

Daniel Gomes Esteves da Silva

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA  
BIOACTIVAÇÃO METABÓLICA NO EFEITO  
HIPONATRÉMICO DA  
3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA  
("ECSTASY")**

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

**2008**



Os estudos apresentados nesta dissertação foram realizados no Laboratório associado REQUIMTE/Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Estes estudos contaram com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e do Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional (FEDER) (POCI/SAL-FCT/57187/2004).



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

Orientador:

Professora Doutora Helena Maria Ferreira da Costa Ferreira Carmo



**Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam nas seguintes comunicações**

Daniel Gomes, Helena Carmo, Félix Carvalho, Fernando Remião, Maria de Lourdes Bastos, Paula Branco, Luísa Ferreira, Paula Guedes de Pinho. Gas-Chromatography-Mass Spectrometry Method for Simultaneous Measurement of MDMA (Ecstasy) and its Metabolites HMA, MDA and HMMA in Plasma and Urine. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia; XXV Reunião de Farmacologia Clínica e VII Reunião de Toxicologia, Coimbra, 5 a 7 de Dezembro de 2007.

Helena Carmo, Daniel Gomes, Félix Carvalho, Fernando Remião, Maria de Lourdes Bastos, Paula Branco, Luísa Ferreira, Paula Guedes de Pinho. Optimized GC-MS/MS quantification of MDMA (ecstasy) and its metabolites HMA, MDA, and HMMA in different matrices for toxicological applications. AOAC Europe Section International Workshop and the II Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia, Lisboa, Abril 2008.



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Helena Maria Ferreira da Costa Ferreira Carmo, minha orientadora, são dirigidos os meus primeiros agradecimentos pelo entusiasmo, confiança, amizade e enorme saber científico com que sempre me orientou.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, Professor Doutor Félix Dias Carvalho ao Professor Doutor Fernando Remião e à Engenheira Maria Elisa Soares, pelo incondicional apoio científico, pelo estímulo, pela amizade e pelo salutar ambiente humano proporcionado no Laboratório de Toxicologia.

À Professora Doutora Eduarda Fernandes que contribuiu através da execução da técnica de purificação da MDMA a partir de formulações apreendidas pela Policia Judiciária.

À Doutora Paula Guedes pelo apoio na técnica de GS-MS e pelos ensinamentos sobre a validação de métodos quantitativos.

À Dra. Helena Pontes e Dra. Vera Costa pelo apoio na execução do trabalho experimental, pela troca de ideias, pelo apoio, pela amizade e pelo salutar ambiente humano proporcionado no Laboratório de Toxicologia. À Dra. Renata Silva tenho também a agradecer a contribuição directa para a formatação e edição desta dissertação.

À Técnica Júlia Caraméz agradeço a disponibilidade sempre demonstrada no Laboratório de Toxicologia.

À Dra. Maria José Coelho, proprietária da Farmácia Central de Ovar, pela flexibilidade que permitiu a minha disponibilidade de tempo para a execução deste trabalho.

A todos os meus amigos que sempre me acompanharam, agradeço o apoio e o constante incentivo.

Aos meus pais, ao meu irmão e à Sofia que sempre me acompanharam durante estes anos de estudo, agradeço o apoio, a amizade e o amor que tornaram possível este trabalho. A eles dedico esta dissertação.

## Resumo

### Estudo do envolvimento da bioactivação metabólica no efeito hiponatrémico da 3,4-metilenodioximetanfetamina (“ecstasy”)

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; “ecstasy”), tal como outras anfetaminas, tem sido considerada por muitos como sendo uma “droga segura”. No entanto estão descritas na literatura muitas respostas de toxicidade, reacções adversas e mortes relacionadas com a sua ingestão recreativa.

Um dos seus efeitos adversos, potencialmente fatal, é a hiponatrémia. Este efeito foi relacionado com alterações na secreção da hormona antidiurética (ADH, AVP ou arginina-vasopressina) desencadeadas pela MDMA. A hiponatrémia foi apontada como causa possível para numerosas intoxicações severas e por vezes fatais decorrentes da ingestão desta droga. Estudos recentes *in vivo*, em humanos saudáveis do sexo masculino, e *in vitro*, em hipotálamo isolado de rato, demonstraram que a bioactivação metabólica da MDMA, nomeadamente a desmetilação seguida pela O-metilação do catecol resultante, é crucial para a libertação da AVP quer *in vivo* quer *in vitro*.

Para a avaliação da contribuição desta via metabólica para a expressão *in vivo* do efeito de hiponatrémia causado pela ingestão da MDMA, é crucial quantificar estes metabolitos e relacionar o perfil metabólico com a magnitude do efeito hiponatrémico.

Com este objectivo, foi desenvolvido e validado um método de GC-MS/MS para a quantificação da MDMA e dos seus principais metabolitos, metilenodioxianfetamina (MDA), 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA) e 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), no plasma e na urina.

Para melhor compreender a influência da MDMA e da sua bioactivação na secreção da AVP foram realizados estudos *in vivo* em ratos Wistar machos e fêmeas, aos quais foi administrada MDMA na dose 20 mg/kg.

Nos estudos realizados 1 hora após a administração de MDMA foram avaliados os níveis plasmáticos de AVP e as concentrações plasmáticas da MDMA e dos metabolitos MDA, HMA e HMMA. Com estas quantificações foi possível observar, nos ratos de ambos os géneros, o aumento estatisticamente significativo dos níveis de AVP em relação aos animais controlo, ao mesmo tempo que não se detectaram correlações

estatisticamente significativas entre os níveis de AVP a MDMA e os metabolitos MDA, HMA e HMMA.

Nos estudos realizados 24 horas após a administração de MDMA foram avaliados os níveis plasmáticos e urinários de AVP e as concentrações urinárias de MDMA, MDA, HMA e HMMA. Os resultados destas determinações demonstraram que apesar de não se detectarem diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de AVP entre os animais tratados e os animais controlo, existem diferenças estatisticamente significativas para as concentrações urinárias de AVP, verificando-se que os animais tratados com MDMA apresentam concentrações urinárias de AVP superiores. Além disso verificou-se também que os animais tratados excretaram menos urina relativamente à água ingerida, mostrando o efeito anti-diurético desencadeado pela AVP. Neste estudo foram também estabelecidas correlações positivas e estatisticamente significativas entre os níveis de AVP e as concentrações de MDMA, MDA, HMA e HMMA. A correlação com maior significado estatístico foi estabelecida com o metabolito HMMA.

Estes resultados permitiram pela primeira vez demonstrar a secreção da AVP em ratos após a administração da MDMA. Com estes estudos foi possível observar, *in vivo*, não só as alterações da secreção da AVP induzidas pela MDMA mas também as consequências dessas alterações nomeadamente na resposta antidiurética e o envolvimento desta resposta no efeito de hiponatremia. Finalmente foi possível observar a contribuição da bioactivação metabólica para a secreção de AVP.

Estes resultados permitem assim compreender melhor o envolvimento da MDMA e do seu metabolismo na resposta hiponatrémica.

