterrâneo, cuja utilização advém desde os tempos remotos na medicina chinesa como anti-asmático (consultado em [http:// www.idt.pt](http://www.idt.pt)).

A indústria farmacêutica na pesquisa de derivados sintéticos análogos da efedrina, sintetizou a anfetamina. A anfetamina e seus análogos são substâncias com a capacidade de produzir sentimentos ou sensações aprazíveis naqueles que as utilizam, sendo classificadas como drogas de abuso psicoestimulantes. Os efeitos psicoestimulantes das anfetaminas assemelham-se aos provocados pela cocaína e traduzem-se por uma reacção de tipo orgasmático, violenta e imediata (“rush” ou “flash”).

Esta é a sensação procurada pelos consumidores que, numa fase de consumo compulsivo, não ingerem alimentos, têm ausência de sono e desenvolvem um quadro depressivo que pode evoluir para um quadro psicótico irreversível, semelhante ao da esquizofrenia paranóide (Silva e Tavares, 1999).

Este tipo de psicoestimulantes são usados, mundialmente, por milhões de pessoas, quer no âmbito clínico, quer no âmbito recreativo como droga de abuso. Neste último, a maioria dos consumidores estão entre as camadas mais jovens da população, sendo a MDMA (3,4 – metilenedioximetanfetamina), derivada da anfetamina e vulgarmente denominada de “ecstasy”, a droga consumida em maior escala, a nível europeu. Nos Estados Unidos da América (EUA) em 1985, foi classificada pela “Drug Enforcement Administration” como substância de grau I (substâncias com elevado potencial de abuso, sem utilizações clínicas reconhecidas e sem segurança aceitável mesmo sob supervisão médica) (Capela et al., 2009).

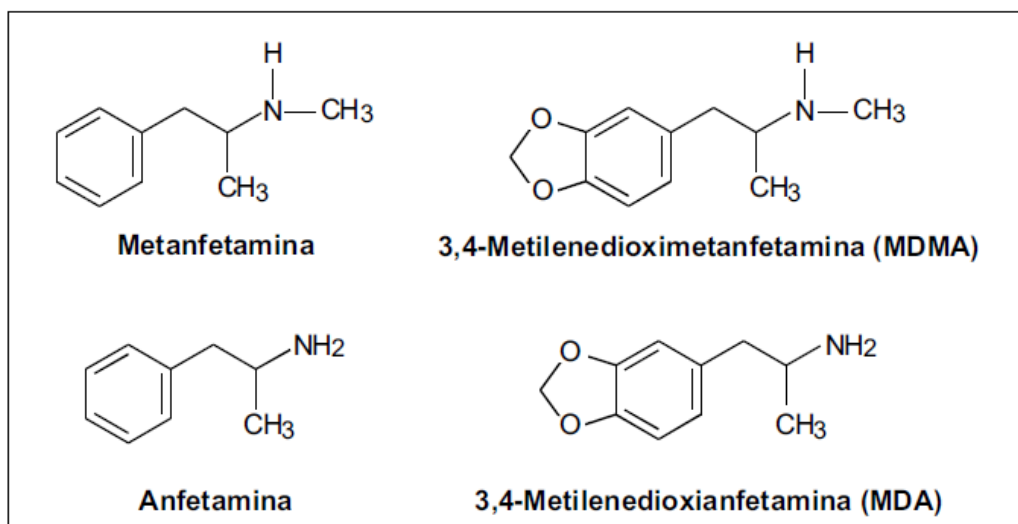


Fig. 1: Estrutura química da anfetamina e de alguns dos seus análogos metilados: metanfetamina (MA), MDMA e MDA (Silva e Tavares, 1999).

A utilização destes psicoestimulantes, especialmente da “ecstasy” é, então, na sua maioria, como droga de abuso e associada a contextos recreativos onde os jovens se reúnem, como por exemplo: eventos de dança – “raves”, festivais de música e discotecas. As estimativas do consumo de drogas nestes ambientes tende a ocorrer aos fins-de-semana e durante o período de férias (OEDT, 2006).

A saúde e segurança das pessoas que frequentam este tipo de locais propícios ao consumo assumem uma preocupação crescente de saúde pública. Iniciativas como a “dança segura”, desenvolvida no Reino Unido, tornaram-se uma ferramenta importante neste domínio, no entanto, enquanto 12 países europeus já declararam ter desenvolvido tais iniciativas para locais de diversão nocturna, apenas a Holanda, Reino Unido, Eslovénia e Suécia relatam que estas são cumpridas e monitorizadas (OEDT, 2006).

Neste sentido, foram elaboradas, por especialistas, medidas de segurança nocturna que têm como objectivo serem empregues nos países europeus de modo a reduzir a possibilidade de ocorrerem problemas relacionados com o consumo destas drogas. Assim sendo, estas incluem: acesso livre a água fria; disponibilidade imediata de primeiros socorros; trabalho de prevenção e sensibilização. Todas elas são medidas simples para prevenir e/ou reduzir os riscos de saúde causados pelo uso de drogas em locais de diversão nocturna (OEDT, 2006).

Infelizmente, de acordo com relatórios existentes, a aplicação destas medidas é limitada e não ocorre de igual forma em todos os países europeus.

No âmbito clínico, existem anfetaminas que são utilizadas no tratamento de doenças, tais como: Distúrbio com Défice de Atenção e Hiperactividade (ADHD); da Narcolepsia e da Obesidade, isto apesar de se ter conhecimento do risco elevado de dependência e neurotoxicidade que provocam (Advokat, C., 2007).

2. Perspectiva Histórica

Há cerca de 5 milénios que as propriedades estimulantes da efedrina, alcalóide extraído da planta *Ephedra vulgaris*, eram reconhecidas e descritas pela medicina chinesa (Cho, 1990).

No final do séc. XIX, os efeitos da utilização da efedrina em asmáticos levaram à popularização da sua prescrição no mundo ocidental e crescente procura desta substância. Desta forma foi ponderada a possibilidade de escassez da oferta de *Ephedra vulgaris* no mercado.

Assim sendo, foram desenvolvidas várias linhas de investigação com o objectivo de obter de forma sintética a efedrina (Silva e Tavares, 1999).

Por outro lado, ainda no final do séc. XIX, já tinha sido sintetizada a d-anfetamina que fora, mais tarde, utilizada por Gordon Alles e Ogata, em meados dos anos 30 (séc. XX), como precursor na tentativa de obter a efedrina de forma sintética.

Contudo, ambas as tentativas falharam, mas Gordon Alles reconheceu as propriedades estimulantes da d-anfetamina, que testou em animais e posteriormente nele próprio. Por sua vez, Ogata, apesar de ter falhado o objectivo, obteve resultados diferentes, sintetizou hidrocloreto de d-fenilisopropilmetilamina, também designada de metanfetamina (MA) (Cho, 1990).

Paralelamente, na Alemanha, em 1912, foi sintetizada e patenteada pela primeira vez a 3,4 – metilenodioximetanfetamina (MDMA), vulgarmente designada de “ecstasy”, pela empresa farmacêutica Merck que a designou de “metilsafrilamina”.

Nessa altura, a utilização de MDMA não tinha como objectivo a terapêutica, mas sim ser utilizada como precursora de compostos activos a serem usados em terapia.

Freudenmann e colaboradores (2006), após a avaliação dos arquivos da empresa Merck, que esta não tinha qualquer intenção de usar a MDMA como inibidor do apetite, apesar de ter sido muitas vezes e erradamente descrito por vários autores.

Os primeiros testes farmacológicos aprovados, relativamente á MDMA, ocorreram no ano de 1927 nos laboratórios da Merck, sendo testada novamente, mais tarde, em 1959 mas apenas em animais (Freudenmann et al., 2006).

A partir de 1932, após a realização de alguns ensaios clínicos, a anfetamina e a metanfetamina começaram a substituir a efedrina como broncodilatadores (Methedrine[®], Hiropon[®], Benzedrine[®]) tendo-se revelado eficazes descongestionantes nasais.

Durante a II Guerra Mundial foram distribuídas doses de anfetaminas, quer às tropas dos Aliados, quer às tropas japonesas com o objectivo de aumentar a resistência, desempenho e estado de alerta dos soldados, uma vez que lhes reduzia o apetite, aumentava os reflexos e permitia que se agentassem com poucas horas de sono, ou até sem dormir.

No final da guerra, o excedente da produção de anfetaminas foi colocado à disposição da população civil e só em meados dos anos 40 é que surgiram disposições legais limitando a distribuição deste psicoestimulante. Contudo, a anfetamina continuava a ser comercializada sob várias formas aos consumidores.

A observação de efeitos anorexiantes nos consumidores levaram ao início da prescrição destas substâncias para emagrecimento, bem como começou a ser utilizada no tratamento da depressão e fadiga. Nos anos 50, camionistas e estudantes em época de exames utilizavam anfetaminas numa perspectiva mais funcional do que recreativa (Silva e Tavares, 1999).

Como consequência da fama crescente que a substância vinha a demonstrar, e uma vez divulgadas as suas propriedades estimulantes, a anfetamina começou a ser consumida em grande escala, principalmente no Reino Unido, Estados Unidos e nos países do norte

da Europa para fins recreativos. A estimativa do consumo de anfetaminas como droga de abuso em fase compulsiva era de 30gr/dia.

Entretanto, no final da década de 50, ocorreu uma progressiva substituição da anfetamina por outras substâncias, o que provocou a queda da produção legal. Como consequência a produção ilegal inundou o mercado (Silva e Tavares, 1999).

A toxicidade da MDMA foi avaliada no ano de 1953, juntamente com outros compostos similares, na Universidade de Michigan. Este projecto era ultra-secreto e fazia parte de um programa de investigação financiado pelo exército dos EUA, provavelmente como parte de um programa de guerra química.

Esta investigação, tendo em conta os efeitos tóxicos e comportamentais observados, foi encerrada em 1969 e publicada em 1973 (Pentney, 2001).

O consumo de “ecstasy” como droga de abuso para fins recreativos, apareceu pela primeira vez, nos EUA, nos anos 70 (Siegel, 1986).

No ano de 1976, a MDMA foi usada, clinicamente, pela primeira vez por Leo Zeff como adjuvante em tratamento psiquiátrico. Shulgin, um químico da Califórnia, considerado por alguns como o “pai da ecstasy”, sintetizou e testou a droga tendo sido o primeiro a descrevê-la como uma droga capaz de produzir efeitos psicoactivos em humanos (Shulgin e Nichols, 1979).

Ambos, Shulgin e Leo Zeff, decidiram apresentar a MDMA a terapeutas profissionais como um bom adjuvante em psicoterapia (Pentney, 2001).

Os primeiros psicoterapeutas a utilizar a MDMA aperceberam-se da sua potencialidade como droga recreativa e consequente possibilidade de abuso. Fizeram, então, um acordo de desenvolver pesquisas informais sem chamar a atenção do público para a droga. Conseguiram fazê-lo durante um certo tempo, e o período entre 1977 e 1984 foi considerado a “época de ouro” da pesquisa terapêutica com a MDMA (Almeida e Silva, 2000).

No início da década de 80, é que surgiu grande interesse por esta substância, mais de mil psicoterapeutas privados, nos EUA, usavam a MDMA designando-a, na sua prática clínica, de “ADAM”, com o objectivo de reduzir a ansiedade e atitudes de defesa (Mckenna e Peroutka, 1990; Pentney, 2001).

Acreditava-se que a MDMA aumentava a auto-estima e facilitava a comunicação com o doente durante as sessões de terapia. Desta forma, nesta prática clínica, eram administradas oralmente doses entre 75 – 175mg de MDMA tendo-se verificado que causava efeitos simpaticomiméticos imediatos, tais como o aumento o ritmo cardíaco e pressão arterial, bem como causava ansiedade (Greer e Strassman, 1985; Grinspoon e Bakalar, 1986).

Paralelamente, no ano de 1977, no Reino Unido a MDMA foi classificada como droga de classe A e grau I, significando que é ilegal produzir, vender ou fornecer (Capela et al., 2009).

Nos EUA, no início dos anos 80, esta droga já possuía grande popularidade nas ruas como droga recreativa, “droga de diversão” que era “ótima para dançar”. Em São Francisco, os “vendedores de rua” (“*Dealers*”) vendiam ilegalmente a substância pelo nome de “ecstasy”, nome que foi inventado pelos traficantes para fins comerciais (Pentney, 2001).

Como consequência desta grande adesão por parte dos consumidores nos EUA, no ano de 1985 a “Drug Enforcement Administration” classificou 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). Mas, esta classificação foi severamente criticada por alguns psicoterapeutas quando estes se aperceberam que a sua pesquisa e uso clínico da substância não podia continuar (Capela et al., 2009).

Mesmo assim, hoje em dia, alguns ainda argumentam que a MDMA pode ter aplicação clínica, tal como têm outras substâncias psicadélicas. A MDMA tem vindo a ser

estudada com o objectivo de ser utilizada tratamentos da ansiedade e stress pós-traumático, apenas por psicoterapeutas devidamente habilitados e treinados. Contudo, devido à elevada incidência de casos de toxicidade reportados provocados pelo consumo e a elevada tendência em ser usada como droga de abuso, Capela e colaboradores afirmam que, não existe aplicação clínica segura para a MDMA (Capela et al., 2009).

A fama da MDMA nos EUA, rapidamente se espalhou do outro lado do Atlântico. A “ecstasy” surgiu com o nascimento das “Acid-House Parties” no resort turístico espanhol em Ibiza. No verão de 1986, Ibiza era popularmente conhecida por ser a “XTC Island” (“XTC” – um dos nomes de rua atribuídos à MDMA) (Pentney, 2001).

Como consequência, a popularidade do uso desta droga para fins recreativos cresceu, uma vez que os turistas e Dj’s que por lá passavam (Ibiza), ao regressarem a casa, divulgavam a sua fama, o que levou ao início da sua utilização em outros países europeus (Norte e Centro principalmente), bem como em outras partes do mundo.

Paralelamente, nessa altura, nasceu o conceito de “rave” (evento de dança) no Reino Unido, que se alastrou pela Europa e permanece activo hoje em dia, o que levou a que a MDMA fosse considerada, na Europa, uma substância ilegal (Morton, 2005).

A MDMA era e é consumida, na maioria, sob a forma de comprimidos. Inicialmente, a composição dos comprimidos, correspondia de facto a MDMA, mas a generalização do consumo e o aumento da procura levou a que a sua composição fosse adulterada. A realização de análises a vários tipos de comprimidos de “Ecstasy” revelou a presença de vários contaminantes e substâncias psicoactivas (Wolff et al., 1995).

Assim sendo, em alguns dos comprimidos foi detectada a presença, conjunta ou isolada, de MDMA, cafeína, anfetamina, metanfetamina (MA), 3,4 – metilenodioxietanfetamina (MDEA), paracetamol e cetamina. Esta última substância é um antagonista dos receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), cujos efeitos laterais consistem, entre outros, em alucinações, “sonhos vividos” e delírio, sintomas que se assemelham aos sentidos em algumas patologias do foro psíquico (Krystal et al., 1994).

Desta forma, é evidente a imprevisibilidade dos efeitos decorrentes do consumo de comprimidos de “Ecstasy”, uma vez que a sua composição pode ser extremamente variável. No entanto, hoje em dia o problema da contaminação dos comprimidos de “Ecstasy” com outras substâncias é menor (OEDT, 2009).

Em suma, na Europa até aos anos 80, o consumo de anfetamina e seus derivados como drogas de abuso para fins recreativos era raro, à exceção dos países nórdicos e Reino Unido. Entretanto, no final da década de 80 e no decurso dos anos 90, vários países europeus reportaram o aumento da popularidade das anfetaminas e da “Ecstasy”, principalmente entre as camadas mais jovens da população, associada à frequência de discotecas e “raves”, explorando as suas características estimulantes e de indução de euforia (Silva e Tavares, 1999).

3. Epidemiologia

A nível global, a União Europeia permanece como o principal centro de produção ilegal, contudo, este facto tem vindo a diminuir, uma vez que a produção clandestina de MDMA se alastrou por outras partes do mundo nos últimos anos, principalmente, no Norte da América, Este e Sudoeste Asiático.

Mesmo assim, cerca de 80% da MDMA é produzida ilegalmente por laboratórios clandestinos localizados no Centro da Europa, principalmente na Holanda e Bélgica (Capela et al., 2009).

De acordo com os dados revelados pelo Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência (OEDT), a prevalência do uso de anfetaminas, na Europa, varia entre países de zero para 11,7% na população adulta (15-64 anos). Em média estima-se que 3,5% dos adultos europeus consumiram anfetaminas pelo menos uma vez.

As estimativas indicam que cerca de 12 milhões de europeus já experimentaram anfetaminas, e cerca de 2 milhões usaram a droga no último ano (OEDT, 2009).

Entre os jovens adultos (15-34 anos), a prevalência do uso de anfetaminas varia, consideravelmente, entre os diversos países apresentando valores que vão desde 0,1% para 15,3%, apresentando uma média ponderada de 5%. Estima-se que, em média, 1,1% dos jovens europeus consumiram anfetaminas no último ano (estimativas de prevalência na Europa baseadas em médias ponderadas dos inquéritos nacionais mais recentes realizados entre 2001 e 2008) (OEDT, 2009).

Relativamente à MDMA (“ecstasy”), propriamente dita, estima-se que cerca de 10 milhões de adultos europeus já experimentaram “ecstasy” (3,1 % em média) e que cerca de 2,5 milhões a consumiram no último ano. Pesquisas recentes sugerem que entre 0,3% e 7,5% de todos os adultos (15-64 anos) já experimentaram a droga e, como na maioria das outras drogas ilícitas, o consumo é muito maior entre os homens do que entre as mulheres (OEDT, 2009).

Contudo, o consumo de “ecstasy” é mais comum entre os jovens adultos (15-34 anos). Estima-se que 7,5 milhões de jovens europeus (5,6% em média) já experimentaram a droga. As estimativas de prevalência, quando se restringe a faixa etária (15-24 anos), são ainda maiores variando entre 0,4% e 18,7%, embora, na maioria dos países varie entre 2,1% e 6,8%.

Assim sendo, os consumidores de “ecstasy” encontram-se entre os grupos mais jovens, e frequentemente relatam o uso concomitante de outras substâncias, incluindo cannabis, cocaína, álcool e outras anfetaminas (estimativas de prevalência europeia baseadas em médias ponderadas dos inquéritos nacionais mais recentes realizados entre 2001 e 2008) (OEDT, 2009).

A nível nacional, os resultados de vários estudos epidemiológicos realizados na última década, demonstram que a “ecstasy” tem vindo a ganhar visibilidade, surgindo nos estudos mais recentes, em contextos da população geral, como a terceira droga com maiores prevalências de consumo. Em populações escolares, os estudos nacionais mais recentes apontam para uma diminuição do consumo. Contudo, entre 2001 e 2007 adquiriu maior relevância nos consumos da população reclusa (IDT, 2008).