## Abstract

### **The role of metabolic bioactivation in the Hyponatremic effect caused by 3,4-methylenedioxyamphetamine (“ecstasy”)**

Although considered as “safe drugs” by many, exaggerated responses and deaths have been reported due to 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA; ecstasy) abuse. One of the adverse effects associated with ecstasy intoxications is hyponatremia that has been related with a disruption on the release of the antidiuretic hormone (ADH or arginine-vasopressin) and pointed out as the possible cause of numerous severe and fatal intoxications after intake of this drug. Recent *in vivo* studies with human healthy volunteers and also *in vitro* studies performed with rat isolated hypothalamus have shown that the metabolic bioactivation of MDMA, namely its demethylenation followed by O-methylation of the resulting catechol metabolite are crucial for the release of ADH both *in vivo* and *in vitro*.

For the evaluation of the contribution of this metabolic pathway to the *in vivo* expression of the hyponatremic effect of MDMA it is crucial to quantify these metabolites, and to relate the metabolic profile with the magnitude of the hyponatremic effect.

For this purpose, a GC-MS/MS method was developed to quantify MDMA and its main metabolites: methylenedioxyamphetamine (MDA), 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA) and 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA), in plasma and urine.

To better understand the influence of MDMA and its metabolic bioactivation in the secretion of AVP *in vivo* studies were performed with male and female Wistar rats, the MDMA dose tested was 20 mg/kg.

In the studies performed 1 hour after the MDMA administration the plasmatic levels of AVP and the plasmatic concentrations of MDMA, MDA, HMA and HMMA were evaluated. The plasmatic concentrations of AVP obtained with the treated animals were compared with the concentrations obtained with the controls showing a statistically significant increase of AVP levels in the animals treated with MDMA. Correlations

between the MDMA, MDA, HMA and HMMA and the AVP plasmatic levels were also preformed. No significant correletions were obtained.

In the studies preformed 24 hours after the administration of MDMA the urinary and plasmatic levels of AVP were evaluated. The concentration of MDMA, MDA, HMA and HMMA were determined in plasma and urine. It was also established the ratio between the volume of ingested water and the volume of excreted urine. The plasmatic and urinary AVP concentrations obtained in the treated animals were compared with the concentrations obtained from the controls. This compairison showed significant increases of the urinary AVP levels in the treated animals. The evaluation of the correlations between the urinary concentrations of AVP and the urinary concentrations of MDMA, MDA, HMA and HMMA showed significant correlations between AVP and MDMA, MDA, HMA and HMMA. The evaluation of the ratio between the volume of ingested water and the volume of excreted urine showed that the treated animals excreted less urine in comparison with the ingested water.

The studies performed with urines collected 24 hours after MDMA administration have shown significant positive correlations between AVP and the concentrations of MDMA, MDA, HMA and HMMA. The strongest correlation was established between the concentrations of HMMA and AVP.

With this study it was possible to confirm the *in vivo* changes in the AVP secretion profile and relate those changes with the levels of MDMA, MDA, HMA and HMMA.

It was also shown for the first time the induction of the secretion of AVP in male and female rats, one hour after the administration of MDMA. The consequent antidiuretic effect can be related with the hiponatremic effect.



## ÍNDICE GERAL

<b>1. CAPÍTULO I - Introdução</b> .....	<b>3</b>
1.1. Enquadramento .....	3
1.2. Objectivos do Trabalho .....	4
1.3. Estrutura da Dissertação .....	5
<b>2. CAPÍTULO II - 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) - Revisão Geral</b> <b>10</b>	
2.1. Introdução .....	10
2.1.1. Padrão de utilização .....	11
2.1.2. Características físico-químicas da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) .....	13
2.1.3. Relação estrutura-actividade .....	14
2.2. Farmacologia da MDMA .....	17
2.2.1. MDMA e Sistema Serotonérgico .....	17
2.2.2. MDMA e Sistema Dopaminérgico .....	19
2.2.3. MDMA e Sistema Adrenérgico .....	20
2.2.4. Resposta Neuroendócrina .....	20
2.2.5. Resposta Imune .....	21
2.2.6. Efeito no Sistema Termorregulador .....	21
2.2.6.1. Farmacologia e patofisiologia da resposta hipertérmica .....	22
2.3. Toxicocinética da MDMA .....	24
2.3.1. Absorção e Distribuição .....	24
2.3.2. Metabolismo da MDMA .....	26
2.3.3. Excreção .....	29
2.3.4. Farmacogenética – O polimorfismo genético e a MDMA .....	30
2.3.5. Interações Farmacodinâmicas e Farmacocinéticas com a MDMA .....	31
2.4. Neurotoxicidade da MDMA .....	33
2.4.1. Mecanismos que desencadeiam a Neurotoxicidade .....	35
2.4.1.1. Metabólitos tóxicos da MDMA e Formação de Radicais Livres, ROS e RNS .....	35
2.4.2. Acumulação de Dopamina – ROS, RNS e Stress Oxidativo .....	38
2.4.2.1. Serotonina – activação de receptores 5-HT <sub>2A</sub> .....	40

2.4.2.2.	Excitotoxicidade – Envolvimento do glutamato e/ou do monóxido de azoto (NO) na neurotoxicidade da MDMA .....	40
2.4.2.3.	Envolvimento da Hipertermia nos Mecanismos de Neurotoxicidade .....	42
2.4.2.4.	Alteração da Função Mitocondrial potencia a Neurotoxicidade..	43
2.4.3.	Efeitos Neuropsiquiátricos da MDMA .....	44
2.4.3.1.	Efeitos Agudos .....	44
2.4.3.1.1.	Síndrome serotoninérgica.....	44
2.4.3.2.	Efeitos Crônicos .....	45
2.4.3.2.1.	Efeitos Crônicos Cognitivos e na Memória .....	46
2.4.3.2.2.	Efeitos Crônicos Psiquiátricos .....	47
2.4.4.	Explicação mecanística para as alterações de memória, cognitivas e psiquiátricas.....	48
2.5.	Toxicidade Não Neuronal .....	49
2.5.1.	Toxicidade Hepática .....	49
2.5.1.1.	Catecolaminas .....	50
2.5.1.2.	MDMA e metabolitos .....	52
2.5.1.3.	Hipertermia.....	53
2.5.1.4.	Apoptose .....	54
2.5.2.	Sistema Cardiovascular .....	55
2.5.3.	Sistema Imunitário .....	56
2.5.4.	Rim.....	58
2.5.5.	Músculo .....	61
2.6.	Conclusões .....	62
3.	<b>CAPÍTULO III - Hiponatremia e MDMA.....</b>	<b>67</b>
3.1.	Hiponatremia .....	67
3.1.1.	Arginina-Vasopressina.....	67
3.1.2.	Importância da Vasopressina (AVP) na Hiponatremia.....	67
3.1.3.	Classificação da Hiponatremia.....	68
3.1.3.1.	Hiponatremia Hipovolémica.....	69
3.1.3.2.	Hiponatremia Euvolémica .....	69
3.1.3.3.	Hiponatremia Hipervolémica .....	70
3.2.	Hiponatremia desencadeada pela MDMA .....	71
3.3.	Conclusões .....	75

<b>4. CAPÍTULO IV - Validação do método de Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS/MS) para a quantificação simultânea da MDMA e dos seus metabolitos MDA, HMA e HMMA em plasma e urina.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1. Introdução .....</b>	<b>78</b>
<b>4.2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>79</b>
4.2.1. Materiais utilizados .....	79
4.2.2. Matriz para análise.....	79
4.2.3. Soluções Padrão .....	80
4.2.4. Reacção de Hidrólise Enzimática.....	80
4.2.4.1. Técnica para hidrólise da urina .....	80
4.2.4.2. Técnica para hidrólise do plasma.....	81
4.2.5. Isolamento dos Compostos de Interesse - Extracção em Fase Sólida (SPE) .....	81
4.2.5.1. Técnica para a Extracção em Fase Sólida.....	81
4.2.6. Derivatização por perfluoroacilação.....	82
4.2.6.1. Técnica para a derivatização .....	82
4.2.7. Cromatografia Gasosa com detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS/MS).....	83
<b>4.3. Validação do Método.....</b>	<b>88</b>
4.3.1. Calibração .....	88
4.3.1.1. Técnica para a preparação das amostras para as curvas de calibração .....	89
4.3.1.1.1. Urina .....	89
4.3.1.1.2. Plasma.....	89
4.3.2. Precisão.....	89
4.3.3. Exactidão .....	90
4.3.4. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	90
4.3.5. Avaliação do Rendimento do Procedimento de Extracção .....	91
<b>4.4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>92</b>
4.4.1. Curvas de Calibração e Linearidade .....	92
4.4.2. Precisão.....	93
4.4.3. Exactidão .....	95
4.4.4. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	96

4.4.5.	<b>Rendimento do Procedimento de Extração</b> .....	97
4.5.	<b>Conclusão</b> .....	97
5.	<b>CAPÍTULO V - Indução da Secreção da Vasopressina pela MDMA</b> .....	101
5.1.	<b>Introdução</b> .....	101
5.2.	<b>Materiais e Métodos</b> .....	101
5.2.1.	<b>Materiais utilizados</b> .....	101
5.2.2.	<b>Animais</b> .....	102
5.2.2.1.	<b>Protocolo experimental para animais sacrificados uma hora após a administração de MDMA</b> .....	102
5.2.2.2.	<b>Protocolo experimental para animais sacrificados 24h após a administração da MDMA</b> .....	103
5.2.2.3.	<b>Administração da MDMA</b> .....	104
5.2.2.4.	<b>Técnica de colheita de sangue</b> .....	105
5.2.3.	<b>Quantificação da AVP</b> .....	105
5.2.3.1.	<b>Princípio do método</b> .....	105
5.2.3.2.	<b>Técnica de extração</b> .....	106
5.2.3.3.	<b>Técnica para a quantificação</b> .....	106
5.2.3.4.	<b>Cálculos</b> .....	108
5.2.4.	<b>Quantificação da MDMA e dos metabolitos MDA, HMA e HMMA</b> .....	109
5.2.5.	<b>Análise estatística</b> .....	109
5.3.	<b>Resultados</b> .....	110
5.3.1.	<b>Efeitos da MDMA sobre os níveis plasmáticos de AVP em fêmeas 1h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%</b> .....	110
5.3.2.	<b>Efeitos da MDMA sobre os níveis plasmáticos de AVP em machos 1h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%</b> .....	111
5.3.3.	<b>Efeitos da MDMA sobre os níveis plasmáticos de AVP em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%</b> .....	113
5.3.4.	<b>Efeitos da MDMA na concentração urinária de AVP em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%</b> .....	114
5.3.5.	<b>Efeitos da MDMA na excreção de urina em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%</b> .....	116

---

5.3.6.	Efeitos da MDMA na razão entre o volume de água ingerida e o volume de urina excretada em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%.....	117
5.3.7.	Estudo das correlações entre concentrações de AVP e as concentrações de MDMA, MDA, HMA e HMMA .....	119
5.3.7.1.	Correlações entre as concentrações plasmáticas de AVP e as concentrações plasmáticas de MDMA, MDA, HMA e HMMA quantificadas 1h após a administração da MDMA (20 mg/kg) em fêmeas.....	119
5.3.7.2.	Correlações entre as concentrações urinárias de AVP e as concentrações urinárias de MDMA, MDA, HMA e HMMA para as fêmeas sacrificadas 24h após a administração da MDMA (20 mg/kg).....	120
5.4.	Discussão .....	121
5.4.1.	Efeito da MDMA na concentração plasmática da AVP (1h após a administração) .....	121
5.4.2.	Efeito da MDMA na concentração plasmática da AVP (24h após a administração) .....	122
5.4.3.	Efeito da MDMA na excreção de urina (24h após a administração).....	123
5.4.4.	Correlações entre as concentrações de AVP e as concentrações de MDMA, MDA, HMA e HMMA em fêmeas .....	123
6.	CAPÍTULO VI – Conclusões Gerais .....	129
7.	CAPÍTULO VII – Bibliografia.....	133



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estruturas dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina, e estruturas de três compostos relacionados: mescalina, MDA e MDMA.....	<b>14</b>
<b>Figura 2</b> - Estrutura geral das feniletilaminas e das fenilisopropilaminas pertencentes ao grupo das arilalquilaminas.....	<b>15</b>
<b>Figura 3</b> - Exemplo de um alucinogénio: 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina (DOM) e de um entactogénio: 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA).....	<b>15</b>
<b>Figura 4</b> - Metabolismo da MDMA. Representação das vias metabólicas. ....	<b>27</b>
<b>Figura 5</b> – Aductos com a glutatona.....	<b>29</b>
<b>Figura 6</b> - Vias metabólicas responsáveis pela formação de metabolitos neurotóxicos.....	<b>37</b>
<b>Figura 7</b> - Envolvimento da dopamina na neurotoxicidade mediada pela MDMA. Adaptado de Sprague et al. (1998). ....	<b>39</b>
<b>Figura 8</b> – Metabolitos resultantes da conjugação com glutatona.....	<b>53</b>
<b>Figura 9</b> - Mecanismo responsável pela Imunossupressão mediada pela MDMA. Adaptado de Connor (2004). ....	<b>58</b>
<b>Figura 10</b> - Metabolitos resultantes da conjugação com a glutatona. ....	<b>59</b>
<b>Figura 11</b> - Via de destoxificação do conjugado com a glutatona: 5-(glutation-S-il) $\alpha$ -MeDA.....	<b>60</b>
<b>Figura 12</b> – Reacção genérica de derivatização com o reagente anidrido trifluoroacético em meio de acetato de etilo, obtendo-se derivados O-TFA e N-TFA.....	<b>82</b>
<b>Figura 13</b> - Espectro de massa do derivado N-TFA da MDMA. ....	<b>85</b>
<b>Figura 14</b> - Espectro de massa do derivado N-TFA da MDA.....	<b>86</b>
<b>Figura 15</b> - Espectro de massa do derivado N-TFA e O-TFA da HMMA.....	<b>86</b>
<b>Figura 16</b> - Espectro de massa do derivado N-TFA e O-TFA da HMA. ....	<b>87</b>
<b>Figura 17</b> - Espectro de massa do derivado N-TFA e O-TFA da 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina. ....	<b>87</b>
<b>Figura 18</b> – Cromatograma de uma amostra de plasma obtido em modo "Selected Ion" com os seguintes iões: m/z=135, m/z=162 para a MDMA e MDA; m/z=140, m/z=260 para a HMA; m/z=154, m/z=260 para a HMMA; m/z=232 para o PI. Os tempos de retenção foram: PI (7,0 min); HMA (7,5 min); MDA (7,8 min); HMMA (8,2min) e MDMA (8,7 min). ....	<b>88</b>