No segundo *Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoactivas na População Geral*, realizado em Portugal em 2007, decorridos seis anos da realização do primeiro, a “ecstasy” surgiu como a terceira droga preferencialmente consumida pelos portugueses, quer na população total (15-64 anos), quer na população jovem adulta (15-34 anos). Entre 2001 e 2007 registou-se um aumento das prevalências de consumo de “ecstasy” ao longo da vida na população total (0,7% para 1,3%) e na jovem adulta (1,4% para 2,6%). Contudo, verificou-se uma diminuição das taxas de consumo entre 2001 e 2007, tanto na população total (53,5% para 32,7%) como na jovem adulta (59,8% para 35,1%) (IDT, 2008).

A análise por género evidência prevalências de consumo de “ecstasy” mais elevadas no grupo masculino do que no grupo feminino, embora o grupo feminino apresente taxas de continuidade do consumo mais elevadas (IDT, 2008).

Em 2007, a nível do ESPAD – European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs - (alunos de 16 anos), a “ecstasy” registou uma prevalência de consumo ao longo da vida idêntica à da maioria das outras substâncias ilícitas que não cannabis, contrariamente ao sucedido em 2003, em que surgiu como a segunda substância ilícita com maior prevalência de consumo, constatando-se entre 2003 e 2007 uma descida na prevalência de consumo ao longo da vida (4% em 2003 e 2% em 2007) (IDT, 2008).

Também, ao nível do ECATD – Estudo sobre o Consumo de Álcool, Tabaco e Droga – (alunos dos 13 aos 18 anos), apontam para uma diminuição da importância do consumo de “ecstasy” relativamente a outras substâncias ilícitas nas populações escolares, surgindo em 2007 com prevalências de consumo ao longo da vida inferiores às da cocaína e inferiores ou iguais às de outras anfetaminas em quase todas as idades, excepto nos alunos de 18 anos em que ainda surge como a segunda substância ilícita com maior prevalência de consumo (IDT, 2008).

De um modo geral, as prevalências de consumo de “ecstasy” variam na razão directa da idade (0,9% nos alunos de 13 anos de e 4% nos alunos de 18 anos). Entre 2003 e 2007 verificou-se uma tendência para a descida destas prevalências de consumo, particularmente entre os alunos mais novos. Tal como o sucedido em 2003, também em 2007 os resultados do ECATD relativos às percepções do consumo regular “ecstasy” indicavam que o risco desse consumo aumentava com a idade, mas a dificuldade de abandonar esse consumo variava na razão inversa da idade. Assim sendo, o “ecstasy” foi percebido como uma das drogas cujo consumo regular tem menor risco e é mais fácil de abandonar (IDT, 2008).

No estudo nacional *Drogas e Prisões: Portugal 2001 – 2007*, a “ecstasy” surgiu em 2007, entre a população reclusa, com prevalências de consumo superiores às de outras anfetaminas, quer no contexto anterior à reclusão, quer no de reclusão. Foi a única substância ilícita que registou, entre 2001 e 2007, um aumento na prevalência de consumo ao longo da vida (17% em 2001 e 19,9% em 2007). Verificou-se então, no contexto de reclusão, um aumento do consumo regular de “ecstasy” (<0,1% em 2001 e 0,3 % em 2007) (IDT, 2008).

No âmbito da procura de tratamento, em 2008 a “ecstasy” foi referido como droga principal por 0,1% dos utentes em ambulatório na rede pública de tratamento da Toxicodependência, e por 0,2% dos novos utentes nesta rede, assumindo um pouco mais de visibilidade como droga secundária. Apesar de pouco expressivas nas estruturas de tratamento da Toxicodependência, estas referências à “ecstasy” enquanto droga principal, continuam a ser superiores às de outras anfetaminas (IDT, 2008).

Relativamente às percepções de mercado, a nível do projecto do ECATD (alunos dos 13 aos 18 anos), tanto nos resultados de 2003 como nos de 2007, a “ecstasy” foi considerado de menor acessibilidade do que a cannabis. Entre 2003 e 2007 registou-se um aumento percentual de alunos a referirem ser “muito difícil arranjar ecstasy” (IDT, 2008).

Desta forma, a “ecstasy” continua a apresentar valores pouco expressivos e a diminuir a sua visibilidade no mercado nacional. Em 2008 registaram-se 88 apreensões de “ecstasy”, apresentando o valor mais baixo desde 2001 e um decréscimo de – 20% em relação ao ano anterior. Também em 2008, o preço médio por comprimido de “ecstasy” apresenta o seu valor mais baixo desde 2002, verificando-se uma tendência para descer desde essa data (2,80 euros/comprimido em 2008) (IDT, 2008).

4. Mecanismo de Acção das Anfetaminas

As anfetaminas são substâncias com um coeficiente de partilha óleo-água, que lhes confere a capacidade de atravessar facilmente os tecidos, incluindo as barreiras biológicas (barreira hemato-encefálica (BHE) e a barreira placentária) (Silva e Tavares, 1999).

Estas, afectam as funções do Sistema Nervoso Central (SNC) e do Sistema Nervoso Periférico (SNP) actuando, principalmente, no sistema monoaminérgico promovendo a libertação de monoaminas (neurotransmissores), o que produz um estado excitatório (Advokat, 2007).

As monoaminas são neurotransmissores simpáticos, nomeadamente a serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NA), sendo as duas últimas catecolaminas. Estes neurotransmissores, em condições fisiológicas normais, são libertados no terminal neuronal para a fenda sináptica com a chegada de um potencial de acção. Posteriormente, podem ser recaptados no terminal neuronal através de sistemas de transporte que funcionam em série. Um recapta as monoaminas para o interior do terminal e, no interior da célula neuronal, outro transporta-as para o interior de vesículas, onde permanecem armazenados em grandes quantidades. Este último é designado de transportador vesicular das monoaminas – Vmat (Advokat, 2007; Capela, 2009).

A anfetamina e seus derivados, apesar de produzirem efeitos psicoestimulantes comuns, originam efeitos funcionais e neuroquímicos são distintos (Silva e Tavares, 1999).

A anfetamina propriamente dita, produz efeitos mais acentuados em neurónios dopaminérgicos, uma vez que possui maior afinidade para os transportadores de dopamina (DAT). Por sua vez, a MDMA possui maior afinidade para neurónios serotoninérgicos devido a possuir o anel metilendioxi na sua estrutura química. A presença deste anel faz com que a afinidade de ligação aos transportadores serotoninérgicos (5-HTT) aumente, enquanto reduz a sua afinidade de ligação aos transportadores dopaminérgicos (DAT) e noradrenérgicos (NET) (Capela et al., 2009).

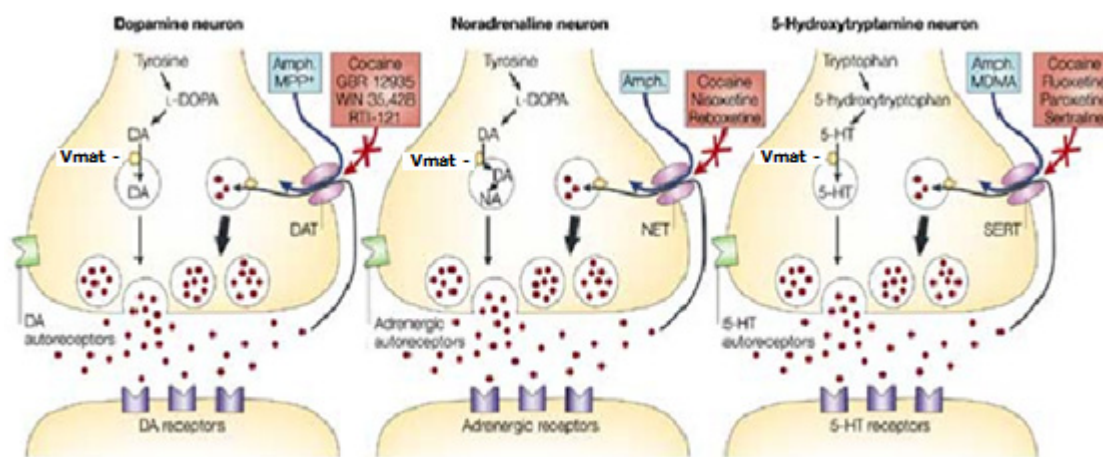


Fig. 2: Sistema monoaminérgico (consultado em <http://www.nature.com/nrn/journal/v4/n1/images/nrn1008-f1.jpg>)

4.1. Mecanismo de Acção da Anfetamina

A anfetamina bloqueia os transportadores existentes no terminal neuronal, responsáveis pela recaptação das monoaminas, em particular, os transportadores de dopamina (DAT). Esta inibição da recaptação neuronal de dopamina, provoca um aumento do tempo de permanência destes neurotransmissores na fenda sináptica (Advokat, 2007).

Para além deste bloqueio, a anfetamina, quando se encontra em altas concentrações, possui a capacidade de atravessar a membrana celular do terminal neuronal por difusão e, uma vez no interior da célula, interage com os transportadores vesiculares das monoaminas (Vmat) bloqueando-os, bem como promove a libertação da dopamina lá armazenada para o citoplasma (Advokat, 2007; Capela et al., 2009).

Finalmente, e não menos importante, a anfetamina também possui a capacidade de inibir a enzima monoamina oxidase (MAO) que é responsável pela degradação das monoaminas regulando a sua actividade. Então, uma vez inibida a MAO, estes neurotransmissores permanecem em actividade durante mais tempo, bem como passam a estar disponíveis em quantidades anormalmente elevadas (Advokat, 2007; Capela et al., 2009).

Como consequência, a concentração citoplasmática de dopamina vai aumentar de tal forma o que leva à sua libertação para a fenda sináptica por transporte reverso através dos DAT. Esta libertação não necessita de estimulação prévia para ocorrer, bem como ocorre em períodos de inactividade (Advokat, 2007; Capela et al., 2009).

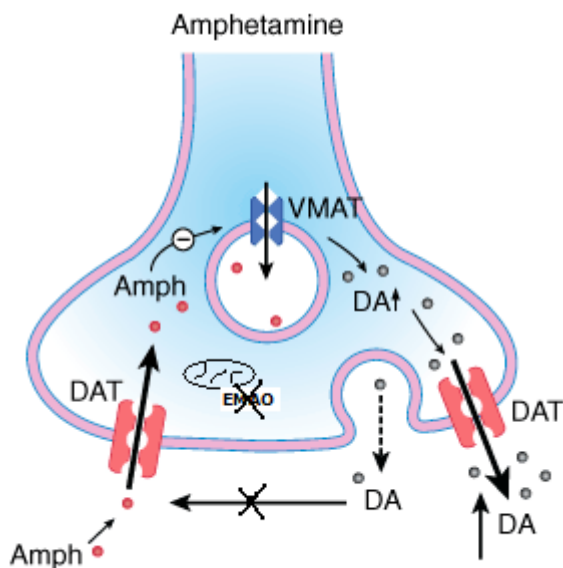


Fig. 3: Mecanismo de Acção da Anfetamina (consultado em http://basic-clinical-pharmacology.net/chapter%2032_%20drugs%20of%20abuse.htm)

4.2. Mecanismo de Acção da MDMA

A MDMA possui um mecanismo de acção muito similar ao da anfetamina. Esta bloqueia os transportadores responsáveis pela recaptação das monoaminas, nomeadamente, os transportadores de noradrenalina (NET), dopamina (DAT) e serotonina (5-HTT), o que provoca um aumento da quantidade de noradrelanina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) disponível na fenda sináptica. No entanto, a MDMA produz efeitos mais acentuados nos neurónios serotoninérgicos por possuir maior afinidade para os 5-HTT, bem como é agonista dos receptores pós-sinápticos da serotonina, os 5-HT_{2A} (Capela et al., 2009).

Tal como a 5-HT, a MDMA é um substrato dos 5-HTT, desta forma para além de bloquear os 5-HTT inibindo a recaptação de serotonina, pensa-se que a MDMA utiliza esses mesmos transportadores para se deslocar para o interior do terminal serotoninérgico. Para além disso, a MDMA, quando presente em quantidades elevadas, consegue atravessar a membrana celular dos terminais serotoninérgicos por difusão. Uma vez no interior da célula, a MDMA interage com os Vmat bloqueando-os, impedindo o armazenamento de serotonina em vesículas, bem como utiliza esses mesmos transportadores (Vmat) para se deslocar para o interior das mesmas provocando a libertação de toda a 5-HT que lá se encontrava armazenada, para o citoplasma (Capela et al., 2009).

Ainda no interior da célula, a MDMA também vai interagir com a TPH e com a MAO-B. A TPH é a enzima que limita a produção de 5-HT, e na presença de MDMA esta é inibida, o que significa que esta deixa de estar disponível para controlar a síntese de 5-HT. (Schmidt e Taylor, 1987). Relativamente à MAO-B, esta é responsável pela metabolização (degradação) das monoaminas como já foi dito, sendo a sua actividade parcialmente inibida pela MDMA.

Todos estes efeitos, nomeadamente, o bloqueio dos Vmat, a inibição da TPH e inibição da MAO-B vão produzir um aumento, anormalmente elevado, na concentração citoplasmática de 5-HT, o que leva à sua libertação para a fenda sináptica por transporte reverso através dos 5-HTT. Assim sendo, a concentração de 5-HT na fenda sináptica vai

aumentar significativamente, passando a estar presente em quantidades anormalmente elevadas (Capela et al., 2009).

Por outro lado, a MDMA actua directamente como agonista dos receptores de 5-HT do tipo 2A (5-HT_{2A}), o que lhe confere propriedades alucinogénicas, uma vez que é actualmente aceite que as substâncias alucinogénicas exercem os seus efeitos através da activação deste tipo de receptores (Nichols, 2004).

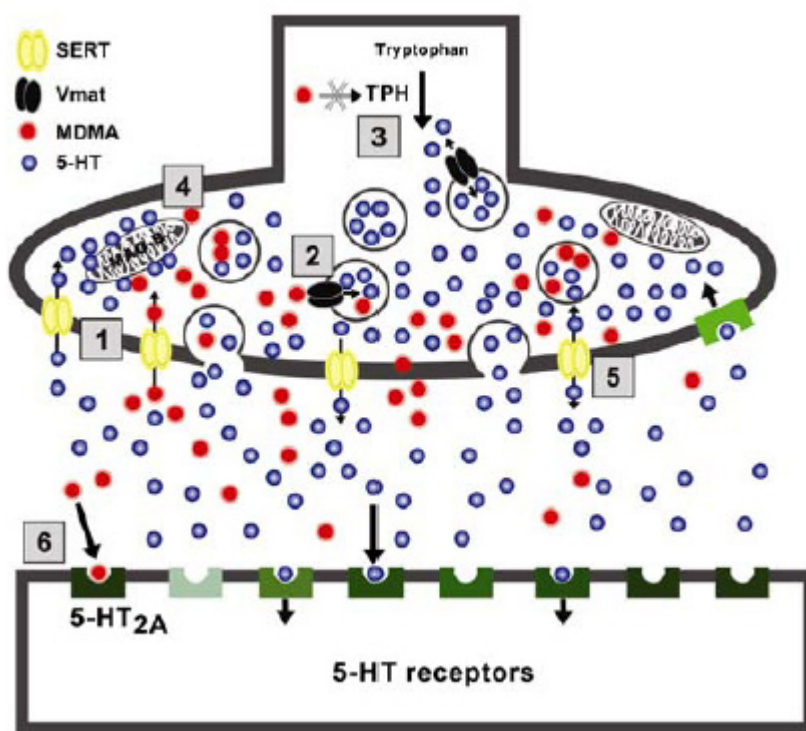


Fig. 4: Mecanismo de Ação da MDMA, retirado de Capela et al., 2009

5. Farmacocinética

As anfetaminas são substâncias que possuem, de uma forma geral, baixa ligação às proteínas plasmáticas (<20%). Esta baixa ligação significa que a sua biodisponibilidade é próxima dos 100%, ou seja, a droga está praticamente na sua totalidade disponível no plasma, podendo difundir-se para o espaço extravascular, distribuindo-se pelos tecidos (de la Torre et al., 2004; de la Torre et al., 2000).

Tal como outros derivados da anfetamina, a MDMA é uma base fraca apresentando um pK_a de 9.9, baixo peso molecular e grande volume de distribuição (de la Torre et al., 2004). São estas propriedades que conferem à MDMA a facilidade em difundir-se através das membranas celulares, camadas lipídicas e barreiras biológicas, bem como pode difundir-se para tecidos e matrizes desde que possuam um pH inferior ao do sangue (de la Torre et al., 2004; de la Torre et al., 2000).

Cerca de 80% da MDMA consumida é metabolizada pelo fígado, e cerca de 20% é excretada através da urina sem sofrer alteração (metabolização). A velocidade de excreção urinária de MDMA, após a administração de diferentes doses é constante (de la Torre et al., 2004).

Tanto nos humanos como nos ratos, a MDMA é principalmente metabolizada no fígado pela acção de isoenzimas do citocromo P450 (CYP).

Nos humanos, a principal via metabólica inclui a O-desmetilação dando origem ao catecol 3,4-dihidroximetanfetamina (HHMA, N-metil- α -metildopamina, N-Me- α -MeDA), reacção catalisada principalmente pela isoenzima CYP2D6. De seguida ocorre a O-metilação com a formação de 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA, 3-O-Me-N-Me- α -MeDA), reacção catalizada pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) (Kreth et al., 2000).

Foi já demonstrado que a contribuição das isoenzimas hepáticas CYP2D6 para a O-desmetilação é cerca de menos de 60% para esta etapa na metabolização, pois existem

outras isoenzimas envolvidas nesta reacção, a CYP1A2, e em menor extensão a CYP2B6 e CYP3A4 (Kreth et al., 2000).

Em menor quantidade, nos humanos, a MDMA é N-desmetilada a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), reacção catalisada principalmente pela CYP2B6, de seguida a MDA é O-desmetilada originando o catecol intermediário 3,4-dihidroxianfetamina (HHA, α -metildopamina, α -MeDA,), reacção catalisada principalmente pela CYP2D6. Finalmente segue-se a O-metilação com a formação de 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA, 3-O-Me- α -MeDA), reacção catalisada pela COMT (Capela et al., 2009).

Como já foi dito, a etapa da O-desmetilenação nos humanos é catalisada principalmente pela isoenzima hepática CYP2D6 (possui elevada afinidade para concentrações baixas de substracto -MDMA). As outras isoenzimas envolvidas nesta reacção são a CYP1A2 (possui elevada afinidade para concentrações elevadas de substracto) e em menor extensão as isoenzimas CYP2B6 e a CYP3A4 (Kreth et al., 2000).

A actividade da CYP2D6, apresenta uma grande variabilidade interindividual, devida ao polimorfismo genético que influencia a expressão e funcionamento da mesma (Zanger, Raimundo e Eichelbaum, 2004; Carmo et al., 2006). Cerca de 5 a 9% da população caucasiana possui esta enzima com actividade metabólica diminuída, o que significa que estes indivíduos são metabolizadores pobres e, portanto, poderão ser mais susceptíveis aos efeitos agudos da MDMA, uma vez que esta quase não sofre metabolização. Por outro lado, este facto torna-os menos vulneráveis aos seus efeitos por administração repetida (efeitos neurotóxicos), dado que a produção de metabolitos tóxicos está diminuída. Esta pode ser a explicação para a diferença de susceptibilidade aos efeitos tóxicos da MDMA em diferentes indivíduos (Kreth et al., 2000).

Ao comparar o metabolismo da MDMA em humanos e animais de experiência, verifica-se que as principais reacções metabólicas são similares de uma forma qualitativa. Contudo, a velocidade e importância destas vias metabólicas apresentam diferenças quantitativas (de la Torre e Farre, 2004).

Enquanto que nos ratos a N-desmetilação da MDMA, que leva à formação de MDA, é a via metabólica mais usual para baixas doses (Chu et al., 1996), nos humanos a O-desmetilação, que leva à formação de N-Me- α -MeDA, é a via que predomina em qualquer dose testada (de la Torre et al., 2000).

Estudos em ratos, sugeriram que a N-Me- α -MeDA (HHMA) e a α -MeDA (HHA) podem sofrer oxidação dando origem às correspondentes orto-quinonas, que por sua vez podem formar aductos com a glutathione (GSH) e com outros compostos que contenham o grupo tiol. Estes conjugados com a GSH permanecem redox activos e, como já foi demonstrado em ratos, podem voltar a formar um novo conjugado, o 2,5-bis-glutationil, após a adição de uma segunda molécula de GSH (Hiramatsu et al., 1990; Capela et al., 2007b; Capela et al., 2006b).

A formação sistémica destes conjugados no fígado é seguida da sua distribuição para outros órgãos, e a sua absorção por parte do cérebro está bem estabelecida (Jones et al., 2005). Por outro lado, estes conjugados podem sofrer metabolização via ácido mercaptúrico, através da acção da γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) e dipeptidase originando conjugados com a cisteína. Por fim, estes conjugados com a cisteína sofrem metabolização pela acção da N-acetyltransferase dando origem a conjugados com a N-acetylcisteína (NAC) (Jones et al., 2005; Capela et al., 2007b; Capela et al., 2006b).

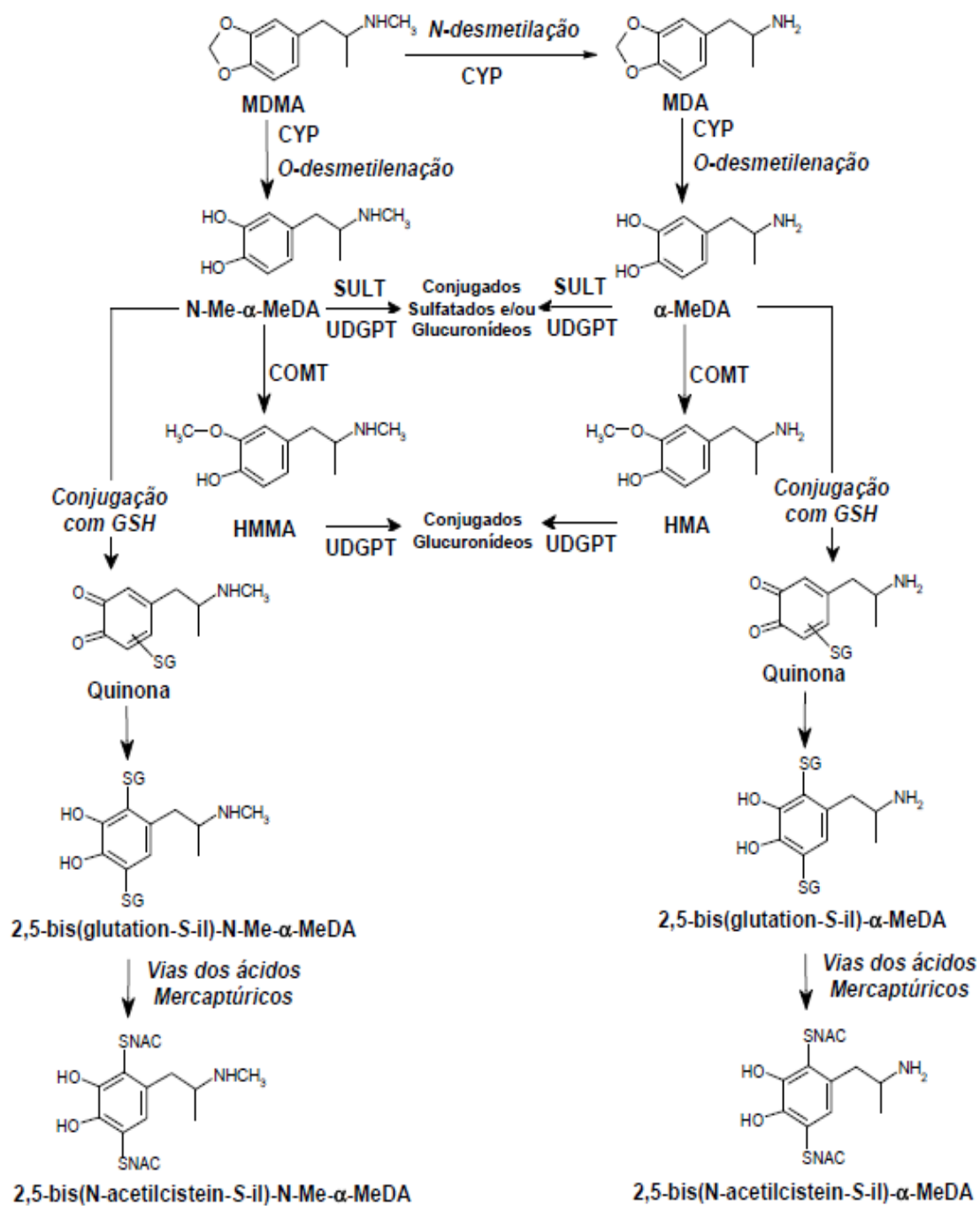


Fig. 5: Principais vias do metabolismo e metabolitos da MDMA, adaptado de Capela et al., 2009).

6. Efeitos Agudos em Humanos

A “ecstasy” tornou-se famosa como droga recreativa, principalmente, em ambientes de diversão nocturna, devido às suas propriedades que podem ser traduzidas na expressão dos “3 Es”: energia, empatia e euforia (Hall e Henry, 2006).

Estudos em humanos sobre os efeitos comportamentais e psicológicos da MDMA (administração oral de doses entre 50 e 150 mg) demonstraram que, os principais efeitos observados resultam da acção da MDMA ao nível do SNC traduzindo-se por aumento do estado de vigília e alerta, grande euforia, sensação de bem-estar e redução de pensamentos negativos, aumento da capacidade de introspecção e reflexão, sentimentos de confiança, empatia e proximidade para com os outros, aumento do interesse sexual e hiperactividade motora. Os efeitos adversos que ocorrem após a ingestão subaguda de MDMA incluem anorexia, perda de apetite, diminuição da capacidade visual e auditiva, irritabilidade, ataques de pânico, depressão, alucinações visuais e paranóia, confusão e insónia. Segundo alguns consumidores, as alucinações visuais e as ilusões paranóicas podem persistir dias ou até mesmo semanas (Davison e Parrott, 1997; McCann, Slate e Ricaurte, 1996; Cole e Sumnall, 2003; Silva e Tavares, 1999).

Os principais efeitos adversos periféricos (SNP) da MDMA, resultam da sua acção simpaticomimética indirecta sobre os receptores adrenérgicos e serotoninérgicos. Estes efeitos traduzem-se num aumento da energia e da actividade física, ataxia (falta de coordenação de movimentos), urgência urinária, dores e tensão muscular aumento da pressão arterial, taquicardia, palpitações, hipertermia, visão alterada, dilatação das pupilas (midríase), xerostomia (secura na boca), bruxismo, trismo (ranger dos dentes – contracção do maxilar), broncodilatação, náusea, vómito, cefaleias, suor, e hiper-reflexia (Cohen e Cocores, 1997; Vollenweider et al., 1998; Liechti e Vollenweider, 2000b; McCann, Slate e Ricaurte, 1996; Davison e Parrott, 1997).

Outros sintomas fisiológicos que foram reportados, durante as primeiras horas, após a ingestão de MDMA incluem coagulopatia, trombocitopenia, leucocitose, acidose, hipoglicemia, edema e hepatite (Green et al., 2003).

As complicações neuropsiquiátricas que podem surgir após o abuso de MDMA são: ataques de pânico, psicoses, comportamento agressivo, transtorno perceptivo persistente (flash-backs), estados depressivos e distúrbios cognitivos e de memória (Cohen e Cocores, 1997).

Outros efeitos tóxicos agudos graves, por vezes fatais, que podem ocorrer compreendem arritmias e colapso cardiovascular (toxicidade cardiovascular), rabdomiólise e falha de múltiplos órgãos, coagulação intravascular disseminada, hiponatremia, falha renal aguda (nefrotoxicidade), hepatotoxicidade, teratogenia, síndrome serotoninérgico e morte súbita. Podem, também, ocorrer efeitos neurológicos fatais após a ingestão de MDMA, como hemorragia subaracnóide, hemorragia intracraniana, enfarte cerebral e trombose venosa cerebral. Estas complicações podem surgir devido a uma hipertensão inicial ou ao processo de desidratação. (Henry, 1992; McCann, Slate e Ricaurte, 1996; Hall e Henry, 2006).

A hipertermia representa um aspecto clínico importante nos consumidores de MDMA, uma vez que a temperatura corporal pode atingir os 43°C, após o consumo em ambientes recreativos. O uso de MDMA em locais com muita gente, com uma temperatura ambiental elevada, a intensa actividade física (dança) e a desidratação podem contribuir para o aumento da resposta hipertérmica. Por outro lado, já foi demonstrado em vários estudos que a hipertermia, resultante do consumo de MDMA, é uma das principais causas da neurotoxicidade observada. Os principais factores que contribuem para o efeito hipertérmico resultante do consumo de MDMA incluem temperatura ambiente elevada, hiperactividade motora, vasoconstrição periférica, desregulação dos mecanismos termorreguladores no SNC, desregulação dos sinais corporais de percepção (sede, exaustão) e euforia (Henry, 1992; Irvine et al., 2005)

No entanto, a hipertermia pode originar problemas toxicológicos fatais incluindo rabdomiólise, coagulação intravascular disseminada e falha renal aguda (Henry, 1992; Logan et al., 1993)

7. Neurotoxicidade em animais de laboratório

O potencial neurotóxico da MDMA tem sido alvo de estudo intenso nos últimos anos. Foi já demonstrado que a administração de MDMA, a animais de experiência, provoca depleção, a longo prazo, de marcadores neuronais serotoninérgicos, tendo-se observado um défice serotoninérgico em várias regiões do cérebro do rato, nomeadamente no córtex frontal, estriado, hipocampo e hipotálamo. A neurotoxicidade induzida pela MDMA, pode ser avaliada recorrendo a diferentes métodos, tais como a determinação dos níveis de 5-HT e do seu metabolito maioritário, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), a avaliação da actividade da triptofano hidroxilase (TPH - enzima limitante na síntese de 5-HT) e avaliando a perda de transportadores da 5-HT (5-HTT) (Battaglia et al., 1987; Commins et al., 1987; Schmidt, 1987; Stone et al., 1987b).

Maior parte dos estudos sobre a neurotoxicidade induzida pela MDMA, avaliam a diminuição dos marcadores bioquímicos da 5-HT de forma a avaliar a extensão da toxicidade (Schmidt, C., 1987). No entanto, vários estudos demonstraram que a neurotoxicidade induzida pela MDMA não se limita aos axónios dos neurónios serotoninérgicos, podendo ocorrer neurodegeneração em várias áreas cerebrais dos animais. Estudos que analisam a localização da degeneração neuronal induzida pela MDMA, encontraram neurodegeneração em diferentes áreas do cérebro como o córtex parietal, córtex insular/”perirhinal” e tálamo ventromedial/ventrolateral (Commins et al., 1987; Jensen et al., 1993; Schmued, 2003; Armstrong e Noguchi, 2004; Meyer et al., 2004; Tamburini et al., 2006).

Vários estudos têm sido realizados com o objectivo de avaliar a recuperação dos marcadores neuroquímicos serotoninérgicos em ratos, após a administração de doses neurotóxicas de MDMA. Os resultados sugerem que, em algumas regiões cerebrais, pode haver recuperação destes marcadores um ano após o tratamento com MDMA (Battaglia et al., 1988; Scanzello et al., 1993; Lew et al., 1996; Sabol et al., 1996).

Contudo, a avaliação de marcadores bioquímicos indicativos de neurodegeneração não é suficiente, sendo necessário recorrer a análises histológicas e histoquímicas para uma completa avaliação do dano neuronal. Após a administração de MDMA a ratos, análises

imunocitoquímicas revelaram uma perda dos axónios e terminais serotoninérgicos em áreas corticais e subcorticais, especialmente nas projecções do núcleo dorsal da rafe. Relativamente aos terminais serotoninérgicos e axónios que permanecem, estes aparecem fragmentados indicando dano estrutural (O’Hearn et al., 1988).

A depleção cortical de 5-HT, após a administração de uma única dose de MDMA (10mg/kg), apresenta duas fases de resposta distintas (Schmidt, 1987). A primeira fase ocorre 3 horas após a administração, verifica-se uma depleção significativa dos níveis de 5-HT atingindo, entre as 3 e as 6 horas, 16% relativamente ao controlo. De seguida, entre as 6 e as 24 horas, uma recuperação, uma vez que a concentração de 5-HT volta aos valores normais. A segunda fase ocorre uma semana após o tratamento. Os valores de 5-HT vão descendo, de forma gradual, entre o primeiro e o sétimo dia, estando reduzidos a 74% relativamente ao controlo após uma semana. Outros estudos demonstraram uma redução, dependente da dose, de 5-HT e 5-HIAA no córtex frontal durante a fase subaguda, 18 horas após múltiplas doses de MDMA (Stone et al., 1986; Battaglia et al., 1988).

Por outro lado, vários estudos demonstraram que, quando a MDMA ou o seu metabolito MDA são injectadas directamente no cérebro, não se observa neurotoxicidade serotoninérgica (Paris e Cunnigham, 1992; Esteban et al., 2001). Mesmo quando infundida no hipocampo uma dose de MDMA capaz de produzir uma concentração tecidular 4 vezes superior à observada após uma administração sistémica de uma dose neurotóxica, não se observa neurodegeneração dos terminais serotoninérgicos. Apesar de não produzir neurotoxicidade, esta administração central provoca uma libertação aguda de 5-HT (Esteban et al., 2001). Estes dados indicam que a molécula de MDMA provoca um aumento da libertação de 5-HT, enquanto a neurotoxicidade poderá ser atribuída em grande parte aos metabolitos produzidos após a administração sistémica.

Um facto que se tem destacado dos estudos realizados em ratos é que diferentes raças possuem diferente susceptibilidade, quer à toxicidade aguda, quer à neurotoxicidade induzida pela MDMA. O exemplo mais óbvio é o da raça Dark Agouti, esta requer uma dose única (10-15mg/kg) de MDMA para produzir uma perda cerebral de 5-HT de 30-50% (Colado, Williams e Green, 1995; O’Shea et al., 1998), ao contrário da raça

Sprague-Dawley, Hooded Lister e Wistar que necessitam de múltiplas doses (normalmente 20mg/kg ou mais) para sofrerem uma perda similar (Colado, Murray e Green, 1993; Aguirre et al., 1998; Shankaran e Gudelsky, 1999).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a MDMA pode induzir apoptose neuronal em neurónios corticais e cerebelares (Stumm et al., 1999; Jimenez et al., 2004). Estes trabalhos demonstraram uma morte apoptótica neuronal caracterizada por clivagem endonucleossomal do ADN e expressão diferencial de proteínas anti-apoptóticas e pro-apoptóticas (variantes bcl-XL/S) acompanhada pela activação da caspase 3 em culturas de neurónios corticais e cerebelares de ratos (Capela et al., 2006a; Capela et al., 2007a).

A prevenção da resposta hipertérmica induzida pela MDMA traduz-se numa protecção contra a subsequente perda neurotóxica de 5-HT. Hoje em dia sabe-se, que os compostos, que foram inicialmente designados como neuroprotectores, exercem esta acção devido ao efeito que têm na temperatura corporal e não por terem uma acção neuroquímica específica (Green et al., 2003). De uma forma geral, a administração de uma substância que previna a hipertermia irá produzir neuroprotecção (Colado et al., 1998).

Se assumirmos que o aumento da formação de radicais livres é um elemento chave na neurotoxicidade induzida pela MDMA, então facilmente se compreende o papel da temperatura no processo neurodegenerativo.

A formação de radicais livres no cérebro, após a administração de MDMA, encontra-se aumentada em animais hipertérmicos (Colado et al., 1998). Estes dados são consistentes com os estudos de neurodegeneração induzidos pela isquemia, onde se demonstrou que a formação de radicais livres é influenciada pela temperatura corporal (Globus et al., 1995; Kil, Zhang e Piantadosi, 1996). Contudo, pensa-se que o efeito protector da hipotermia pode ser ultrapassado se a dose de MDMA for muito elevada (Broening, Bowyer e Slikker, 1995). Presumivelmente, este facto significa que a velocidade de formação de radicais livres no cérebro é de enorme importância no processo neurodegenerativo.

Estudos de neuroprotecção demonstram que existem compostos que protegem contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA em ratos, exibindo um mecanismo não relacionado com a temperatura corporal. Os inibidores da recaptação da 5-HT, como a fluoxetina e a fluvoxamina, quando co-administrados com a MDMA, previnem totalmente a perda a longo prazo da 5-HT, sem alterar a hipertermia induzida pela MDMA (Malberg, Sabol e Seiden, L., 1996; Sanchez et al., 2001). A fluoxetina fornece total protecção, mesmo quando administrada quatro dias antes da administração de MDMA. Este efeito neuroprotector a longo prazo, deve-se à contínua presença da fluoxetina e do seu principal metabolito activo, a norfluoxetina, no cérebro. Ambos os compostos inibem o 5-HTT e podem, por isso, bloquear a entrada do metabolito tóxico da MDMA no terminal neuronal serotoninérgico (Sanchez et al., 2001).

São limitados os estudos acerca das consequências, a longo prazo, da administração de MDMA na função cognitiva dos ratos. A administração repetida de MDMA a ratos (superior a 24 dias), aumenta a intensidade de locomoção e a possibilidade de desenvolvimento da síndrome serotoninérgica comportamental (Spanos e Yamamoto, 1989). A MDMA provoca uma diminuição, a longo prazo, do comportamento cognitivo em ratos expostos durante 3 dias a um regime neurotóxico de MDMA (Marston et al., 1999). Foi também demonstrado, que a MDMA é capaz de interromper o conhecimento espacial e sequencial baseado no processo da memória (Broening et al., 2001). Enquanto a administração aguda de MDMA em ratos promove um aumento na interacção social, a administração crónica provoca um decréscimo nessa interacção (Fone et al., 2002; Bull, Hutson e Fone, 2003; Clemens et al., 2004). Num estudo, após a administração de MDMA a ratos, verificou-se a depleção de 5-HT e uma redução no receptor 5-HT_{2A}, acompanhados por um comportamento de ansiedade no teste de interacção social (Bull, Hutson e Fone, 2004). Os estudos parecem concordar no desenvolvimento, a longo prazo, de efeitos relacionados com a ansiedade após exposição à MDMA.