<b>Figura 19</b> - Sistema circulatório venoso do rato. A punção para recolha de amostra foi realizada na veia cava inferior. ....	<b>104</b>
<b>Figura 20</b> - Curva de calibração para a quantificação da AVP. ....	<b>108</b>
<b>Figura 21</b> - Efeito da MDMA sobre concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (**P≤0,01 vs controlo). ....	<b>111</b>
<b>Figura 22</b> - Efeito da MDMA sobre concentração plasmática de AVP em machos Wistar sacrificados 1h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (*P≤0,05 vs controlo). ....	<b>112</b>
<b>Figura 23</b> - Efeito da MDMA sobre concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão. ....	<b>114</b>
<b>Figura 24</b> - Efeito da MDMA sobre a concentração urinária de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (*P≤0,05 vs controlo). ....	<b>115</b>
<b>Figura 25</b> - Efeito da MDMA sobre a excreção de urina em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (**P≤0,01 vs controlo). ....	<b>117</b>
<b>Figura 26</b> - Efeito da MDMA sobre a excreção de urina em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados como a razão entre o volume de água ingerido e o volume de urina excretada, sob a forma de média±erro padrão (**P≤0,001 vs controlo). ....	<b>118</b>

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Isoenzimas do citocromo P450 envolvidas no metabolismo da MDMA e MDA (Maurer et al. 2000).....	<b>31</b>
<b>Tabela 2</b> - Etiologias da hiponatremia com origem na perda de sódio (adaptado de Verbalis, 2007). .....	<b>69</b>
<b>Tabela 3</b> - Etiologias da hiponatremia com origem na diluição (adaptado de Verbalis, 2007).....	<b>70</b>
<b>Tabela 4</b> - Resumo de Casos Clínicos de intoxicação com MDMA em que ocorreu hiponatremia. ....	<b>74</b>
<b>Tabela 5</b> - Estrutura dos analitos e do padrão interno derivatizados, com proposta do padrão de fragmentação (Pizarro et al. 2002).....	<b>84</b>
<b>Tabela 6</b> - Iões seleccionados para a quantificação dos analitos por GC-MS/MS. ....	<b>85</b>
<b>Tabela 7</b> - Estudo da linearidade. Curvas de Calibração e coeficientes de correlação obtidos. ....	<b>92</b>
<b>Tabela 8</b> - Precisão intra-dia do método de GC-MS/MS e do método de extracção para as duas matrizes. ....	<b>93</b>
<b>Tabela 9</b> - Precisão inter-dia do método GC-MS/MS para as duas matrizes. ....	<b>94</b>
<b>Tabela 10</b> - Exactidão do método GC-MS/MS para as duas matrizes. ....	<b>95</b>
<b>Tabela 11</b> – Limites de quantificação para todos os analitos, nas duas matrizes, em modo “Full-Scan” e em modo “ $\mu$ SIS”.....	<b>96</b>
<b>Tabela 12</b> - Rendimento do procedimento de extracção por SPE. ....	<b>97</b>
<b>Tabela 13</b> - Resumo do procedimento experimental para a quantificação da AVP. ...	<b>107</b>
<b>Tabela 14</b> - Concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%. ....	<b>110</b>
<b>Tabela 15</b> - Concentração plasmática de AVP em machos Wistar sacrificados 1h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%. ....	<b>112</b>
<b>Tabela 16</b> - Concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%. ....	<b>113</b>
<b>Tabela 17</b> – Concentração urinária de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%. ....	<b>115</b>
<b>Tabela 18</b> – Volume de urina excretada em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%. ....	<b>116</b>

<b>Tabela 19</b> – Razão entre o volume de água ingerida e o volume de urina excretada em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%. .....	<b>118</b>
<b>Tabela 20</b> - Correlação entre as concentrações plasmáticas de AVP e as concentrações plasmáticas da MDMA, MDA, HMA e HMMA para as fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração da MDMA (20 mg/kg). .....	<b>119</b>
<b>Tabela 21</b> - Correlação entre as concentrações urinárias de AVP e as concentrações urinárias da MDMA, MDA, HMA e HMMA para as fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração da MDMA (20 mg/kg). .....	<b>120</b>

**ABREVIATURAS**

**5-HIAA** – ácido 5-hidroxiindolacético

**5-HT** – 5-hidroxitriptamina ou serotonina

**ADP** – adenosina difosfato

**AMPA** – 2-amino-3-(3-hidroxi-5-etilisoxazol-4-il)propionato

**ATP** – adenosina trifosfato

**AUC** – área sob a curva num gráfico de concentração plasmática em função do tempo

**AVP ou ADH** – Arginina Vasopressina ou Hormona Antidiurética

**Bcl-x<sub>L</sub>** – proteína reguladora da apoptose com acção anti-apoptótica

**CK** – creatinina fosfocínase

**COMT** – catecol-O-metil transferase

**CSWS** – Síndrome da perda de sal cerebral ou “Cerebral salt wasting syndrome”

**CYP** – isoenzima do citocromo P450

**DA** – dopamina

**DHHA** – ácido 3,4-dihidroxihipúrico

**DHPA** – dihidroxifenilacetona

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**DO** – densidade óptica

**DOB** – 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-1-aminoetano

**DOM** – 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina

**DOPAC** – ácido dihidroxifenilacético

**EIA** – imunensaio enzimático

**ESPAD** – “European School Survey Project on Alcohol and other Drugs”

**GABA** – ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GC-MS/MS** – Cromatografia gasosa com espectrometria de massa