Está bem estabelecido que a MDMA tem um perfil neurotóxico diferente em ratos e em ratinhos. Enquanto no rato a MDMA é um neurotoxina serotoninérgica, no ratinho a MDMA é essencialmente neurotóxica para os neurónios dopaminérgicos (Stone, Hanson e Gibb, 1987a; O’Callaghan e Miller, 1994; O’Shea et al., 2001). No entanto,

dependendo da dose e da estirpe de ratinho, a MDMA pode provocar neurotoxicidade dopaminérgica e serotoninérgica. A administração de uma dose neurotóxica no ratinho Swiss-Webster provocou uma marcada depleção de 5-HT no estriado e no hipocampo, bem como provocou uma depleção nos receptores 5-HT no córtex frontal. A depleção, no estriado, de receptores de DA e, no córtex frontal, de 5-HT no ratinho é observada 82 dias após a exposição a MDMA (Itzhak et al., 2003). Além disso, a injeção directa de MDMA não produz neurotoxicidade dopaminérgica, ao contrário do que acontece quando é feita uma administração intraperitoneal (Escobedo et al., 2005).

Em primatas não humanos, a depleção serotoninérgica e o dano neuronal foram também já demonstrados, sendo estes efeitos mais pronunciados do que nos ratos. A administração de MDMA (2,5; 3,75 ou 5mg/kg) provoca uma redução, dependente da dose, de 5-HT no córtex, núcleo caudado e putâmen, hipocampo, hipotálamo e tálamo (Ricaurte et al., 1988b; Ricaurte et al., 1988c; Slikker et al., 1988; Insel et al., 1989; Ricaurte et al., 1992; Fischer et al., 1995; Hatzidimitriou, McCann e Ricaurte, 1999).

Num outro estudo, administraram-se 2,5 ou 10mg/Kg, duas vezes por dia, durante quatro dias, a macacos Rhesus, tendo-se observado uma selectiva e significativa diminuição no fluído cerebrospinal (CSF) dos níveis de 5-HIAA, e nas concentrações de 5-HT e 5-HIAA no cérebro. A dose mais elevada de MDMA (10mg/kg), também produziu uma selectiva diminuição nos locais de recaptação de 5-HT (5-HTT) (Insel et al., 1989).

Os efeitos a longo prazo da neurotoxicidade induzida pela MDMA ficam evidenciados num estudo em que macacos Squirrel apresentam uma redução da enervação serotoninérgica e dos níveis de 5-HT, sete anos após a exposição à droga (Fig. 6) (Hatzidimitriou, McCann e Ricaurte, 1999).

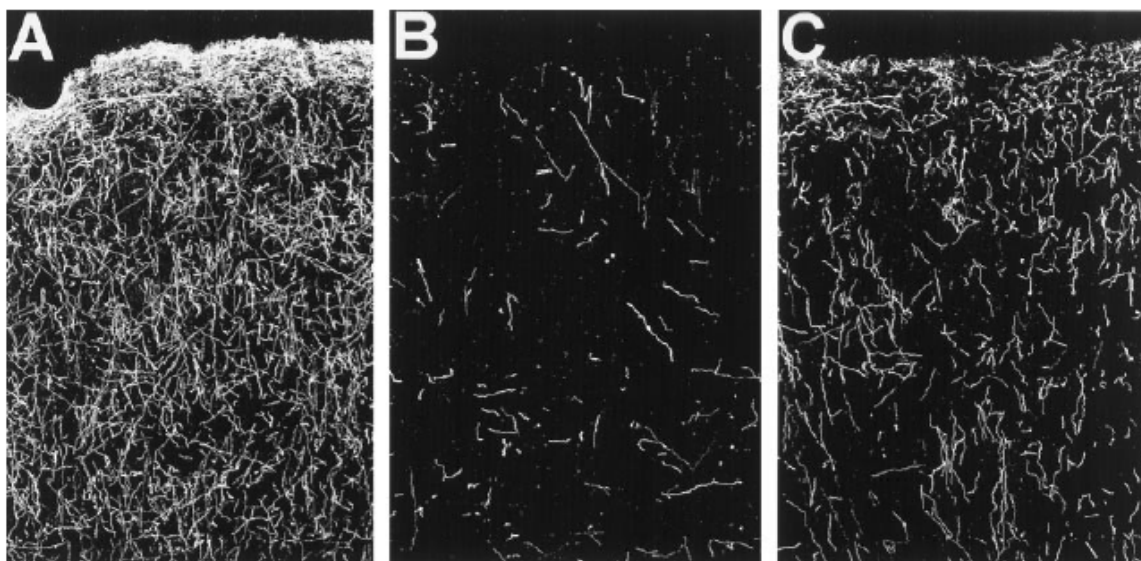


Fig. 6: Neurónios serotoninérgicos do córtex cerebral de macacos Squirrel. (A) controlo, (B) 2 semanas após a administração de MDMA (5mg/kg, duas vezes por dia, durante quatro dias consecutivos) e (C) sete anos após a administração de MDMA. É evidente a redução na densidade dos axónios 2 semanas após a exposição à MDMA e que persiste sete anos após essa exposição (Hatzidimitriou, McCann e Ricaurte, 1999).

No entanto, já foi identificada a reorganização das projecções serotoninérgicas no cérebro de primatas não humanos, o que sugere ligeira recuperação. Macacos Squirrel, previamente “lesionados” com MDMA, apresentam um crescimento substancial dos axónios serotoninérgicos e um diferente modelo de re-enervação, 18 meses após o tratamento com MDMA (Fischer et al., 1995).

Por outro lado, a via de administração da MDMA, também parece afectar o grau de depleção de 5-HT, sendo a administração por via oral menos tóxica do que a administração por via subcutânea. A administração de 5mg/Kg, duas vezes por semana, durante quatro dias consecutivos, produz uma depleção de 5-HT no córtex frontal de 86%, quando administrada por via subcutânea. Quando a administração é oral, a depleção de 5-HT é de apenas 42% (Ricaurte et al., 1988a).

8. Neurotoxicidade em humanos

Como já foi descrito neste texto, os efeitos neurotóxicos da MDMA em modelos animais encontram-se bem documentados. Contudo, não é fácil extrapolar estes dados com precisão de forma a prever potencial neurotóxico nos consumidores de “ecstasy”. Os estudos em animais utilizam doses elevadas e diferentes vias de administração, bem como se verificam diferenças na farmacocinética. Estas são algumas das variáveis que originam diferenças nos efeitos, a longo prazo, da MDMA verificados em animais e humanos. Apesar destas limitações, os resultados obtidos em modelos animais são de enorme importância para avaliar a acção neurotóxica da MDMA (Capela et al., 2009).

A interpretação dos efeitos desta droga em humanos é ainda mais dificultada pela variabilidade na frequência e na dose de MDMA consumida entre os utilizadores. Para além disso, factores como a idade e o sexo podem, também contribuir para uma diferente resposta às acções da MDMA (Capela et al., 2009).

Os métodos para avaliar a neurotoxicidade em humanos estão, muitas vezes, limitados à neuroimagem e, ocasionalmente, a estudos bioquímicos em voluntários ou ainda histológicos, apenas após ingestão fatal de MDMA. No entanto, a função serotoninérgica cerebral em humanos pode ser estudada usando métodos menos invasivos, tais como a medida dos metabolitos monoaminérgicos no líquido cerebrospinal (CSF), ou a medida das alterações nos neurónios e nas células gliais através da espectroscopia de ressonância magnética de prótons (Chang et al., 1999), ou ainda avaliando a função neuroendócrina.

O uso da expressão de genes como biomarcador de neurotoxicidade é um campo em desenvolvimento que poderá ter algum interesse na determinação da neurotoxicidade provocada pela MDMA. Bowyer e colaboradores demonstraram uma alteração específica na expressão de genes em regiões do córtex cerebral, onde ocorreu degeneração neuronal induzida por anfetaminas, a qual não pode ser atribuída a factores tais como convulsões ou hipertermia (Bowyer et al., 2004).

Num estudo realizado através da medida directa de 5-HT e do 5-HIAA na zona do nigroestriado cerebral (21 horas *post mortem*) de um consumidor de “ecstasy” com 26 anos de idade e nove de consumo, observou-se uma profunda depleção, desde 50 a 80% destes biomarcadores. No entanto, o indivíduo tinha também consumido cocaína e heroína nos meses que antecederam a sua morte. Uma vez que nenhuma destas drogas demonstrou, previamente, produzir alterações na concentração de 5-HT no nigroestriado, os investigadores concluíram que os resultados obtidos se deveram ao uso crónico de MDMA (Kish et al., 2000).

Foram medidos, em consumidores recreacionais de MDMA (indivíduos que ingeriram “ecstasy” em mais de 25 ocasiões) e num grupo controlo, as concentrações dos metabolitos de 5-HT, o 5-HIAA, e de DA, o ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (HVA, ácido homovanílico), presentes no CSF. Os consumidores apresentavam níveis significativamente mais baixos de 5-HIAA no CSF do que o grupo controlo, tendo-se verificado uma maior redução no sexo feminino (46%) do que no sexo masculino (20%).

Foi encontrada uma correlação aparentemente negativa, sem significado estatístico, entre os níveis de 5-HIAA no CSF e o número de exposições à MDMA, mas não se verificou uma correlação entre os níveis de 5-HIAA no CSF e a duração e frequência do uso de MDMA. Não foi observada nenhuma diferença na concentração de HVA no CSF entre os dois grupos experimentais (McCann et al., 1994; McCann et al., 1999a).

Num outro estudo, a correlação, aparentemente negativa, entre os níveis de 5-HIAA no CSF e o consumo de MDMA já apresentou significado estatístico. Neste estudo, Bolla e colaboradores verificaram que a concentração de 5-HIAA no CSF em consumidores de MDMA era inferior à concentração no grupo controlo, e que os níveis de 5-HIAA no CSF diminuíam com o aumento da dose (Bolla, McCann e Ricaurte, 1998).

Os recentes avanços nas técnicas de imagiologia têm sido aplicados ao estudo do sistema serotoninérgico no cérebro de humanos consumidores de MDMA. A tomografia de emissão de protões (PET) em combinação com um ligando do transportador de 5-HT, demonstrou uma menor densidade de locais de transporte de 5-HT (5-HTT), no

cérebro de consumidores de “ecstasy”, a qual está correlacionada com a exposição prévia à MDMA (McCann et al., 1998).

A técnica PET foi, também, usada para revelar distúrbios no metabolismo da glucose cerebral em consumidores de MDMA quando comparados com o grupo controlo, o que pode sugerir que a MDMA tem uma acção a longo prazo na actividade neuronal central nos consumidores (Obrocki, J. et al., 1999).

A tomografia computadorizada de emissão de simples fotões (SPECT) permitiu verificar uma diminuição no número de transportadores serotoninérgicos, recorrendo a um marcador específico dos transportadores 5-HTT em indivíduos consumidores de “ecstasy” (Semple et al., 1999; Reneman et al., 2001; Szabo et al., 2002).

Um outro estudo avaliou os efeitos agudos e crónicos da MDMA nos receptores corticais 5-HT_{2A} no cérebro de ratos e humanos. Nos ratos observou-se uma diminuição desses receptores seguida de uma recuperação, dependente da dose, na densidade dos receptores corticais 5-HT_{2A}. Em indivíduos com consumo recente de MDMA, a densidade dos receptores 5-HT_{2A} era, significativamente, mais baixa em todas as áreas corticais estudadas (Reneman et al., 2002a).

Alguns autores têm criticado o uso de técnicas de imagiologia como método demonstrativo do dano nos neurónios serotoninérgicos em consumidores de MDMA (Kish, 2002). No entanto, os dados obtidos dos estudos em humanos, usando as técnicas de PET e SPECT, foram convenientemente validados para medição da neurotoxicidade induzida pela MDMA, sendo instrumentos essenciais em estudos realizados em consumidores de MDMA (Reneman et al., 2002b).

O estudo dos efeitos a longo prazo da MDMA na neurotransmissão serotoninérgica em humanos, pode ser realizado por métodos indirectos, tais como a avaliação da função neuroendócrina (Gerra et al., 1998; McCann et al., 1999b).

A infusão intravenosa do precursor da 5-HT, o L-triptofano, leva a um aumento da concentração de prolactina no soro, a qual ocorre devido a um aumento da síntese e

libertação de 5-HT em indivíduos controlo, o que não se verifica no grupo dos consumidores de MDMA. Esta diferença na resposta não foi estatisticamente significativa, provavelmente, devido ao pequeno tamanho da amostra (Price et al., 1989). Uma alteração similar na resposta de prolactina, mas com significado estatístico, foi observada após a administração de d-fenfluramina. Gerra e colaboradores (1998) demonstraram que o aumento, quer de prolactina, quer de cortisol, induzido pela d-fenfluramina, era significativamente maior no grupo de consumidores de MDMA quando comparado com o grupo controlo. Além disso, pensa-se que a secreção de prolactina seja controlada pela activação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, enquanto a secreção de cortisol ocorre após a estimulação do receptor 5-HT_{2C}, na presença de um antagonista dos receptores 5-HT_{1A}. A alteração da resposta da prolactina e do cortisol nos consumidores de MDMA, pode indicar uma sensibilidade reduzida nos receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} (Gerra et al., 1998).

Num outro estudo, consumidores de MDMA foram testados 3 semanas e 1 ano após a abstinência da droga. Após 3 semanas de abstinência, tanto a resposta da prolactina como do cortisol era significativamente inferior nos consumidores de MDMA quando comparados com o grupo controlo. Após 1 ano de abstinência, a resposta da prolactina continuava significativamente inferior nos consumidores e era similar à observada às 3 semanas de abstinência. No entanto, não foi observada diferença significativa na resposta do cortisol entre os consumidores e o grupo controlo, após 1 ano de abstinência. Estes resultados sugerem a presença de uma função serotoninérgica cerebral reduzida a longo prazo em consumidores de MDMA. A recuperação da resposta do cortisol, enquanto a resposta de prolactina permanece reduzida, pode indicar que a MDMA afecta diferentes regiões cerebrais e receptores de 5-HT de diferentes formas (Gerra et al, 2000).

Os efeitos psiquiátricos a longo prazo, após o consumo recreacional de MDMA, estão já bem documentados e sabe-se que permanecem muito tempo após a cessação do consumo (Bolla, McCann e Ricaurte, 1998; Creighton, Black e Hyde, 1991; McCann et al., 1994; McCann, Slate e Ricaurte, 1996; McGuire, 2000). No entanto, nos consumidores de “ecstasy” em que se observa doença psiquiátrica é difícil determinar se

o aparecimento destes problemas é o resultado do consumo de MDMA, ou se a desordem psiquiátrica já existia e desenvolveu o seu curso normal.

Vários estudos sobre os efeitos da MDMA em humanos revelam uma redução na memória e na aprendizagem, principalmente na memória de trabalho, na capacidade de planear, no controlo executivo e na impulsividade cognitiva (Rodgers, 2000; Fox et al., 2002; Morgan et al., 2002; Gouzoulis-Mayfrank et al., 2003; Moeller et al., 2004; Quednow et al., 2006).

Ocasionalmente, as alucinações visuais e as ilusões paranóicas que se manifestam na fase aguda, podem persistir durante dias ou semanas, juntamente com depressão, ataques de pânico, redução cognitiva e outras alterações no comportamento (Creighton, Black e Hyde, 1991; McCann et al., 1994; McCann, Slate e Ricaurte, 1996; Bolla, McCann e Ricaurte, 1998; Butler e Montgomery, 2004; Morgan et al., 2006). O défice cognitivo provocado pela MDMA parece ser selectivo e pode ser mais evidente em consumidores habituais (Krystal et al., 1992; Parrott e Lasky, 1998; Parrott et al., 1998; Morgan, 2000; Wareing, Fisk e Murphy, 2000).

Foi já demonstrado que a memória verbal e visual se encontra reduzida em consumidores de MDMA, o que indica que o dano serotoninérgico pode ser a causa dos défices cognitivos (Bolla, McCann e Ricaurte, 1998). Mais recentemente, descobriu-se que os consumidores de MDMA apresentam défices nos aspectos executivos da memória de trabalho e na performance da memória verbal. Usando uma bateria de testes psicológicos computadorizados, os consumidores de MDMA em abstinência demonstraram défices em vários testes cognitivos, particularmente, na memória de trabalho, o que está relacionado com a extensão do uso desta droga, porém não se observou uma redução de 5-HIAA no CSF (Wareing et al., 2005).

O uso de MDMA em adolescentes pode estar associado a reduções cognitivas e disfunção dos circuitos inibitórios do hipocampo, o que indica que neste grupo etário as alterações comportamentais são semelhantes às que são observadas em adultos (Jacobsen et al., 2004). Os estudos realizados indicam que a disfunção primária na memória dos consumidores habituais de “ecstasy” pode estar relacionada com a

particularidade do hipocampo ser altamente vulnerável aos efeitos neurotóxicos da MDMA (Gouzoulis-Mayfrank et al., 2003).

Alguns estudos têm procurado examinar o papel do género do utilizador na neurotoxicidade ocorrida após o consumo de MDMA. Os consumidores do sexo feminino apresentam níveis mais elevados de depressão do que os consumidores do sexo masculino, vários dias após a ingestão de uma dose de MDMA numa festa (Veryheyden et al., 2002).

Usando a técnica de SPECT, observa-se que a ligação de um radioligando com alta afinidade para o receptor 5-HT é mais baixa nos consumidores habituais de MDMA do sexo feminino do que nos de sexo masculino, assim como em relação ao grupo controlo. Este efeito não está associado a um maior consumo de MDMA, o que sugere que os consumidores do sexo feminino são mais susceptíveis aos efeitos neurotóxicos da MDMA (Reneman et al., 2001). Os estudos bioquímicos suportam esta sugestão, uma vez que se observa uma redução nos níveis de 5-HIAA no CSF superior em consumidores do sexo feminino. Num estudo foi verificada uma redução dos níveis de 5-HIAA no sexo feminino de 46%, enquanto que no sexo masculino a redução foi de 20% comparativamente aos valores de controlo (McCann et al., 1994). Estas diferenças podem ser atribuídas a uma possível diferença no sistema serotoninérgico ou a diferenças de género no perfil metabólico da MDMA (Capela et al., 2009).

É difícil para os investigadores considerarem que exista uma dose de MDMA que seja segura, uma vez que os comprimidos são sintetizados clandestinamente e, portanto, a dose e a pureza da MDMA são uma incerteza. Complicações adicionais advêm do facto de muitos consumidores de MDMA serem também consumidores de outras drogas, o que dificulta a tarefa de saber quais os efeitos que podem ser atribuídos à MDMA por si só. Os comprimidos de MDMA contêm muitas vezes na sua composição outras drogas psicoactivas que os consumidores ingerem sem saber (Easton e Marsden, 2006).