**GOT** – transaminase glutamica-oxaloacética

**GPX** – glutationa peroxidase

**GR** – glutationa redutase

**GSH** – glutationa reduzida

**GSSG** – glutationa oxidada

**GST** – glutationa-S-transferase

**HBSC** – “Health Behaviour in School aged Children”

**HHA ou  $\alpha$ -MeDA** – 3,4-dihidroxi-anfetamina ou  $\alpha$ -metildopamina

**HHMA ou N-Me- $\alpha$ -MeDA** – 3,4-dihidroxi-metanfetamina ou N-metil- $\alpha$ -metildopamina

**HMA** – 4-hidroxi-3-metoxianfetamina

**HMHA** – ácido 4-hidroxi-3-metoxihipúrico

**HMMA** – 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina

**HMPA** – 4-hidroxi-3-metoxifenilacetona

**HVA** – ácido homovanílico

**IDT** – Instituto da Droga e da Toxicodependência

**IL** – interleucina

**L-NAME** – inibidor da óxido nítrico sintetase: N(G)-nitro-L-arginina

**LOD** – limite de detecção ou “Limit of detection”

**LOQ** – limite de quantificação ou “Limit of quantification”

**LSD** – Dietilamida do ácido lisérgico

**MAO** – monoamina oxidase

**MAOI's** – inibidores da monoaminaoxidase

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

**MDA** – 3,4-metilenodioxianfetamina

**MDBA** – 3,4-metilenodioxibutylanfetamina

**MDEA** – N-etil-3,4-metilenodioxianfetamina

**MDHA** – ácido 3,4-metilenodioxihipurico

**MDMA** – 3,4-metilenodioximetanfetamina

**mRNA** – ácido ribonucleico mensageiro

**NA** – noradrenalina

**NAC** – N-acetilcisteína

**NF- $\kappa$ B** – factor de transcrição nuclear

**NMDA** – receptor metabotrópico do glutamato: N-metil-D-aspartato

**OEDT** – Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PARP** – poli(ADP-ribose)-polimerase

**PCA** – p-cloroanfetamina

**PET** – Tomografia por Emissão de Positrões

**PI** – Padrão interno

**PIPAC** – piperonilacetona

**pNpp** – p-nitrofenil fosfato

**R-(-)-MDMA** – estereoisómero levrógiro da 3,4-metilenodioxianfetamina

**RAVALT** – “Rey Auditory Verbal Learning Test”

**RNS** – espécies reactivas de azoto

**ROS** – espécies reactivas de oxigénio

**S-(+)-MDMA** – estereoisómero dextrógiro da 3,4-metilenodioxianfetamina

**SERT** – transportador pré-sináptico da serotonina

**SIADH** – Síndrome da Secreção Inapropriada da Hormona Antidiurética

**SPE** – Extração em fase sólida ou “Solid Phase Extraction”

**SPECT** – Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único

**SSRI's** – inibidores selectivos da recaptção da serotonina

**TFAA** – anidrido trifluoroacético

**T<sub>max</sub>** – tempo ao qual se atinge a concentração plasmática mais elevada após a administração

**TNF- $\alpha$**  – factor de necrose tumoral  $\alpha$

**TPH** – triptofano hidroxilase

**UV** – Ultra Violeta



# Capítulo I

## Introdução



## 1. CAPÍTULO I - Introdução

### 1.1. Enquadramento

A MDMA e seus efeitos tóxicos têm sido alvos de estudo do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. A MDMA é também conhecida como “ecstasy” mas, nas formulações apreendidas, é muito frequente a presença de outras substâncias incluindo outras anfetaminas que, no seu conjunto, aumentam a imprevisibilidade da utilização deste tipo de drogas (Parrott 2004).

A pertinência destes estudos prende-se com os elevados graus de incidência da utilização recreativa da MDMA (“ecstasy”) e dos efeitos tóxicos subsequentes à ingestão desta droga de abuso.

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) existiram 8,5 milhões de utilizadores de “ecstasy” no ano de 2004 (Organização Mundial de Saúde, 2004). Na Europa, o relatório anual de 2007 do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) revelou que para os jovens adultos entre os 15-34 anos a prevalência da “ecstasy” variou entre 0,5 e 14,6% (Relatório Anual 2006 do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, 2006). Na realidade portuguesa, os estudos do Instituto da Droga e da Toxicodependência (IDT) mostraram que a prevalência do uso da ecstasy em 2001 foi de 0,9% na população dos 15 aos 34 anos. O relatório anual de 2006 do IDT mostrou que a prevalência nos alunos do 3º Ciclo do Ensino Básico foi de 1,6% (Relatório Anual de 2006 do Instituto da Droga e da Toxicodependência, 2006). Tal como adiante se irá referir, existem alguns sinais da redução da prevalência de consumo da “ecstasy”. No entanto, novas formas de a utilizar têm surgido, nomeadamente através da associação de outras substâncias que podem agravar os efeitos tóxicos da droga.

A popularidade desta droga está associada à falsa ideia de inocuidade e aos seus efeitos psicoactivos. A acção da MDMA desencadeia sentimentos de empatia, aumenta a auto-estima e a autoconfiança, com ausência ou quase ausência de efeitos alucinogénios. Estas características levaram a que esta droga fosse classificada como entactogénica (Shulgin & Nichols 1978).

A incidência de factores adversos e de toxicidade é imprevisível e relativamente frequente, muitas vezes com morbidade e mortalidade associadas. Os utilizadores

recreativos com mais experiência facilmente identificam as reacções adversas desta droga (Green et al. 2003).

Este trabalho enquadra-se no estudo sobre os efeitos neuroendócrinos da MDMA e dos seus metabolitos. Pretende-se contribuir para a melhor compreensão da hiponatremia como efeito tóxico desencadeado pela MDMA. O efeito hiponatremico está relacionado com a alteração da secreção da hormona antidiurética (ADH, AVP ou arginina-vasopressina) o que justifica o estudo da influência da MDMA na secreção dessa hormona.

## **1.2.Objectivos do Trabalho**

O objectivo deste trabalho consistiu no estudo do efeito da MDMA na secreção da AVP e o envolvimento dos seus metabolitos 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 4-hidroxi-3-metoxiamfetamina (HMA) e 4-hidroxi-3-metoximetamfetamina (HMMA) neste efeito. Com este objectivo dois trabalhos foram executados. O primeiro consistiu na validação de um método de GC-MS/MS para a quantificação simultânea da MDMA e dos metabolitos em questão em plasma e urina. O segundo trabalho consistiu nos ensaios *in vivo* executados em ratos Wistar machos e fêmeas.

Em resumo os objectivos dos trabalhos foram:

**1º Trabalho:** Validar um método de GC-MS/MS para a quantificação simultânea da MDMA, MDA, HMA e HMMA.

**2º Trabalho:** Demonstrar, *in vivo*, o aumento da libertação de AVP com a administração de MDMA. Estudar a correlação entre o perfil metabólico e a expressão do efeito hiponatremico. Averiguar possíveis diferenças de género na expressão do efeito.

### 1.3. Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está dividida em 6 capítulos:

– CAPÍTULO I: Introdução

– CAPÍTULO II: MDMA “Ecstasy” – Revisão Geral

Neste capítulo faz-se uma revisão sobre a história da MDMA, desde a sua descoberta até à utilização recreativa como droga de abuso. São também referidas as características químicas, as relações estrutura-actividade, a farmacocinética, bem como os mecanismos de acção farmacológicos e os efeitos tóxicos. No que diz respeito às manifestações de toxicidade da MDMA são abordadas a neurotoxicidade e a toxicidade não neuronal, referindo os principais alvos de toxicidade.

– CAPÍTULO III: MDMA e Hiponatrémia

Neste capítulo, no âmbito da toxicidade neuroendócrina, é abordado em particular o efeito de hiponatrémia desencadeado pela MDMA. São referidos o envolvimento e a importância da arginina-vasopressina, bem como a importância de outros efeitos típicos da MDMA que contribuem para o desencadear do efeito hiponatrémico.

– CAPÍTULO IV: Validação do Método GC-MS/MS para a Quantificação da MDMA, MDA, HMA e HMMA.

Neste capítulo faz-se a descrição da validação de um novo método para a quantificação da MDMA, MDA, HMA e HMMA em plasma e urina.

– CAPÍTULO V: Estudos *in vivo* da Influência da MDMA na Secreção da AVP

Neste capítulo descrevem-se os estudos *in vivo* realizados em ratos injectados intraperitonealmente com MDMA na dose de 20 mg/kg e sacrificados 1 hora e 24 horas após a administração. Foram depois quantificados a AVP e os metabolitos no plasma de todos os animais e nas urinas dos animais sacrificados 24h depois da administração.

Neste capítulo descrevem-se os protocolos experimentais utilizados nos estudos *in vivo* assim como os resultados obtidos e a respectiva discussão.

– CAPÍTULO VI: Conclusões Gerais

Neste capítulo são apresentadas as conclusões resultantes da execução dos trabalhos experimentais.