Apesar dos estudos acerca da toxicidade da MDMA no desenvolvimento fetal serem escassos, a literatura clínica sugere que a exposição pré-natal à MDMA é tóxica para o desenvolvimento do feto humano. Alguns estudos sugerem que os bebés expostos à

“ecstasy” no útero, apresentam um significativo aumento de risco de formação de defeitos congénitos, incluindo problemas cardiovasculares e músculo-esqueléticos (McElhatton et al., 1999; Ho, Karimi-Tabesh e Koren, 2001).

9. Mecanismos de Neurotoxicidade

9.1. Formação de metabolitos tóxicos da MDMA

Vários investigadores, têm proposto que os metabolitos da MDMA são responsáveis pela neurotoxicidade observada após a administração de MDMA, devido a vários estudos terem falhado quando se tentava demonstrar a neurotoxicidade serotoninérgica após a administração directa de MDMA e MDA no cérebro de ratos (Paris e Cunningham, 1992; Esteban et al., 2001). Por esta razão, foi sugerido que é necessário ocorrer metabolização sistémica para se verificar a ocorrência de neurotoxicidade (de la Torre e Farre, 2004; Monks et al., 2004).

Em concordância, várias investigações confirmaram que o metabolismo da MDMA leva à formação de metabolitos com elevado potencial neurotóxico (Capela et al., 2009).

Foi já demonstrado, que os principais metabolitos da MDMA, nomeadamente a N-Me- α -MeDA e α -MeDA, não induzem neurotoxicidade serotoninérgica quando injectados directamente no cérebro, ao contrário do que se verifica após administração periférica. Foi demonstrado que a administração intraperitoneal de N-Me- α -MeDA no ratinho provoca depleção a longo prazo de 5-HT e DA (Miller, Lau e Monks, 1996; Escobedo et al., 2005).

Estes metabolitos, a N-Me- α -MeDA e α -MeDA, são catecóis que podem sofrer oxidação dando origem às correspondentes orto-quinonas e estas, por sua vez, podem entrar no ciclo redox originando radicais semi-quinónicos que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de azoto (RNS) (Monks e Lau, 1997).

Por outro lado, as orto-quinonas podem formar aductos com a GSH, como já foi referido, e posteriormente, os conjugados de N-Me- α -MeDA e α -MeDA com a GSH são transportados e metabolizados no cérebro, tendo sido demonstrada a presença de conjugados da GSH com a NAC, no estriado de ratos após administração subcutânea de MDMA (Jones et al., 2005; Hiramatsu et al., 1990). Estes conjugados com a NAC são

eliminados mais lentamente, bem como são mais persistentes ao nível do cérebro (Monks e Lau, 1997)

Os metabolitos da MDMA conjugados com a GSH podem formar quinonas tioéter, as quais possuem a habilidade de entrar no ciclo redox e produzir ROS, ligar-se a macromoléculas tecidulares, assim como ao ácido desoxirribonucleico (ADN) (Kleiner et al., 1998; Miyazaki et al., 2006). Os estudos in vivo têm demonstrado que, os metabolitos da MDMA conjugados com a GSH promovem efeitos neurotóxicos quando injectados directamente no cérebro (Miller, Lau e Monks, 1996).

Foi também demonstrado, que estes conjugados com a NAC são mais tóxicos do que os catecóis que lhes deram origem, quer em exposições curtas, quer em exposições longas, uma vez que tendem a acumular-se no cérebro. Adicionalmente, deve ter-se em conta o facto de estes metabolitos poderem aparecer no cérebro em simultâneo promovendo a ocorrência de um efeito tóxico sinérgico (Capela et al., 2006b; Capela et al., 2007b).

Os catecóis, as quinonas e hidroquinonas podem sofrer oxidação espontânea e formar superóxidos e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), os quais podem levar à peroxidação lipídica e dano nos terminais serotoninérgicos, evento secundário à produção de radicais hidroxilo. A sua fundamentação deve-se à prevenção da neurotoxicidade induzida pela MDMA através do uso de antioxidantes (Colado e Green, 1995; Aguirre et al., 1999; Alves et al., 2007).

A neurotoxicidade dos conjugados 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e 5-(NAC)-N-Me- α -MeDA é bastante importante para a extrapolação dos resultados obtidos em animais para humanos (de la Torre e Farre, 2004; Easton e Marsden, 2006). Sendo as reacções metabólicas semelhantes entre humanos e ratos, é de esperar encontrar os metabolitos de MDMA conjugados com GSH e com a NAC no cérebro de humanos, e que estes conjugados possam adquirir concentrações neurotóxicas, à semelhança do que acontece nos ratos (Capela et al., 2007b).

Resumindo, pode dizer-se que o metabolismo da MDMA deve desempenhar um papel fundamental nos eventos neurotóxicos provocados pelo consumo de “ecstasy”.

9.2. Hipertermia

Foi já demonstrado, *in vivo*, que a hipertermia é um factor importante na neurotoxicidade induzida pela MDMA. Como se sabe, a temperatura ambiente tem grande influência na temperatura corporal, tendo sido demonstrado que pequenas alterações na temperatura ambiente podem produzir alterações marcadas na neurotoxicidade serotoninérgica induzida, após a administração de MDMA (Malberg e Seiden, 1998).

Após um estudo realizado, em ratos, por Gordon e colaboradores, estes sugeriram que a MDMA pode provocar a perda dos mecanismos de termorregulação, uma vez que verificaram que a administração desta droga produzia hipertermia a temperaturas ambiente superiores a 24°C, ao contrário do que se verificou quando a temperatura ambiente era de 10°C, tendo-se verificado que apresentavam hipotermia (Gordon, C. J. et al., 1991).

Foi demonstrado num estudo, usando a microdiálise, que a hipertermia no rato aumenta a libertação de DA e 5-HT induzida pela MDMA. Neste estudo observou-se um aumento significativo da concentração extracelular de DA e 5-HT, sendo este aumento mais marcado na temperatura ambiente mais elevada, o que demonstra que a temperatura ambiente elevada aumenta a actividade locomotora e a libertação de monoaminas, o que sugere que os efeitos desta droga podem ser mais pronunciados a temperaturas ambiente elevadas (O’Shea et al., 2005). Por outro lado, a hipertermia induz o stress oxidativo, o que vai potenciar o efeito neurotóxico dos metabolitos da MDMA conjugados com a GSH, uma vez que estes levam à formação de ROS (Capela et al., 2007b).

Quando é administrada uma única dose de MDMA, é necessária a existência de hipertermia para que ocorram efeitos neurotóxicos. Por outro lado, a administração repetida de baixas doses de MDMA (4mg/Kg, duas vezes por dia, durante quatro dias) não produz hipertermia, mas produz depleção a longo prazo de 5-HT (O’Shea et al., 1998).

Portanto, embora a hipertermia possa potenciar os eventos neurotóxicos induzidos pela MDMA, este não é o único factor responsável pela neurotoxicidade a longo prazo resultante da administração desta droga. Por outro lado, ao contrário do que ocorre no modelo animal rato, a MDMA leva sempre a um aumento da temperatura corporal em humanos independentemente da temperatura ambiente, podendo a hipertermia ser fatal em humanos (Robert, Chris-Ellyn e Manuel, 2005; Henry, 1992; Green et al., 2003).

Foi já verificado que a prevenção da hipertermia induzida pela MDMA reduz a neurotoxicidade, e que muitos agentes que protegem contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA, também, diminuem a temperatura corporal dos animais, ou seja, compostos que previnam a hipertermia atenuam a neurotoxicidade induzida pela MDMA. Contudo, a prevenção da hipertermia não impede a neurotoxicidade exibida pela droga a longo prazo (Colado et al., 1998; Farfel e Seiden, 1995; Malberg, Sabol e Seiden, 1996).

9.3. A Dopamina (DA) como promotor de neurotoxicidade

Foi já demonstrado que, alterando a função dopaminérgica consegue modificar-se o grau de neurodegeneração induzida pela MDMA, no entanto não a evita por completo. A administração de MDMA, tanto *in vitro* como *in vivo*, promove a libertação de DA (Baumann, Wang e Rothman, 2007), sendo esta libertação de DA amplificada pelo aumento pós-sináptico de 5-HT, uma vez que a activação dos receptores 5-HT_{2A} aumentam a síntese e libertação de DA (Gudelsky e Nash, 1996).

Vários investigadores propuseram um papel directo da DA na neurotoxicidade induzida pela MDMA, no entanto estudos mais recentes contrariam essas hipóteses. A teoria da DA não tem em conta o facto de que, o dano nos terminais serotoninérgicos é observado em todo o SNC, nomeadamente, em áreas com pouca enervação dopaminérgica, como o hipocampo. O papel da DA em regiões cerebrais onde a sua concentração é baixa, implicaria diferentes mecanismos para o dano observado nessas regiões (Shankaran e Gudelsky, 1998).

Estudos de Yuan e colaboradores, também sugerem que a DA não está envolvida directamente nos mecanismos de neurotoxicidade induzida pela MDMA. Nestes estudos não foi verificada qualquer tipo de neuroprotecção serotoninérgica, após administração de reserpina (agente depletor de catecolaminas) ou α -metil-*p*-tirosina (inibidor da síntese de DA) a ratos, nos quais a temperatura corporal é mantida elevada (Yuan et al., 2002). Outras substâncias como o haloperidol (antagonista dos receptores de DA) foi sugerida como neuroprotectora, contudo não existiu qualquer controlo da temperatura corporal (Schmidt, Black e Taylor, 1990b; Hewitt e Green, 1994).

Os resultados de Yuan e colaboradores sugerem que evidências anteriores, que demonstraram um papel da DA importante na neurotoxicidade induzida pela MDMA, foram confundidas pelas alterações na temperatura corporal dos modelos animais.

Provavelmente, as evidências mais convincentes sobre a importância da DA na neurotoxicidade induzida pela MDMA, têm sido reportadas em estudos onde ocorre a inibição da MAO-B. Nenhum outro estudo conseguiu comprovar um papel da DA por si só na neurotoxicidade induzida pela MDMA (Capela et al., 2009).

A MDMA induz uma libertação aguda de 5-HT e DA que é seguida da depleção intraneural das reservas de 5-HT. A 5-HT activa os receptores pós-sinápticos 5-HT_{2A}, em neurónios GABAérgicos e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição da transmissão GABAérgica o que leva a um aumento da síntese e libertação de DA. A DA que existe em excesso é transportada para o interior de neurónios que sofreram perda de 5-HT. Uma vez no interior de neurónios serotoninérgicos, a DA vai ser desaminada pela enzima MAO-B, que se encontra localizada na membrana exterior da mitocôndria, dando origem a um aldeído reactivo, o 3,4-dihidroxifenilacetaldeído (DOPAL), reacção acompanhada pela libertação de H₂O₂. Esta sequência de acontecimentos leva à formação de radicais livres, aumentando a formação do radical hidroxilo (HO·). Espécies reactivas de oxigénio como esta são altamente tóxicas, danificam proteínas celulares, bem como danificam ADN e proteínas mitocondriais, que contribuem para a degeneração dos terminais serotoninérgicos (Fig.8) (Sprague, Everman e Nichols, 1998).

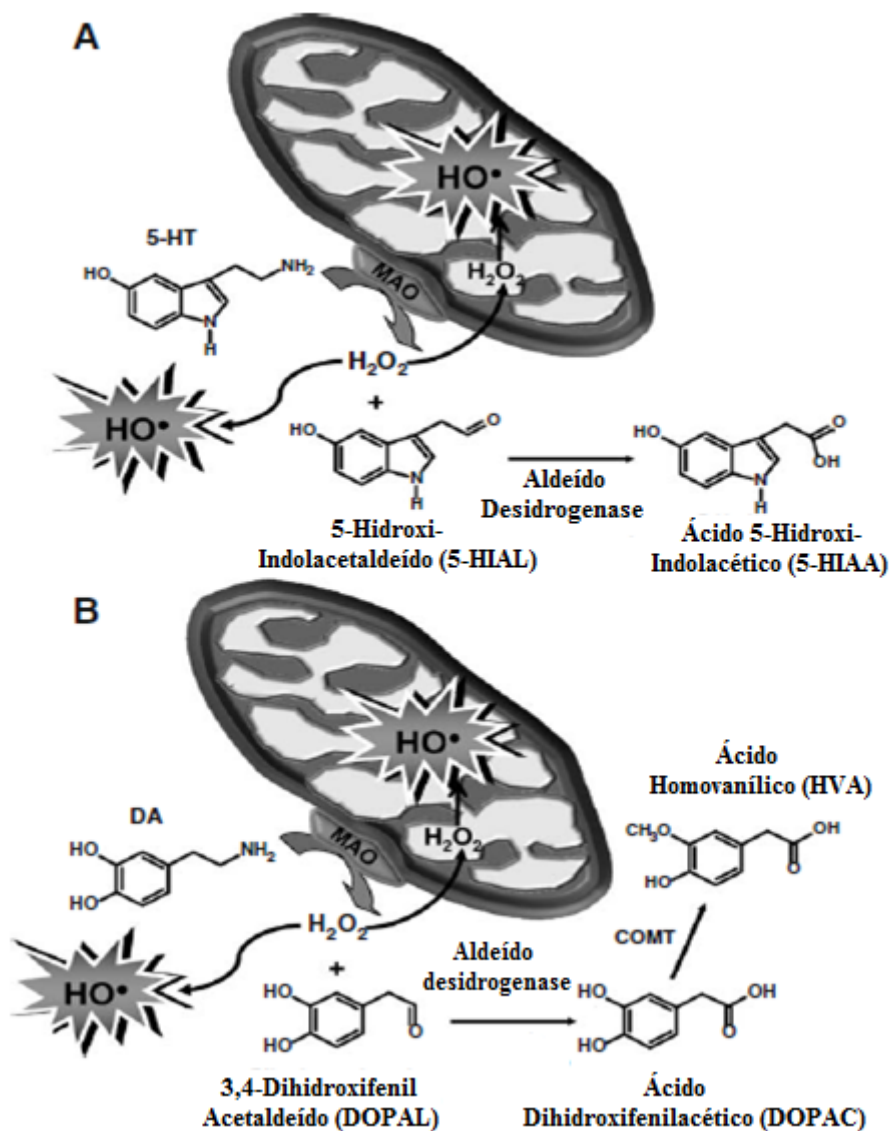


Fig. 7: Formação de radicais livres provenientes da desaminação da DA pela acção da enzima MAO, adaptado de Capela et al., 2009.

9.4. Influência do 5-HTT

Os transportadores serotoninérgicos (5-HTT) desempenham um papel importante na neurotoxicidade induzida pela MDMA, tendo sido já demonstrado em vários estudos. O fundamento para esta hipótese advém do facto de inibidores dos 5-HTT, como a fluoxetina e fluvoxamina, prevenirem a neurotoxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA sem interferirem com a temperatura corporal (Schmidt e Taylor, 1990; Malberg, Sabol e Seiden, 1996; Aguirre et al., 1998; Sanchez et al., 2001). A

administração concomitante de fluoxetina ou fluvoxamina, resulta numa protecção completa contra a neurotoxicidade serotoninérgica induzida pela MDMA no hipocampo e no estriado. A interacção da MDMA com os 5-HTT, parece ter um papel crítico na toxicidade a longo prazo dos terminais serotoninérgicos. (Sanchez et al., 2001).

Verificou-se que a administração de fluoxetina, antes ou depois da administração de MDMA, resultava na redução da formação de radicais livres induzida pela MDMA (Shankaran, Yamamoto e Gudelsky, 1999a). Um potencial mecanismo, pelo qual a fluoxetina atenua a formação de radicais é através da prevenção da entrada, no terminal serotoninérgico, de substâncias reactivas como os metabolitos da MDMA.

A expressão de 5-HTT pode ser rapidamente modulada pela sua estimulação, produção do segundo mensageiro e activação da cínase. A supressão da actividade do 5-HTT é acompanhada pela activação da PKC, a qual provoca a perda da capacidade de recaptação da 5-HT (Ramamoorthy e Blakely, 1999). A activação da PKC conduz à fosforilação do 5-HTT, à sua redistribuição na superfície da célula, seguindo-se a sua sequestração em vesículas intracelulares e, conseqüentemente, perda da actividade de recaptação.

As moléculas que são capazes de permear o transportador (5-HTT), tais como a 5-HT e as anfetaminas, previnem a fosforilação do 5-HTT dependente da PKC. Por outro lado, os antidepressivos facilitam a fosforilação do 5-HTT e bloqueiam a recaptação de 5-HT (Ramamoorthy et al., 1998; Ramamoorthy e Blakely, 1999). Dado que a MDMA é um substrato dos 5-HTT, uma diminuição na densidade das proteínas transportadoras (5-HTT) na membrana celular, induzida pela presença de inibidores do 5-HTT, poderá envolver um significativo e prolongado bloqueio na recaptação de MDMA e dos seus produtos metabólicos para os terminais nervosos serotoninérgicos pré-sinápticos, diminuindo deste modo a ocorrência de eventos neurotóxicos (Sanchez et al., 2001).

9.5. Importância da formação de espécies reactivas

A formação de espécies reactivas é um evento com um elevado contributo para a neurotoxicidade induzida pela MDMA.

A formação de ROS, resultante da oxidação dos metabolitos da MDMA, bem como outros factores como a oxidação da DA, metabolização de DA e 5-HT pela MAO-B e a formação de peroxinitritos e outras espécies reactivas de azoto promovem o stress oxidativo, levando à perda dos terminais neuronais, bem como leva à activação da morte neuronal programada em várias regiões cerebrais (Capela et al., 2009).

Todos os eventos acima referidos conduzem à formação de ROS (H_2O_2 ; $HO\cdot$; $O_2\cdot^-$), sendo estas espécies reactivas potentes que levam à peroxidação lipídica (destruição das membranas celulares) e danificam proteínas celulares, bem como danificam ADN e proteínas mitocondriais (Capela et al., 2009).

Capítulo II – Parte Experimental

1. Objectivo

Este trabalho teve como objectivo, avaliar a neurotoxicidade induzida pela MDMA, numa linha celular dopaminérgica, após uma exposição crónica e aguda, tentando representar as consequências que ocorrem a nível cerebral decorrentes do uso recreativo desta droga. Para esta avaliação foi usado como modelo *in vitro*, as células dopaminérgicas derivadas de neuroblastoma humano, a linha celular SH-SY5Y. Estas células foram expostas a diferentes concentrações de MDMA, respectivamente, 1,0 mM, 0,1 mM e 0,01 mM, por períodos de tempo distintos (24 horas, 72 horas e 1 semana).

Os períodos de tempo seleccionados representam a exposição à MDMA durante um dia (24 horas), sendo o objectivo representar o consumo durante uma noite de festa, durante 3 dias (72 horas), representando o consumo durante um fim-de-semana de festa (por exemplo: sexta feira, sábado e domingo), ambas representando um consumo agudo/espórádico da droga, e por último durante 1 semana, representando o consumo crónico da droga e não esporádica em contextos de festa.