– CAPÍTULO VII: Referências Bibliográficas



Capítulo II  
3,4-metilenodioximetanfetamina  
(MDMA)  
Revisão Geral



## **2. CAPÍTULO II - 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) - Revisão Geral**

### **2.1.Introdução**

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) foi originalmente sintetizada em 1912 pela indústria química Merck. Por essa altura o composto não foi sujeito a testes farmacológicos já que foi desenvolvido apenas como um precursor da síntese de substâncias hemostáticas (Freudenmann et al. 2006). Em consequência do interesse por substâncias semelhantes à adrenalina surgem, em 1927, os primeiros estudos farmacológicos realizados pela Merck e em 1952 são realizados, testes toxicológicos. Só a partir de 1960 começam a surgir publicações regulares sobre a MDMA (Freudenmann et al. 2006) e em 1970 ocorre a primeira identificação de MDMA em comprimidos apreendidos nas ruas de Chicago (Freudenmann et al. 2006).

Os primeiros estudos em humanos foram realizados em 1978 por Shulgin & Nichols com o objectivo de caracterizar a actividade simpaticomimética da MDMA (Shulgin & Nichols 1978).

Durante as décadas de 70 e 80 ocorreu a disseminação da MDMA como droga de abuso e, em 1984, surge na Califórnia a designação de “ecstasy” (Freudenmann et al. 2006). A generalização do uso fez com que, em 1985, esta substância fosse classificada nos EUA como “Schedule I controled substance”, ou seja, a MDMA passa a ser colocada no grupo das substâncias de abuso não seguras e sem utilidade terapêutica (Freudenmann et al. 2006).

No entanto, antes desta classificação restritiva surgiram algumas tentativas de utilização terapêutica da MDMA, nomeadamente como coadjuvante terapêutico dada a sua capacidade para aumentar a introspecção e induzir sentimentos de confiança e empatia entre pacientes e terapeutas (Green et al. 2003).

As características específicas da MDMA, no que respeita aos efeitos sobre as emoções e empatia, levaram a que Nichols sugerisse a inclusão deste composto numa nova classe de compostos. Os seus efeitos são distintos dos compostos representativos dos alucinogénios como a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e a mescalina. Assim foi sugerida a nova classe dos entactogénios que incluiu a metilenodioxianfetamina (MDA)

e a MDMA, e que corresponde às substâncias praticamente sem acção alucinogénia, mas com capacidade de actuar sobre as emoções e empatia. Estes efeitos são únicos e traduzem-se em excitação, estado de alerta, auto-confiança, diminuição da sensação de fadiga, boa disposição, euforia e sentimento de proximidade e de ligação emocional com as outras pessoas (de la Torre et al. 2004a; Nichols 1986).

### **2.1.1. Padrão de utilização**

A utilização da MDMA remonta a meados dos anos 70 como consequência da descoberta dos seus efeitos psico-activos pelo bioquímico americano Shulgin (Shulgin & Nichols 1978). As primeiras utilizações da MDMA ocorreram em sessões de psicoterapia, já que os efeitos sobre a comunicabilidade dos pacientes foram considerados positivos ao facilitar as relações entre o terapeuta e o doente (Greer & Tolbert 1986). Ao mesmo tempo que surgiu a utilização terapêutica, ocorreu também o início da utilização recreativa (Parrott 2001). A utilização terapêutica foi gradualmente abandonada durante os anos 70 e a MDMA foi abolida e classificada como ilegal em diversos países nomeadamente, no Reino Unido em 1977, e nos EUA em 1985 (Karlsen et al. 2007). Apesar das restrições, a popularidade da MDMA como droga de abuso cresceu. Em meados dos anos 80 esta era a droga mais utilizada nas festas de dança conhecidas como “raves”. A subcultura rave e as respectivas festas com multidões em espaços pequenos e com música electrónica impulsionaram a rápida expansão da utilização recreativa da MDMA. O baixo preço e os efeitos entactogénios, associados à falsa ideia de inocuidade contribuíram também para a disseminação desta droga (Cole & Sumnall 2003; Parrott 2001).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, estima-se que em 2004 existiram 8,5 milhões de utilizadores de “ecstasy” (Organização Mundial de Saúde, 2004).

Nos EUA o Instituto Nacional para o Abuso de Drogas (The National Institute of Drug Abuse, 2004) relatou em 2004 que os utilizadores mais frequentes da “ecstasy” são os jovens e que existem 11 milhões de pessoas a partir dos 12 anos de idade que utilizaram “ecstasy” pelo menos uma vez durante a sua vida. Em inquéritos, realizados por este instituto, que questionaram a utilização de “ecstasy” foi possível estimar que em 2004 existiram cerca de 450 mil utilizadores nos 30 dias anteriores ao questionário

(National Institute of Drug Abuse. Monitoring the Future: National Results on Adolescent Drug Use, 2005). Embora exista ainda uma elevada prevalência da “ecstasy” como droga de abuso verificou-se, nos Estados Unidos, que entre 2001 e 2005, ocorreu uma redução global da utilização da “ecstasy” (United States National Institute of Drug Abuse, 2005).

No caso da realidade europeia, acompanhada pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, verifica-se que, em 2007, a Europa continua a ser o principal centro de Produção de “ecstasy”. No relatório anual de 2007 do Observatório constata-se que, das drogas leves, a “ecstasy” continua a ser, a seguir à cannabis, a segunda droga mais prevalente e estima-se que, em média, cerca de 3% dos adultos europeus tenha utilizado “ecstasy” pelo menos uma vez na vida.

Na Europa, à semelhança do que acontece nos EUA, o consumo da “ecstasy” é predominantemente juvenil. Nas faixas etárias entre os 15-34 anos as taxas de consumo variam nos vários países da comunidade entre 0,5-14,6%. As taxas de prevalência mais elevadas correspondem a áreas urbanas. É também importante referir que de 1995 a 2005 as taxas de prevalência em jovens com idades compreendidas entre os 15 e 16 anos aumentaram. Finalmente, o relatório anual de 2007 do Observatório indica que, em geral, a prevalência da “ecstasy” pode estar a estabilizar ou até a diminuir, sendo este fenómeno detectável em países como o Reino Unido e a Espanha onde a incidência de “ecstasy” é habitualmente elevada (Relatório Anual 2007 do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, 2007).

A realidade portuguesa mostra que a prevalência de uso da “ecstasy” em 2001 foi de 0,9% na população dos 15 aos 34 anos e foi semelhante à prevalência da cocaína e da heroína (Instituto da Droga e da Toxicodependência, 2001). No estudo ESPAD (European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs) verificou-se que na população escolar portuguesa do 3º Ciclo do Ensino Básico, as prevalências de utilização em 1999 e 2003 foram respectivamente de 2,3% e 4% mostrando uma tendência crescente. Esta tendência inverteu-se entre 2002 e 2006 tal como demonstrou o estudo HBSC/OMS – (Health Behaviour in School-aged Children 2006). Este trabalho mostrou que, em 2002, 2,2% dos alunos sujeitos ao inquérito utilizaram “ecstasy” pelo menos uma vez na vida, tendo havido em 2006 uma redução desta prevalência para 1,6%. (Relatório Anual de 2006 do Instituto da Droga e da Toxicodependência, 2006).