Materiais

Os reagentes e materiais usados para cultura celular foram obtidos aos seguintes fornecedores: meio de cultura **DMEM** (meio de Eagle modificado por Dubelco), tampão fosfato salino (**PBS**), usado para lavagem das células, (**tripsina/EDTA**), usada para destacar as células, penicilina/estreptomicina (**Pen/Estrep**), aminoácidos não essenciais (**NEAA**) e soro bovino fetal (**FBS**) à Gibco (Invitrogen, Paisley). Os **frascos de cultura** de 25 cm² foram adquiridos à Corning Incorporated (Corning, NY, USA). Foram usadas **placas de cultura** de 48 poços (Nunclon™ Δ Surface) que foram adquiridas à Nunc (Roskild, Dinamarca), e placas de 96 poços, não estéreis, próprias para leitores de placas, adquiridas à Frilabo (Portugal).

Para além destes, foram utilizados **tubos de falcon** de 50 ml e **pipetas graduadas** de 10 e 25 ml, adquiridos à Orange Scientific (Bélgica).

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (**MTT**), o qual mede a actividade metabólica celular, dodecil sulfato de sódio **SDS** (Solução detergente a 10 % e 0,01M de HCL), o qual é utilizado para parar a reacção do MTT e o azul de tripano, foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A substância em teste, foi a 3,4-metilenodioximetanfetamina - **MDMA** (sol. mãe 50 mM) foi obtida e extraída de comprimidos de elevada pureza fornecidos pela Policia Judiciária Portuguesa. A partir da solução mãe de MDMA, foram efectuadas 2 diluições sucessivas de forma a obter a substância em 3 concentrações distintas: 50 mM, 5 mM e 0,5 mM.

2. Métodos *in vitro*

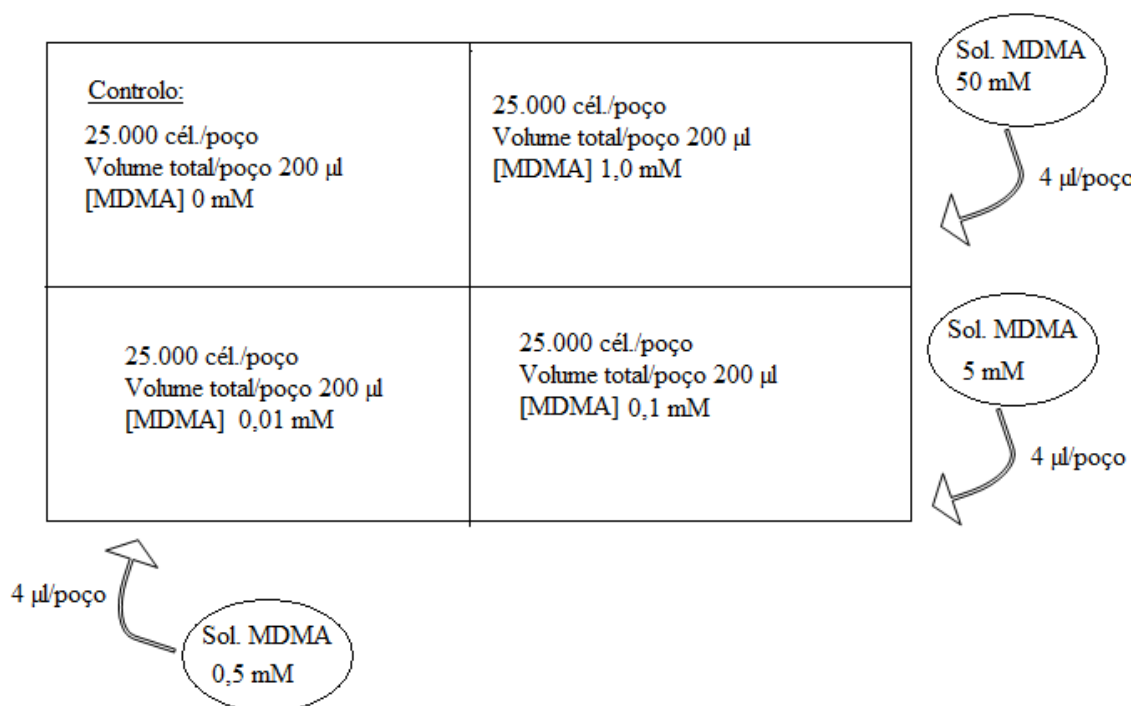
2.1. Cultura Celular

A linha celular SH-SY5Y (ATCC, Manassas, VA, USA), cresceu até à confluência em frascos de 25cm³ contendo DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% da mistura de Pen/Estrep e 1% de NEAA, tendo sido mantida numa estufa a 37°C com uma atmosfera a 5% CO₂.

Após a confluência, as células foram tripsinizadas (tripsina/EDTA 0,25%) e foi contada a densidade da suspensão celular utilizando uma solução a 0,4% de azul tripano numa Câmara de Neubauer usando um microscópio óptico. As células foram subcultivadas em placas de cultura de 48 poços, à densidade de 25.000 células/cm². O volume final obtido em cada poço foi de 200 µl.

Os poços semeados de cada placa de 48 poços foram distribuídos por 4 condições, de forma a serem testadas diferentes concentrações de MDMA, respectivamente, 0 mM (Controlo), 1,0 mM, 0,1 mM e 0,01 mM, em cada período de exposição avaliado.

Fig. 8: Representação das condições de ensaio nas placas de 48 poços



As células foram expostas a diferentes concentrações de MDMA, respectivamente, 1,0 mM, 0,1 mM e 0,01 mM, por períodos de tempo distintos (24 horas, 72 horas e 1 semana).

Os períodos de tempo seleccionados representam a exposição à MDMA durante um dia (24 horas), sendo o objectivo representar o consumo durante uma noite de festa, durante 3 dias (72 horas), representando o consumo durante um fim-de-semana de festa (período de 3 dias), ambas representando um consumo agudo/espórádico da droga. Por último, durante 1 semana, representando o consumo mais crónico da droga.

2.3. Determinação da viabilidade celular

Passado o período de exposição à MDMA, foi realizado um método para avaliar o grau de neurotoxicidade induzida pela substância. O método em questão foi o ensaio de redução do sal tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

A redução do MTT, é um método colorimétrico, frequentemente usado para medir a proliferação celular e citotoxicidade (viabilidade celular) (Mosman, T., 1983). Neste tipo de ensaios, o MTT (composto de coloração amarela) é acumulado nas células por endocitose e, uma vez no interior das células, é metabolizado essencialmente pela enzima mitocondrial succinil desidrogenase que provoca a redução do anel tetrazólico deste sal, resultando na formação de cristais de formazan (cor azulada). Estes cristais, posteriormente, são acumulados em compartimentos endossomais e/ou lipossomais, sendo depois libertados no espaço extracelular por exocitose. O formazan é um composto resultante da metabolização celular do MTT, e por esta razão pode concluir-se que apenas as células viáveis terão capacidade de metabolizar o MTT, sendo por isto possível avaliar o grau de citotoxicidade (viabilidade celular) através deste método.

Assim sendo, passados os períodos de exposição, foram adicionados 20 μ l de MTT (concentração final em cada poço de 0,5mg/ml) a cada poço. Após a adição de MTT as placas regressaram à estufa e lá permaneceram por um período de 3 horas, que permite a redução do MTT pelas células viáveis.

Findo este tempo, os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de igual quantidade de solução contendo detergente SDS. Uma vez solubilizados, 200 μ l do conteúdo de cada poço foi transferido em duplicado para os poços das placas de leitura, de forma a possibilitar a sua leitura num leitor de placas de 96 poços (Stat Fax 3200, Awareness Technology Inc.).

A viabilidade celular foi determinada pela medição espectrofotométrica do formazan que absorve a 545 nm.

Os valores da viabilidade celular foram expressos em percentagem relativamente à absorvância determinada nas células controlo.

Contudo, na realização destes ensaios não foi possível efectuar a medição da absorvância do formazan ao comprimento de onda ideal de 550 nm, uma vez que o leitor de placas disponível apenas permite leitura em comprimentos de onda pré-

definidos. Assim, foi utilizado um comprimento de onda mais aproximado possível, neste caso 545 nm.

2.3. Apresentação e análise estatística dos resultados

Os resultados são apresentados nos gráficos sob a forma da média com o respectivo desvio padrão, oriundas de pelo menos 3 experiências independentes. A análise estatística foi efectuada para avaliar diferenças entre os diversos grupos de tratamento utilizando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica), pelo programa Sigma-stat 3.5 (Systat Software, CA, USA).

3. Resultados

3.1. Neurotoxicidade da MDMA nas Células SH-SY5Y após 24 horas de exposição

Após 24 horas de exposição das células SH-SY5Y, verificou-se relativamente ao grupo controlo, para uma concentração de MDMA de 0,01 mM e 1,0 mM, que a quantidade de formazan formado manteve-se próxima dos 100%, ou seja próxima do valor de controlo. Para uma concentração de MDMA de 0,1 mM, observou-se um aumento para valores de 125,4%, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa.

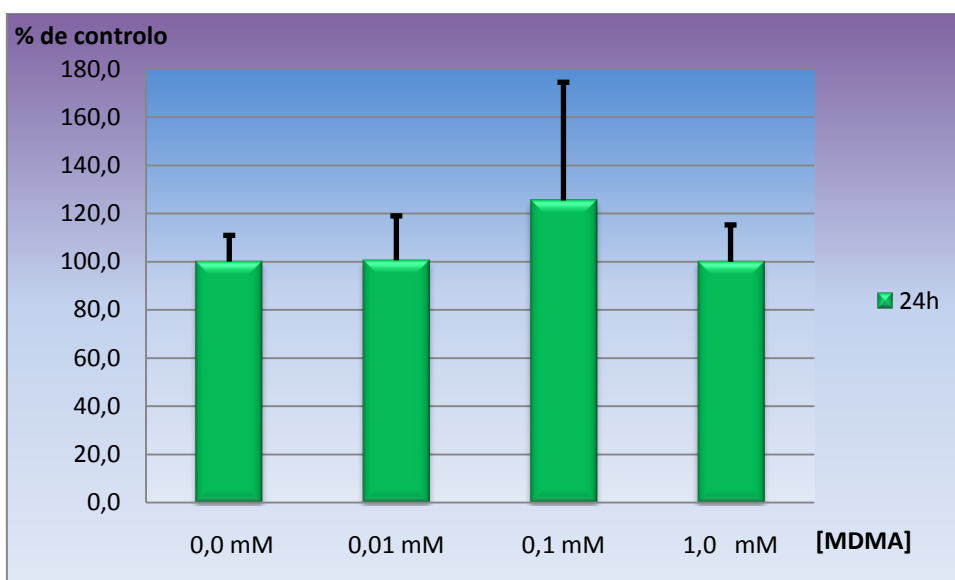


Gráfico 1 – Viabilidade celular avaliada pela metabolização do MTT, após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de MDMA (0,01 mM; 0,1mM e 1,0mM). Valores expressos em percentagem de controlo (n=18 de três experiências diferentes). Após teste Kruskal-Wallis não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de tratamento.

3.2. Neurotoxicidade da MDMA nas Células SH-SY5Y após 72 horas de exposição

Após 72 horas de exposição das células SH-SY5Y, verificou-se relativamente ao grupo controlo, para uma concentração de MDMA de 0,01 mM, que a quantidade de formazan formado manteve-se próxima dos 100%, ou seja próxima do valor de controlo. Para as concentrações de MDMA de 0,1 mM e 1,0 mM, observou-se uma redução para valores, respectivamente, de 95,4% e de 94,9%, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa.

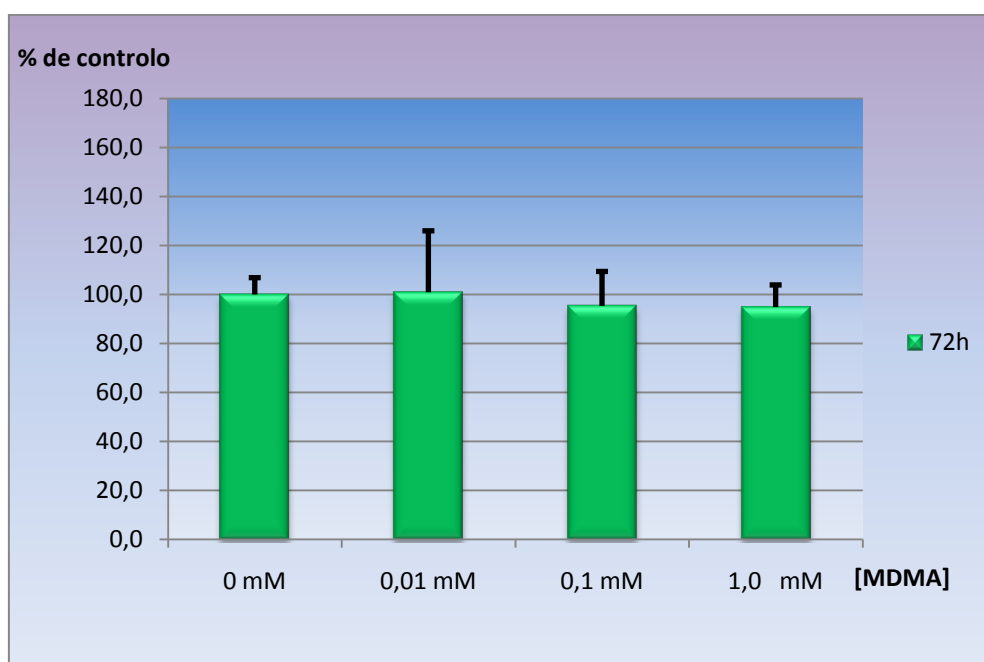


Gráfico 2 – Viabilidade celular avaliada pela metabolização do MTT, após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de MDMA (0,01 mM; 0,1mM e 1,0mM). Valores expressos em percentagem de controlo (n=18 de três experiências diferentes). Após teste Kruskal-Wallis não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de tratamento.

3.3. Neurotoxicidade da MDMA nas Células SH-SY5Y após 1 semana de exposição

Após 1 semana de exposição das células SH-SY5Y, verificou-se relativamente ao grupo controlo, para uma concentração de MDMA de 0,01 mM, que a quantidade de formazan formado aumentou para valores de 109,1%. Para as concentrações de MDMA de 0,1 mM e 1,0 mM, observou-se uma redução para valores, respectivamente, de 94,2% e de 95,2%, no entanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

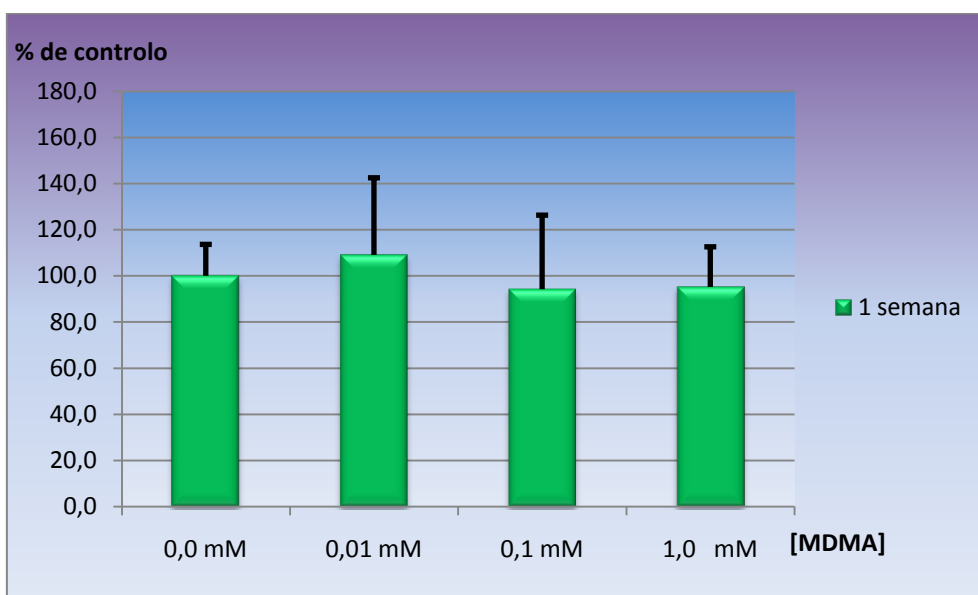


Gráfico 3 – Viabilidade celular avaliada pela metabolização do MTT, após 1 semana de exposição a diferentes concentrações de MDMA (0,01 mM; 0,1mM e 1,0mM). Valores expressos em percentagem de controlo (n=18 de três experiências diferentes). Após teste Kruskal-Wallis não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de tratamento.

Capítulo III – Discussão e Conclusão

1. Discussão

O primeiro estudo publicado acerca da neurotoxicidade da MDMA data de 1986 e demonstrou que esta é tóxica para os terminais nervosos serotoninérgicos do cérebro de ratos (Stone et al., 1986).

Foi sugerido que o dano nos neurónios serotoninérgicos era selectivo e que os terminais nervosos de outros neurotransmissores não eram afectados (Gibb et al., 1990). No entanto, já foi demonstrado por outros estudos que esta afirmação não é verdadeira, uma vez que a MDMA promove alterações agudas na libertação, não só de 5-HT, mas também na libertação de DA no tecido cerebral, tendo sido já demonstrada a sua neurotoxicidade em neurónios dopaminérgicos no cérebro de ratinhos (Colado et al., 2004).

Para além disso, já foi demonstrado que a MDMA promove o dano de outros sistemas cerebrais e outros tipos de células, como as corticais (Capela et al., 2006a; Capela et al., 2007a). Contudo, a MDMA produz efeitos mais acentuados em neurónios serotoninérgicos por possuir maior afinidade para os transportadores da 5-HT (Capela et al., 2009). Consequentemente, a atenção da maioria dos investigadores tem recaído sobre os efeitos agudos e a longo prazo da MDMA na função serotoninérgica.

No entanto, a avaliação da neurotoxicidade da MDMA não deve ser restringida à função serotoninérgica, tendo sido já demonstrado que é possível avaliar a neurotoxicidade desta substância através da avaliação da função dopaminérgica..

Por esta razão, vários estudos, realizados *in vitro*, sobre a neurotoxicidade decorrente do consumo de MDMA utilizam como modelo a linha celular dopaminérgica humana SH-SY5Y (Ferreira, 2009). Esta linha celular é utilizada em diversas pesquisas de neurotoxicidade, bem como é utilizada em pesquisas que estudem doenças neurodegenerativas, como por exemplo a Doença de Parkinson. Esta patologia é caracterizada pela existência de degeneração neuronal e, por esta razão esta linha celular

é muitas vezes utilizada com o objectivo de avaliar e melhor compreender os mecanismos que estão envolvidos nos processos neurodegenerativos que levam ao envelhecimento cerebral e aparecimento de doenças neurodegenerativas (Cheung et al., 2009).

Por outro lado, esta linha celular foi também utilizada por Wu e Colaboradores com o objectivo de avaliar a neurotoxicidade induzida pela metanfetamina (MA). O seu estudo demonstrou que, após uma hora de exposição à MA ocorre um aumento do nível de ROS. Após 24 horas de exposição, verificou-se danificação de ADN mitocondrial, bem como se verificou a ocorrência de apoptose neuronal (Wu, et al., 2007).