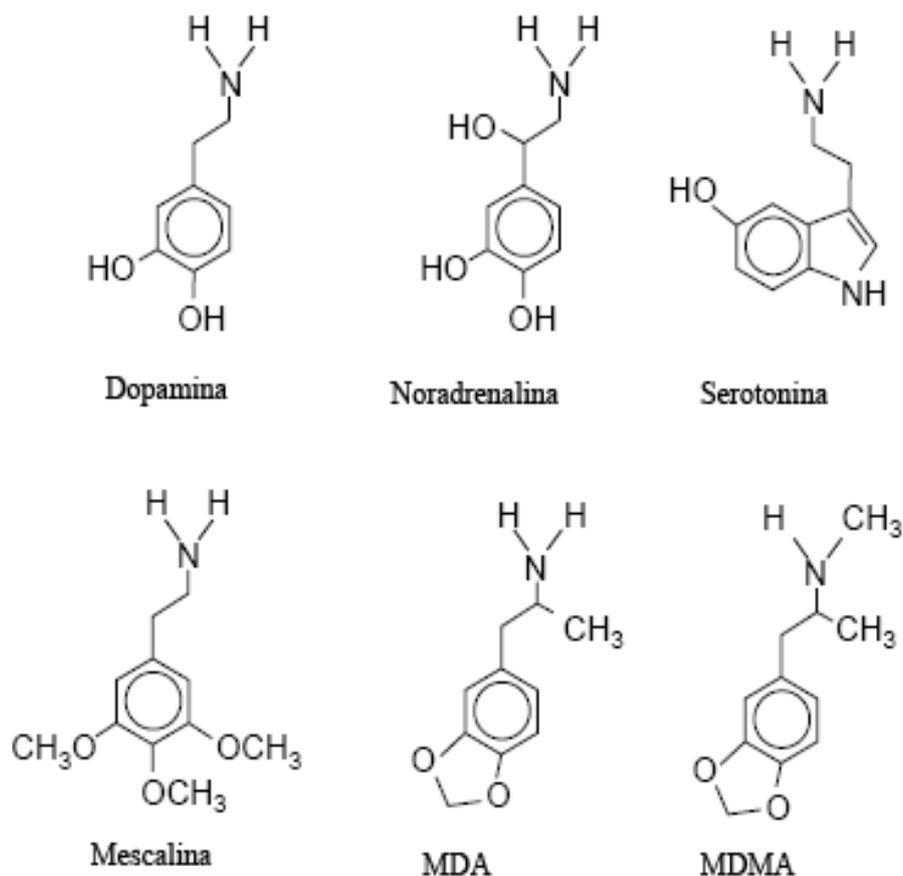
### 2.1.2. Características físico-químicas da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)

A MDMA (CAS 42542-10-9) é uma feniletetilamina incluída no grupo das fenilisopropilaminas (Figura 1). As várias designações reflectem a sua estrutura e também as suas acções biológicas. Assim, esta molécula pode ser conhecida por: “ecstasy”; Speed; Adam; Meth; MDMA; 3,4-metilenodioximetanfetamina; N-metil-3,4-metilenodioxianfetamina, N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-aminopropano; 3,4-metilenodiox-N- $\alpha$ -dimetil- $\beta$ -feniletetilamina, ou  $\alpha$ -dimetil-1,3-benzodioxol-5-etanamina.

Sendo a sua fórmula molecular  $C_{11}H_{15}NO_2$ , o seu peso molecular é de 193,25 unidades de massa atómica. Esta molécula apresenta um centro quiral podendo existir dois enantiómeros: o S-(+)-MDMA e R-(-)-MDMA, que podem ser encontrados em separado ou em mistura racémica. No uso ilícito recorre-se à toma da mistura racémica. (de la Torre et al. 2004b)

Relativamente às características físico-químicas, esta substância, quando está sob a forma de base, apresenta-se como um óleo com ponto de ebulição entre 100 e 110 °C, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos. Na forma de sal, apresenta-se no estado sólido (cristais) ou como óleo de cor branca sendo solúvel em água e de gosto amargo (Shulgin 1986). O espectro do UV da MDMA apresenta um máximo de absorvência a 286 nm, típico do grupo metilenodioxifenilo. (Shulgin 1986)

Estão descritas na literatura seis vias de síntese da MDMA (Shulgin 1986). Para a produção ilícita da MDMA existem três vias mais utilizadas: a via de Leukart-Wallach, a via da aminação redutiva e a via baseada no uso do bromopropano (Piffl et al. 2005). A utilização destas vias sintéticas leva à formação não só de MDMA mas também de subprodutos tais como a 1,3-bis(3,4-metilenodioxifenil)-2-propanamina e a N-formil-1,3-bis(3,4-metilenodioxifenil)-prop-2-il-amina, ambos com capacidade de libertar serotonina para a fenda sináptica (Piffl et al. 2005).

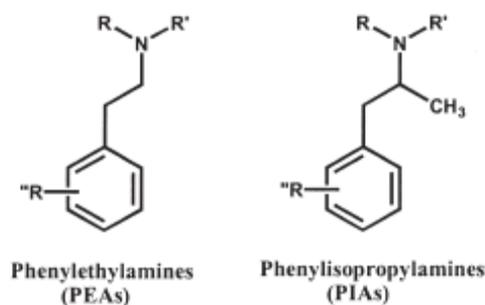


**Figura 1** - Estruturas dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina, e estruturas de três compostos relacionados: mescalina, MDA e MDMA.

### 2.1.3. Relação estrutura-atividade

A acção da MDMA é altamente dependente da sua estrutura e dos seus grupos funcionais. A estrutura assemelha-se, em termos espaciais, à das monoaminas neurotransmissoras, daí que os locais de acção sejam, de uma forma geral, comuns (Figura 2) (Glennon 1999).

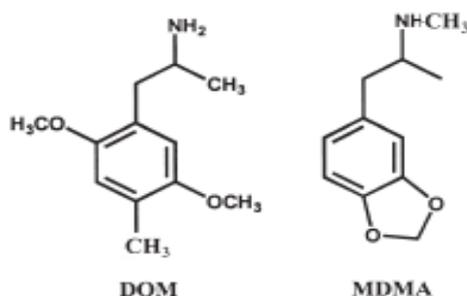
A MDMA é uma fenilisopropilamina incluída no grupo das arilalquilaminas. É uma molécula com estrutura química semelhante à da *d*-anfetamina e da mescalina o que lhe confere as propriedades de estimulante do sistema nervoso central, com acção alucinogénia apenas observável para doses muito elevadas (Glennon 1999).



**Figura 2** - Estrutura geral das feniletilaminas e das fenilisopropilaminas pertencentes ao grupo das arilalquilaminas.

Os derivados anfetamínicos têm por base a molécula da feniletilamina e distinguem-se pelos vários substituintes. Na sua generalidade, estes derivados apresentam acção estimulante do sistema nervoso central, mais evidenciada na anfetamina, e acção alucinogénia, típica da mescalina. Apesar da MDMA estar incluída neste grupo das arilalquilaminas, apresenta características distintas em relação às outras anfetaminas. Enquanto que a 2,5-dimetoxi-4-metilamfetamina (DOM) e a 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-1-aminoetano (DOB) são anfetaminas com acção alucinogénia, a MDMA e a N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina (MBDB) apresentam características únicas nomeadamente, ausência parcial ou total de efeitos alucinogénios e capacidade para aumentar o poder de introspecção e de sentimentos de empatia (Figura 3) (Nichols 1986). Assim, tal como já foi referido, a classificação utilizada para categorizar estas substâncias foi reformulada e acrescentada de um novo grupo: os **entactogénios** (Nichols 1986).

A MDA é uma substância se enquadra no grupo dos entactogénios mas que tem uma acção alucinogénia mais intensa que a MDMA (Nichols 1986).



**Figura 3** - Exemplo de um alucinogénio: 2,5-dimetoxi-4-metilamfetamina (DOM) e de um entactogénio: 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA).