No estudo realizado no âmbito deste trabalho, foi avaliada a neurotoxicidade da MDMA em células dopaminérgicas, SH-SY5Y, de um neuroblastoma humano, após um período de exposição de 24 e 72 horas, e 1 semana. O volume celular utilizado (25.000 células), foi utilizado tendo em conta dados de protocolos anteriormente descritos (Pesgraves, 2004).

Este estudo demonstrou que, após a exposição das células SH-SY5Y à MDMA durante 24 horas, não se observaram diferenças na viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT. No entanto, verificou-se para uma das concentrações de MDMA, nomeadamente, 0,1 mM, um aumento na metabolização do MTT de cerca de 25% (expresso em percentagem de formazan formado relativamente ao grupo controlo), contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Este aumento, possivelmente, ocorreu devido a um aumento da actividade da enzima mitocondrial, a succinil desidrogenase, responsável pela conversão do MTT em formazan.

Após a exposição das mesmas células durante 72 horas e 1 semana verificou-se, em ambos os casos, que para as concentrações de MDMA 0,1 mM e 1,0 mM, uma diminuição de cerca de 5% na viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, no período de exposição de 1 semana, verificou-se que, para a concentração de MDMA 0,01mM, ocorreu um ligeiro aumento de cerca de 9%, possivelmente pela mesma razão do

sucedido no período das 24 horas, aumento da actividade enzimática da mitocôndria. No entanto, nenhuma das diferenças verificadas foi estatisticamente significativa.

Apesar de os resultados não apresentarem significado estatístico, pode verificar-se que a viabilidade celular diminui ligeiramente com o aumento da dose e frequência de consumo de MDMA, ou seja, os efeitos neurotóxicos da MDMA estão dependentes da dose e aumentam com o período de exposição. Podemos associar este fenómeno neurotóxico com a exposição durante um longo período com consumo crónico da droga pelos consumidores.

Relativamente à falta de diferenças entre os tratamentos com significado estatístico, possivelmente se fossem utilizadas células serotoninérgicas em vez de células dopaminérgicas os resultados seriam diferentes, uma vez que já foi demonstrado que a MDMA possui maior afinidade para neurónios serotoninérgicos, produzindo efeitos neurotóxicos mais acentuados, quando comparados com os efeitos provocados em neurónios dopaminérgicos.

Por outro lado, o facto de os resultados obtidos não terem significado estatístico, pode estar relacionado com o facto de que em ensaios *in vitro* não são observados os efeitos decorrentes da metabolização da MDMA, principalmente a metabolização sistémica que ocorre a nível hepático.

Foi já demonstrado por vários autores que os efeitos neurotóxicos decorrentes do consumo de MDMA se devem, em larga medida, à acção dos seus metabolitos tóxicos, o N-Me- α -MeDA e α -MeDA e respectivos conjugados, resultantes da metabolização hepática da MDMA. A acção da MDMA não é a causa directa para a neurotoxicidade induzida pelo consumo, mas sim a acção dos seus metabolitos após a metabolização hepática da MDMA (Capela et al., 2007b; Capela et al., 2006b; Miller, Lau e Monks, 1996).

No estudo realizado por Ferreira, foi avaliado o potencial neurotóxico da MDMA e dos seus metabolitos nas células dopaminérgicas SH-SY5Y diferenciadas, de um neuroblastoma humano, após um período de exposição de 24 e 48 horas.

Este estudo demonstrou que o N-Me- α -MeDA e o α -MeDA são neurotóxicos para estas células e que a neurotoxicidade aumenta com o tempo de exposição. Além disso, também foi observado que a neurotoxicidade promovida por estes metabolitos era dependente da concentração utilizada (Ferreira, 2009).

Por outro lado, Ferreira também demonstrou que a neurotoxicidade do metabolito N-Me- α -MeDA nas células SH-SY5Y era maior que a neurotoxicidade induzida pelo α -MeDA. A N-Me- α -MeDA apresenta características mais lipofílicas que o α -MeDA, dada a presença do grupo metilo na amina da cadeia lateral o que pode justificar a sua maior toxicidade. O facto de ser um composto mais lipofílico, permite-lhe atravessar com maior facilidade a membrana celular e desta forma exercer a sua neurotoxicidade no interior da célula (Ferreira, 2009).

Relativamente à MDMA, Ferreira observou que esta também era neurotóxica para as células SH-SY5Y diferenciadas, apesar de este efeito não ser tão pronunciado como se verifica para os seus metabolitos. Assim, Ferreira concluiu que os metabolitos catecóis da MDMA são mais tóxicos que a própria MDMA (Ferreira, 2009). Este estudo usou um protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y, pelo que o estado de diferenciação terminal das células poderá justificar a diferença de resultados em relação ao presente estudo.

Outros estudos, realizados por Capela e colaboradores, demonstraram que a MDMA induz apoptose neuronal acompanhada pela activação da caspase 3, em culturas de neurónios corticais e cerebelares de ratos (Capela et al., 2006a; Capela et al., 2007a).

Um outro estudo in vitro foi realizado por Jimenez e colaboradores. Neste estudo foram expostas células cerebelares granulares primárias de ratos (CGNs) a doses de MDMA entre 1 e 4 mM durante intervalos de 24 e 48 horas. Em ambos os intervalos, ocorreu um aumento de ROS e verificou-se a activação da caspase 3 o que provocou nas culturas dano neuronal (Jimenez et al., 2004).

2 – Conclusão

A partir da década de 80 o consumo de “ecstasy” generalizou-se entre os jovens como droga de abuso recreativa, pelo que se tornou um grande problema de saúde pública.

Determinar como e em que circunstâncias o consumo de MDMA pode conduzir a alterações crónicas no cérebro humano, assume particular importância para o conhecimento das consequências e tratamento clínico.

O objectivo deste trabalho foi determinar a existência de neurotoxicidade em células humanas dopaminérgicas SH-SY5Y não diferenciadas, após a exposição aguda e crónica à MDMA.

Com os resultados obtidos pode-se concluir que, a MDMA não exerce de forma significativa neurotoxicidade nas células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y, o que confirma o que já foi demonstrado por vários autores. Os efeitos neurotóxicos decorrentes do consumo de MDMA não são provocados apenas pela acção directa desta substância mas sim pela acção dos seus metabolitos tóxicos, hipertermia e aumento do stress oxidativo a nível cerebral.

Capítulo VI - Bibliografia

Advokat, C. (2007). Update on Amphetamine Neurotoxicity and It's Relevance to the Treatment of Attention-Deficit Hiperactivity Disorder (ADHD), *Journal of Attention Disorders*, vol.10 (Maio), pp. 1-9.

Aguirre, N. et al. (1998). MDMA (“Ecstasy”) enhances 5-HT1A receptor density and 8-OH-DPAT induced hypothermia: blockade by drugs preventing 5-hydroxytryptamine depletion, *European Journal of Pharmacology*, vol.346, pp. 181-188.

Aguirre, N. et al. (1999). Alpha-lipoic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity, *NeuroReport*, vol.10, pp. 3675-3680.

Almeida, S.P. e Silva, M.T. (2000). Histórico, efeitos e mecanismo de ação do êxtase (3,4 – metilenedioximetanfetamina): revisão da literatura, *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, vol. 8, pp. 393-402.

Alves, E. et al. (2007). Monoamine oxidase B mediates ecstasy induced neurotoxic effects to adolescent rat brain mitochondria, *Journal of Neuroscience*, vol. 27, pp. 10203-10210.

Armstrong, B. D. e Noguchi K. K. (2004). The Neurotoxic Effects of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and Methamphetamine on Serotonin, Dopamine and GABA-ergic Terminals: An In-Vitro Autoradiographic Study in Rats, *Neurotoxicology*, vol. 25, pp. 905-914.

Bai, F., Lau, S. e Monks, T. J. (1999). Glutathione and N-Acetylcysteine Conjugates of a-Methyldopamine Produce Serotonergic Neurotoxicity: Possible Role in Methylenedioxyamphetamine-Mediated Neurotoxicity, *Chemical Research in Toxicology*, vol. 12, pp. 1150-1157.

Basic Clinical Pharmacology. [em linha]. Disponível em <http://basic.clinical-pharmacology.net/chapter%2032_%20drugs%20of%20abuse.htm>. [consultado em 09/2010].

Battaglia, G. et al. (1987). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 242, pp. 911-916.

Battaglia, G. et al. (1988). Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites, *European Journal of Pharmacology*, vol. 149, pp. 159-163.

Baumann, M. H., Wang, X. e Rothman, R.B. (2007) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings, *Psychopharmacology*, vol. 189, pp. 407-424.

Bolla, K. I., McCann, U. D. e Ricaurte, G. A., (1998). Memory impairment in abstinent MDMA (“Ecstasy”) users, *Neurology*, vol. 51, pp. 1532-1537.

Bowyer, J. F. et al. (2004). Selective changes in gene expression in cortical regions sensitive to amphetamine during the neurodegenerative process, *Neurotoxicology*, vol. 25, pp. 555-572.

Breier, J. M., Bankson, M. G. e Yamamoto, B. K. (2006). L-Tyrosine Contributes to (+)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine Induced Serotonin Depletions, *Journal of Neuroscience*, vol. 26, pp. 290-299.

Broening, H. W. et al. (2001). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) Induced Learning and Memory impairments Depend on the Age of Exposure during Early Development, *Journal of Neuroscience*, vol. 21, pp. 3228-3235.

Broening, H. W., Bowyer, J. F. e Slikker, W. J. (1995). Age dependent sensitivity of rats to the long term effects of the serotonin neurotoxicant (\pm)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA induced thermal response, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 275, pp. 325-333.

Bull, E. J., Hutson, P. H. e Fone, K. C. F. (2003). Reduced social interaction following 3,4-methylenedioxymethamphetamine is not associated with enhance 5-HT_{2C} receptor responsivity, *Neuropharmacology*, vol. 44, pp. 439-448.

Bull, E. J., Hutson, P. H. e Fone, K. C. F. (2004). Decreased social behavior following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is accompanied by changes in 5-HT_{2A} receptor responsivity, *Neuropharmacology*, vol. 46, pp. 202-210.

Butler, G. K. L. e Montgomery, A. M. J. (2004). Impulsivity, risk taking and recreational “ecstasy” use, *Drug Alcohol Depend*, vol. 76, pp. 55-62.

Capela, J. P. et al. (2006b). Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia, *Toxicology Letters*, vol. 164, pp. S118-S118.

Capela, J.P. et al. (2006a). Ecstasy induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin-2a-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia, *Neuroscience*, vol.139, pp. 1069-1081.

Capela, J.P. et al. (2007a). Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2a)-receptor stimulation in cortical neurons, *Neurotoxicology*, vol. 28, pp. 868-875.

Capela, J.P. et al. (2007b). Neurotoxicity mechanisms of thioether ecstasy metabolites, *Neuroscience*, vol.146, pp. 1743-175.

Capela, J.P. et al. (2009). Molecular and Cellular Mechanisms of Ecstasy-Induced Neurotoxicity: An Overview, *Human Press Inc.*, vol.39 (Abril), pp. 210-271.

Carmo, H. et al. (2006). Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) cytotoxicity, *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 16, pp. 789-799.

Chang, L. et al. (1999). Cerebral (1)H MRS alterations in recreational 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) users, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 10, pp. 521-526.

Cheung, Y. et al. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human 5H-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research, *Neurotoxicology*, vol.30, pp. 127-135.

Cho, A.K. (1990). Ice: a new dosage form of a old drug, *Science*, vol.249, pp. 187-220.

Clemens, K. J. et al. (2004). MDMA (“ecstasy”), methamphetamine and their combination: long-term changes in social interaction and neurochemistry in the rat, *Psychopharmacology*, vol. 173, pp. 318-325.

Cohen, R. S. e Cocores, J. (1997). Neuropsychiatric manifestations following the use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”), *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 21, pp. 727-734.

Colado, M. I. e Green, A. R. (1995). The spin trap reagent a-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents “ecstasy”-induced neurodegeneration of 5-hidroxytryptamine neurons, *European Journal of Pharmacology*, vol. 280, pp. 343-346.

Colado, M. I. et al. (1998). Role of hyperthermia in the protective action of chlormethiazole against MDMA (“ecstasy”) induced neurodegeneration, comparison with the novel NMDA channel blocker AR-R15896AR, *British Journal of Pharmacology*, vol. 124, pp. 479-484.

Colado, M. I. et al. (2001). A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) on dopamine neurons in mouse brain, *British Journal of Pharmacology*, vol. 134, pp. 1711-1723.

Colado, M. I. et al. (2004). Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function, *Psychopharmacology*, vol. 173, pp. 249-263.

Colado, M. I., Murray, T. K. e Green, A. R. (1993). 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine, *British Journal of Pharmacology*, vol. 108, pp. 583-589.

Colado, M., Williams, J. e Green, A. (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, *British Journal of Pharmacology*, vol. 115, pp. 1281-1289.

Cole, J. C. e Sumnall, H. R. (2003). Altered states: the clinical effects of Ecstasy, *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 98, pp. 35-58.

Commins, D. L. et al. (1987). Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 241, pp. 338-345.

Creighton, F. J., Black, D. L. e Hyde, C. E. (1991). “Ecstasy” psychosis and flashbacks, *British Journal of Psychiatry*, vol. 159, pp. 713-715.

Darvesh, A. S., Yamamoto, B. K. e Gudelsky, G. A. (2005). Evidence for the Involvement of Nitric Oxide in 3,4-methylenedioxymethamphetamine Induced Serotonin Depletion in the Rat Brain, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 312, pp. 694-701.

Davison, D. e Parrott, A. C. (1997). Ecstasy (MDMA) in recreational users: self-reported psychological and physiological effects, *Human Psychopharmacology*, vol. 12, pp. 221-226.

de la Torre, R. e Farre, M. (2004). Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans, *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 25, pp. 505-508.

de la Torre, R. et al. (2000). Non-linear pharmacokinetics of MDMA (“ecstasy”) in humans, *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 49, pp. 104-109.

de la Torre, R. et al. (2004). Clinical Pharmacokinetics of Amphetamine and Related Substances Monitoring in Conventional and Non-Conventional Matrices, *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 43, pp. 157-185.

de la Torre, R. et al. (2005). MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metabolizer and in nine CYP2D6 extensive metabolizers, *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 61, pp. 551-554.

Easton, N. e Marsden, C. A. (2006). Ecstasy: are animal data consistent between species and can they translate to humans?, *Journal of Psychopharmacology*, vol. 20, pp. 194-210.

Elayan, I. et al. (1993). Short-term effects of 2,4,5-trihydroxyamphetamine, 2,4,5-trihydroxymethamphetamine and 3,4-dihydroxymethamphetamine on central tryptophan hydroxylase activity, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 265, pp. 813-818.

Escobedo, I. et al. (2005). A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice, *British Journal of Pharmacology*, vol. 144, pp. 231-241.

Esteban, B. et al. (2001). 3,4-Methylenedioxyamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose, *Psychopharmacology*, vol. 154, pp. 251-260.

Falk, E. M. et al. (2002). An antisense oligonucleotide targeted at MAO-B attenuates rat striatal serotonergic neurotoxicity induced by MDMA, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 72, pp. 617-622.

Farfel, G. M. e Seiden, L. S. (1995). Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. Experiments using 3,4-methylenedioxyamphetamine, dizocilpine, CGS 19755 and NBQX, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 272, pp. 860-867.

Farfel, G. M., Vosmer G. L. e Seiden, L. S. (1992). The antagonist MK-801 protects against serotonin depletions induced by methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and p-chloroamphetamine, *Brain Research*, vol. 595, pp. 121-127.

Fischer, C. et al. (1995). Reorganization of ascending 5-HTaxon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, “ecstasy”), *Journal of Neuroscience*, vol. 15, pp. 5476-5485.

Fone, K. C. et al. (2002). Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity, *Psychopharmacology (Berl)*, vol.159, pp.437-444.

Fox, H. C. et al. (2002). Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA (“ecstasy”) polydrug users, *Psychopharmacology*, vol. 162, pp. 203-214.

Freudenmann, R.W. et al. (2006). The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents, *Addiction*, vol.101, pp. 1241-1245.

Gerra, G. et al. (1998). Serotonin function after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) in humans, *International Clinical Psychopharmacology*, vol.13, pp. 1-9.

Gerra, G. et al. (2000). Long-lasting effects of (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”) on serotonin system function in humans, *Biological Psychiatry*, vol. 47, pp. 127-136.

Gibb, J. W. et al. (1990). MDMA: historical perspectives, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 600, pp. 601-611.

Globus, M. et al. (1995). Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intransischemic brain temperature modulation, *Journal of Neurochemistry*, vol. 65, pp. 1250-1256.

Gordon, C. J. et al. (1991). Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 38, pp. 339-344.

Gouzoulis-Mayfrank, E. et al. (2003). Memory impairment suggests hippocampal dysfunction in abstinent ecstasy users, *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, vol. 27, pp. 819-827.

Green, A. R. et al. (2003). The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”), *Pharmacological Reviews*, vol. 55, pp. 463-508.

Greer, G. e Strassman, R.J. (1985). Information on “ecstasy”, *Am. J. Psychiatry*, vol.142, p. 1391.

Grinspoon, L. e Bakalar, J. B. (1986). Can drugs be used to enhance the psychotherapeutic process?, *American Journal of Psychotherapy*, vol. 40, pp. 393-404.

Grinspoon, L. e Bakalar, J.B. (1986). Can Drugs be used to enhance the psychotherapeutic process, *Am. J. Psychotherapy*, vol. 40, pp. 393-404.

Gudelsky, G. A. e Nash, J. F. (1996). Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions, *Journal of Neurochemistry*, vol. 66, pp. 243-249.

Gudelsky, G. A., Yamamoto, B. K. e Nash, J. F. (1994). Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by 5-HT₂ receptor agonists, *European Journal of Pharmacology*, vol. 264, pp. 325-330.

Hall, A. P. e Henry, J. A. (2006). Acute toxic effects of “Ecstasy” (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management, *British Journal Anaesthesia*, vol. 96, pp. 678-685.

Hatzidimitriou, G., McCann, U. D. e Ricaurte, G. A. (1999). Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery, *Journal of Neuroscience*, vol. 15, pp. 5096-5107.

Henry, J. (1992). Ecstasy and the dance of death, *British Medical Journal*, vol. 350, pp. 5-6.

Hewitt, K. e Green, A. (1994). Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA (“Ecstasy”) to rats, *Neuropharmacology*, vol. 33, pp. 1589-1595.

Hiramatsu, M. et al. (1990). Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct, *Journal of Pharmacology an Experimental Therapeutics*, vol. 254, pp. 521-527.

Ho, E., Karimi-Tabesh, L. e Koren, G. (2001). Characteristics of pregnant women who use Ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine), *Neurotoxicology Teratology*, vol. 23, pp. 561-567.

Insel, T. R. et al. (1989). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”) selectivity destroys brain serotonin terminal in rhesus monkeys, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 249, pp. 713-720.

IDT, (2008). Relatório anual, 2008 – A situação do País em matéria de Drogas e Toxicodependências, Tendências por Drogas – Ecstasy, *Instituto da Droga e Toxicodependência I.P.*

Irvine, R. J. et al. (2005). Plasma drug concentrations and physiological measures in “dance party” participants, *Neuropsychopharmacology*, vol. 31, pp. 424-430.

Itzhak, Y. et al. (2003). Relevance of MDMA (“Ecstasy”) induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice, *Psychopharmacology*, vol. 166, pp. 241-248.

Jacobsen, L. K. et al. (2004). Preliminary evidence of hippocampal dysfunction in adolescent MDMA (“ecstasy”) users: possible relationship to neurotoxic effects, *Psychopharmacology*, vol.173, pp. 383-390.

Jensen, K. F. et al. (1993). Mapping toxicant induced nervous system damage with a cupric silver stain: a quantitative analysis of neural degeneration induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *NIDA Research Monographs*, vol. 136, pp. 133-149 (discussion 150-154).

Jimenez, A. et al. (2004). Neurotoxicity of amphetamine derivatives is mediated by caspase pathway activation in rat cerebellar granule cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 196, pp. 223-234.

Jones, D. C. et al. (2005). Serotonergic Neurotoxic Metabolites of Ecstasy Identified in Rat Brain, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 313, pp. 422-431.

Kil, H., Zhang, J. e Piantadosi, C. (1996). Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 16, pp. 100-106.

Kish, S. J. (2002). How strong is the evidence that brain serotonin neurons are damaged in human users of ecstasy?, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 71, pp. 845-855.

Kish, S. J. et al. (2000). Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user, *Neurology*, vol. 55, pp. 294-296.

Kleiner, H. E. et al. (1998). Immunochemical detection of quinol-thioether derived covalent protein adducts, *Chemical Research in Toxicology*, vol. 11, pp. 1283-1290.

Kramer, H. K., Poblete, J. C. e Azmitia, E. C. (1995). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) promotes translocation of protein kinase C (PKC): requirement of viable serotonin nerve terminals, *Brain Research*, vol. 680, pp. 1-8.

Kreth, K. et al. (2000). Identification of human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of “ecstasy” related designer drugs, *Biochemical Pharmacology*, vol. 59, pp. 1563-1571.

Krystal, J. H. et al. (1992). Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) use: effects on mood and neuropsychological function?, *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, vol. 18, pp. 331-341.

Krystal, J. H. et al. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist ketamine in humans, *Arch Gen Psychiatry*, vol. 51, pp. 199-214.

Kuhn, D. A. e Jr, R. A. (1997). Molecular Mechanism of the Inactivation of Tryptophan Hydroxylase by Nitric Oxide: Attack on Critical Sulfhydryls that Spare the Enzyme Iron Center, *Journal of Neuroscience*, vol. 17, pp. 7245-7251.

Lew, R. et al. (1996). Methylenedioxymethamphetamine induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part II: radioligand binding and autoradiography studies, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 276, pp. 855-865.

Liechti, M. E. e Vollenweider, F. X. (2000b). Acute psychological and physiological effects of MDMA (“Ecstasy”) after haloperidol pretreatment in healthy humans, *European Neuropsychopharmacology*, vol. 10, pp. 289-295.

Liu, Y. et al. (1997c). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *Journal of Neurochemistry*, vol. 69, pp. 581-593.

Logan, S. C. et al. (1993). Survival following “Ecstasy” ingestion with a peak temperature of 42°C, *Anaesthesia*, vol. 48, pp. 1017-1018.

Malberg, J. e Seiden, L. (1998). Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat, *Journal of Neuroscience*, vol. 18, pp. 5086-5094.

Malberg, J., Sabol, K. e Seiden, L. (1996). Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxic produces different effects on body temperature in the rat, *Journal of Neuroscience*, vol.278, pp. 258-267.cute

Marston, H. M. et al. (1999). Behavioral analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat, *Psychopharmacology*, vol. 144, pp. 67-76.

Maurer, H. H. et al. (2000). Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine derived designer drugs (“ecstasy”), *Toxicology Letters*, vol. 113, pp. 133-142.

McCann, U. D. et al. (1994). Serotonin neurotoxicity after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy): a controlled study in humans, *Neuropsychopharmacology*, vol. 10, pp. 129-138.

McCann, U. D. et al. (1998). Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA (“Ecstasy”) on brain serotonin neurons in human beings, *The Lancet*, vol. 352, pp. 1433-1437.

McCann, U. D. et al. (1999a). Cognitive performance in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) users: a controlled study, *Psychopharmacology*, vol. 143, pp. 417-425.

McCann, U. D. et al. (1999b). Altered neuroendocrine and behavioral responses to m-chlorophenylpiperazine in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users, *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 147, pp. 56-65.

McCann, U. D., Slate, S. O. e Ricaurte, G. A. (1996). Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”), *Drug Safety*, vol. 15, pp. 107-115.

McElhatton, P. R. et al. (1999). Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure, *The Lancet*, vol. 354, pp. 1441-1442.

McGuire, P. (2000). Long-term psychiatric and cognitive effects of MDMA use, *Toxicology Letters*, vol. 112, pp. 153-156.

Mckenna, D.J. e Peroutka, S.J. (1990). Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4 – methylenedioxi-methamphetamine (MDMA, “Ecstasy”), *J. Neurochem*, vol.54, pp.14-22.

Meyer, J. S. et al. (2004). Neurotoxic effects of MDMA (“ecstasy”) administration to neonatal rats, *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 22, pp. 261-271.

Miller, R. T., Lau, S. S. e Monks, T. J. (1996). Effects of Intracerebroventricular Administration of 5-(Glutathion-S-yl)-a-methyldopamine on Brain Dopamine, Serotonin and Norepinephrine Concentrations in Male Sprague-Dawley Rats, *Chemical Research in Toxicology*, vol. 9, pp. 457-465.

Miyazaki, I. et al. (2006). Methamphetamine induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone formation related molecules, *The FASEB Journal*, vol. 20, pp. 571-573.

Moeller, F. G. et al. (2004). Functional MRI study of working memory in MDMA users, *Psychopharmacology*, vol. 177, pp. 185-194.

Molliver, M. E. et al. (1990). Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 600, pp. 649-664.

Monks, T. J. e Lau S. S. (1997). Biological Reactivity of Polyphenolic-Glutathione Conjugates, *Chemical Research in toxicology*, vol. 10, pp. 1296-1313.

Monks, T. J. et al. (2004). The role of metabolism in 3,4-methylenedioxi-methamphetamine (Ecstasy) toxicity, *Therapeutic Drug Monitoring*, vol. 26, pp. 132-136.

Morgan, M. (2000). Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects, *Psychopharmacology*, vol. 152, pp. 230-248.

Morgan, M. et al. (2002). Ecstasy (MDMA): are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence?, *Psychopharmacology*, vol. 159, pp. 294-303.

Morgan, M. et al. (2006). Elevated Impulsivity and Impaired Decision Making in Abstinent Ecstasy (MDMA) Users Compared to Polydrug and Drug-naïve Controls, *Neuropsychopharmacology*, vol. 31, pp. 1562-1573.

Morton, J. (2005). Ecstasy: pharmacology and neurotoxicity, *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 5, pp. 79-86.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to the proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, pp. 55-63.

Nash, J. F. e Yamamoto, B. K. (1992). Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *Brain Research*, vol. 581, pp. 237-243.

Nash, J. F., Meltzer, H. Y. e Gudelsky, G. A. (1990). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens, *Journal of Neurochemistry*, vol. 54, pp. 1062-1067.

Nature Reviews/Neuroscience. [em linha]. Disponível em <<http://www.nature.com/nrn/journal/v4/n1/images/nrn1008.fl.jpg>>. [consultado em 12/2010].

Nichols, D. E. (2004). Hallucinogens, *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 101, pp. 131-181

OEDT, (2006). *Evolução do consumo de droga em contextos recreativos*, Tema específico, *Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência*, Lisboa.

OEDT, (2009). Relatório Europeu de Drogas 2009, *Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência*, Lisboa.

O’Callaghan, J. P. e Miller, D. B. (1994). Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 270, pp. 741-751.

O’Hearn, E. et al. (1988). Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity, *Journal of Neuroscience*, vol. 8, pp. 2788-2803.

O’Shea, E. et al. (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*, vol. 37, 919-926.

O’Shea, E. et al. (2001). Effect of GBR12909 and fluoxetine on the acute and long-term changes induced by MDMA (“ecstasy”) on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain, *Neuropharmacology*, vol. 40, pp. 65-74.

O’Shea, E. et al. (2005). Elevation of Ambient Room Temperature has Differential Effects on MDMA Induced 5-HT and Dopamine Release in Striatum and Nucleus Accumbens of Rats, *Neuropsychopharmacology*, vol. 30, pp. 1312-1323.

O’Shea, E. et al. (2006). MDMA induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature, *British Journal of Pharmacology*, vol. 148, pp. 778-785.

Obradovic, T., Imel, K. M. e White, S. R. (1996). Methylenedioxymethamphetamine induced inhibition of neuronal firing in the nucleus accumbens is mediated by both serotonin and dopamine, *Neuroscience*, vol. 74, pp. 469-481.

Obrocki, J. et al. (1999). Ecstasy long-term effects on the human central nervous system revealed by positron emission tomography, *British Journal of Psychiatry*, vol. 175, pp. 186-188.

Pannu, R. e Singh, I. (2006). Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: Neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms, *Neurochemistry International*, vol. 49, pp. 170-182.

Paris, J. M. e Cunningham, K. (1992). Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *Brain Research Bulletin*, vol. 28, pp. 115-119.

Parrott, A. C. e Lasky, J. (1998). Ecstasy (MDMA) effects upon mood and cognition: before, during and after a Saturday night dance, *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 139, pp. 261-268.

Parrott, A. C. et al. (1998). Cognitive performance in recreational users of MDMA of ‘ecstasy’: evidence for memory deficits, *Journal of Psychopharmacology*, vol. 12, pp. 79-83.

Pentney, A.R. (2001). An exploration of the history and controversies surrounding MDMA and MDA, *J. Psychoactive Drugs*, vol.33, pp. 213-221.

Price, L. H. et al. (1989). Neuroendocrine and mood responses to intravenous L-tryptophan in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users. Preliminary observations, *Archives of General Psychiatry*, vol. 46, pp. 20-22.

Quednow, B. B. et al. (2006). Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction, *Journal of Psychopharmacology*, vol. 20, pp. 373-384.

Ramamoorthy, S. e Blakely, R. D. (1999). Phosphorylation and Sequestration of Serotonin Transporters Differentially Modulated by Psychostimulants, *Science*, vol. 285, pp. 763-766.

Ramamoorthy, S. et al. (1998). Phosphorylation and Regulation of Antidepressant-sensitive Serotonin Transporters, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, pp. 2458-2466).

Reneman, L. et al. (2001). Effects of dose, sex and long-term abstinence from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons, *The Lancet*, vol. 358, pp. 1864-1869.

Reneman, L. et al. (2002a). The acute and chronic effects of MDMA (“Ecstasy”) on cortical 5-HT_{2A} receptors in rat and human brain, *Neuropsychopharmacology*, vol. 26, pp. 387-396).

Reneman, L. et al. (2002b). Validity of [¹²³I]beta-CIT SPECT in detecting MDMA induced serotonergic neurotoxicity, *Synapse*, vol. 46, pp. 199-205.

Ricaurte, G. A. et al. (1988a). Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration, *Brain Research*, vol. 446, pp. 165-168.

Ricaurte, G. A. et al. (1988b). 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates, *Brain Research*, vol. 474, pp. 359-363.

Ricaurte, G. A. et al. (1988c). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in non-human primates, *Journal of the American Medical Association*, vol. 260, pp. 51-55.

Ricaurte, G. A. et al. (1992). Lasting effects of (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on central serotonergic neurons in nonhuman primates: neurochemical observations, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 261, pp. 616-622.

Robert, R. F., Chris-Ellyn, J. e Manuel, E. T. (2005). Thermoregulatory effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans, *Psychopharmacology*, vol. 183, pp. 248-256.

Rodgers, J. (2000). Cognitive performance amongst recreational users of “ecstasy”, *Psychopharmacology*, vol 151, pp. 19-24.

Sabol, K. E. et al. (1996). Methylenedioxymethamphetamine induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part I: synaptosomal uptake and tissue concentrations, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 276, pp. 846-854.

Sanchez, V. et al. (2001). The mechanisms involved in long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA (“ecstasy”) induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain, *British Journal of Pharmacology*, vol. 134, pp. 46-57.

Scanzello, C. R. et al. (1993). Serotonergic recovery after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine injury: observations in rats, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 264, pp. 1484- 1491.

Schmidt, C. (1987). Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 240, pp. 1-7.

Schmidt, C. e Taylor, V. (1987). Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine, *Biochemical Pharmacology*, vol. 36, pp. 4095-4102.

Schmidt, C. e Taylor, V. (1988). Direct central effects of acute methylenedioxyamphetamine on serotonergic neurons, *European Journal of Pharmacology*, vol. 156, pp. 121-131.

Schmidt, C. e Taylor, V. (1990). Reversal of the acute effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine by 5-HT uptake inhibitors, *European Journal of Pharmacology*, vol. 181, pp. 133-136.

Schmidt, C. et al. (1990a). selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxyamphetamine in rats, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 255, pp. 478-483.

Schmidt, C., Black, C. e Taylor, V. (1990b). Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of methylenedioxyamphetamine, *European Journal of Pharmacology*, vol. 181, pp. 59-70.

Schmued, L. (2003). Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA, *Brain Research*, vol. 974, pp. 127-133.

Segura, M. et al. (2001). 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) metabolite in humans, *Chemical Research in toxicology*, vol. 14, pp. 1203-1208.

Semple, D. M. et al. (1999). Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA (“ecstasy”) users, *British Journal of Psychiatry*, vol. 175, pp. 63-69.

Shankaran, M. e Gudelsky, G. A. (1998). Effect of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) on hippocampal dopamine and serotonin, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 61, pp. 361-366.

Shankaran, M. e Gudelsky, G. A. (1999). A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration, *Psychopharmacology*, vol. 147, pp. 66-72.

Shankaran, M., Yamamoto, B. K. e Gudelsky, G. A. (1999a). Involvement of the SERT in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *European Journal of Pharmacology*, vol. 385, pp. 103-110.

Shankaran, M., Yamamoto, B. K. e Gudelsky, G. A. (1999b). Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum, *Journal of Neurochemistry*, vol. 72, pp. 2516-2522.

Shulgin, A.T. e Nichols, D.E. (1978). Characterization of three new psychomimetics. In: *The Psychopharmacology of Hallucinogens*. New York, Pergamon Press, Stillman and Willette, eds, pp. 74-83.

Slikker, W. J. et al. (1988). Neurochemical and neurohistological alterations in the rat and monkey produced by orally administered methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 96, pp. 448-457.

Siegel R.K. (1986). MDMA: non-medical use and intoxication, *Journal Psychoactive Drugs*, 18, pp.349-354.

Silva, J. e Tavares, M. (1999). “Ice” e “Ecstasy”: Os estimulantes do final do milénio. Perspectivas Clínica e Experimental, *Revista Portuguesa de Psicossomática*, vol.1 (nº2/Julho/Dezembro), pp. 31-58.

Slicker, W. J. et al. (1988). Neurochemical and neurohistological alterations in the rat and monkey produced by orally administered methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 96, pp. 448-457.

Spanos, L. J. e Yamamoto, B. K. (1989). Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-)MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in rat, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 32, pp. 835-840.

Sprague, J. E. e Nichols, D. E. (1995a). Inhibition of MAO-B protects against MDMA induced neurotoxicity in the striatum, *Psychopharmacology*, vol. 118, pp. 357-359.

Sprague, J. E. e Nichols, D. E. (1995b). The monoamine oxidase-B inhibitor L-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 273, pp. 667-673.

Sprague, J. E., Everman, S. L. e Nichols, D. E. (1998). An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *Neurotoxicology*, vol. 19, pp. 427-441.

Stone, D. M. et al. (1986). The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain, *European Journal of Pharmacology*, vol. 128, pp. 41-48.

Stone, D. M. et al. (1987b). Immediate and long-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on serotonin pathways in brain of rat. *Neuropharmacology*, vol. 26, pp. 1677-1683.

Stone, D. M. et al. (1988). Role of endogenous dopamine in central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 247, pp. 79-87.

Stone, D. M. et al. (1989). Acute inactivation of tryptophan hydroxylase by amphetamine analogs involves the oxidation of sulfhydryl sites, *European Journal of Pharmacology*, vol. 7, pp. 93-97.

Stone, D. M., Hanson, G. R. e Gibb J. W. (1987a). Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats, *Neuropharmacology*, vol. 26, pp. 1657-1661.

Stumm, G. et al. (1999). Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons, *The FASEB Journal*, vol. 13, pp. 1065-1072.

Szabo, Z. et al. (2002). Comparison of (+)-(11)C-McN5652 and (11)C-DASB as serotonin transporter radioligands under various experimental conditions, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 43, pp. 678-692.

Tamburini, I. et al. (2006). MDMA Induces Caspase-3 Activation in the Limbic System but not in Striatum, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1074, pp. 377-381.

Veryheyden, S. L. et al. (2002). Sub-acute effects of MDMA (\pm 3,4-methylenedioxymethamphetamine “ecstasy”) on mood: evidence of gender differences. *Psychopharmacology*, vol. 161, pp. 23-31.

Vollenweider, F. X. et al. (1998). Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA (“ecstasy”) in MDMA-naïve healthy volunteers, *Neuropsychopharmacology*, vol. 19, pp. 241-251.

Wareing, M. et al. (2005). Visuo-spatial working memory deficits in current and former users of MDMA (‘ecstasy’), *Human Psychopharmacology*, vol. 20, pp. 115-123.

Wareing, M., Fisk, J. E. e Murphy, P. N. (2000). Working memory deficits in current and previous users of MDMA (‘ecstasy’), *British Journal of Psychology*, vol. 91 (Pt 2), pp. 181-188.

White, S. R. et al. (1996). The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”) on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system, *Progress in Neurobiology*, vol. 49, pp. 455-479.

White, S. R., Duffy, P. e Kalivas, P. W. (1994). Methylenedioxymethamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens in vivo, *Neuroscience*, vol. 62, pp. 41-50.

Wolff, K. et al. (1995). Contents of “ecstasy”, *Lancet*, vol. 346, pp. 1100-1101.

Wu, C-W. et al. (2007). Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 220, pp. 243-251.

Yamamoto, B. K., Nash, J. F. e Gudelsky, G. A. (1995). Modulation of methylenedioxymethamphetamine induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 273, pp. 1063-1070.

Yeh, S. Y. e Hsu, F-L. (1991). The neurochemical and stimulatory effects of putative metabolites of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 39, pp. 787-790.

Yuan, J. et al. (2002). Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity, *Journal of Neurochemistry*, vol. 80, pp. 960-969.

Zanger, U. M., Raimundo, S. e Eichelbaum, M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry, *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 369, pp. 23-37.

Zheng, Y. e Lavery, R. (1998). Role of brain nitric oxide in (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity in rats, *Brain Research*, vol. 795, pp. 257-263.