O interesse em estabelecer relações de estrutura-actividade surgiu alguns anos após a redescoberta da MDMA como droga de abuso. Mas, para que se estabeleçam relações entre a estrutura e a actividade de uma substância, é necessário conhecer e definir claramente o tipo de actividade biológica da molécula em estudo. No caso da MDMA, e da generalidade das drogas psicoactivas, não existe actividade biológica centrada num só alvo. Essas substâncias têm em geral uma actividade difusa e afectam vários receptores, enzimas e sistemas orgânicos, sendo o seu efeito o resultado de todas essas interacções (Nichols 1986). Este conjunto de factores dificultou os avanços no conhecimento das relações estrutura-actividade. Mesmo actualmente, apesar de estarem definidos alguns dos alvos da MDMA, são poucas as referências encontradas na literatura sobre esta área.

As características estruturais que distinguem a MDMA relativamente aos derivados anfetamínicos alucinogénios são três (Nichols & Oberlender 1989; Nichols & Oberlender 1990):

1. Substituição no anel aromático nas posições 3 e 4 por oposição às substituições nos carbonos 3, 4 e 5 ou 2, 4 e 5 dos derivados alucinogénios.
2. Presença do grupo metilo no grupo amina.
3. Estereoisómero mais activo é o S-(+)-MDMA por oposição aos derivados anfetamínicos alucinogénios em que o estereoisómero levrógiro corresponde ao mais potente.

De uma forma mais geral, Nichols & Oberlender (1989 e 1990) estabeleceram quatro princípios que permitem caracterizar os entactogénios e as anfetaminas alucinogénias:

1. Substituições na posição 3 e 4 do anel aromático nunca originam compostos alucinogénios. Com a excepção da MDA, esta substituição origina entactogénios.
2. A metilação do grupo amina atenua muito a actividade alucinogénia. Contudo, essa alteração não modifica muito a actividade entactogénia. A introdução do grupo etilo na amina não altera a actividade entactogénia.
3. Para os entactogénios a configuração estereoquímica mais activa corresponde à S enquanto que para os alucinogénios corresponde à R.
4. A substituição do grupo  $\alpha$ -metilo para um grupo  $\alpha$ -etilo remove o efeito alucinogénio mas não tem qualquer efeito nos entactogénios.

## **2.2. Farmacologia da MDMA**

A MDMA é uma molécula que tem uma interacção complexa com o organismo, já que actua em diversos sistemas biológicos. Os vários locais de acção desta substância incluem: o sistema serotoninérgico, o sistema dopaminérgico e o sistema adrenérgico, levando à libertação de neurotransmissores. Em consequência, a sua utilização desencadeia alterações patológicas afectando numerosos órgãos e sistemas fisiológicos. (Green et al. 2003)

### **2.2.1. MDMA e Sistema Serotoninérgico**

O sistema serotoninérgico é, em geral, considerado como o principal alvo da MDMA. No rato, a MDMA tem maior afinidade para os transportadores pré-sinápticos do sistema serotoninérgico (SERT) do que para os seus homólogos nos sistemas dopaminérgico e adrenérgico (Rothman & Baumann 2003).

Nos humanos, a MDMA tem maior afinidade para o transportador pré-sináptico da noradrenalina do que para o transportador da serotonina e da dopamina. (Han & Gu 2006). No entanto, no cérebro humano, a MDMA tem maior capacidade para a libertação de serotonina do que para a libertação de dopamina e noradrenalina (Verrico et al. 2005).

A ligação da MDMA ao transportador pré-sináptico inibe a recaptação da serotonina e permite o seu transporte através da membrana para a fenda sináptica. O mecanismo envolvido neste transporte é designado por difusão por permuta (Rudnick & Wall 1992; Simantov 2004). Na fenda sináptica, a MDMA liga-se competitivamente ao SERT sendo transportada por este para o interior do axónio onde é libertada. Aqui o local activo do transportador fica disponível para se ligar à serotonina deslocando-a depois através da membrana para o espaço extracelular (Rudnick & Wall 1992; Simantov 2004). No interior do terminal do axónio, ao atingir concentrações elevadas, a MDMA consegue entrar nas vesículas intraneuronais por difusão passiva (Green et al. 2003). Tratando-se de uma base fraca, conduz a um aumento do pH intravesicular e promove o efluxo de serotonina para o citosol, o que finalmente facilita o mecanismo de difusão

por permuta através do qual a serotonina sai para o espaço extracelular (Rudnick & Wall 1992).

O envolvimento do SERT no mecanismo de acção da MDMA pode facilmente ser evidenciado mediante a sua inibição com recurso a inibidores da recaptação da serotonina como, por exemplo, a fluoxetina. (Gudelsky & Nash 1996). A depleção de serotonina vesicular através da reserpina leva também à diminuição da libertação de serotonina (Sabol & Seiden 1998), o que mostra a importância da difusão passiva da MDMA no sentido intravesicular para a libertação final de serotonina.

A libertação de serotonina para o espaço extracelular leva à activação dos receptores serotoninérgicos. A activação de receptores pode também ocorrer por acção directa da MDMA já que é agonista dos receptores dos subtipos 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>. A activação dos receptores do subtipo 5-HT<sub>2A</sub> está relacionada com o efeito alucinogénio das anfetaminas. A MDMA tem um carácter pouco alucinogénio uma vez que é um agonista fraco do receptor do subtipo 5-HT<sub>2A</sub> (Green et al. 2003).

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

A triptofano hidroxilase é a enzima que catalisa o passo limitante da síntese da serotonina. Esta enzima é inibida *in vivo* após a administração de MDMA (Che et al. 1995; Johnson et al. 1989; Schmidt & Taylor 1987; Stone et al. 1989). Estudos realizados em ratos demonstram que a inibição da TPH pode ser detectada mesmo duas semanas após uma única administração de MDMA (Schmidt & Taylor 1987). No entanto, ensaios de inibição *in vitro* mostram que a MDMA não inibe directamente a TPH (Schmidt & Taylor 1987). Estudos com substâncias bloqueadoras do influxo de cálcio como a flunarizina demonstraram menor inibição da TPH após administração de MDMA (Johnson et al. 1989), indicando o possível envolvimento do influxo de cálcio no mecanismo de inibição enzimática. Estudos mais recentes mostram que o metabolismo da MDMA a uma quinona (Rattray 1991) pode levar à inibição da TPH por reacção entre a quinona e os grupos sulfidrilo da enzima. Esta hipótese é suportada pela possibilidade da enzima readquirir a actividade metabólica após reacção de redução em condições anaeróbias (Stone et al. 1989). Finalmente, demonstrou-se que a inibição desta enzima é dependente da temperatura ambiente: em ratos mantidos a temperaturas elevadas a administração de MDMA inibiu a TPH enquanto nos animais mantidos a temperaturas baixas a inibição não ocorreu (Che et al. 1995). Este fenómeno leva a crer

que o mecanismo de inibição da TPH pode depender também da presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de espécies reactivas de azoto (RNS) que estão presentes em maior quantidade a temperaturas elevadas (Colado et al. 1997).

Em relação à enzima catalítica monoamina oxidase, a MDMA actua como um inibidor competitivo. Inibe preferencialmente a MAO<sub>A</sub>, que é o tipo com maior afinidade para a serotonina, e inibe também a MAO<sub>B</sub>, prolongando a estimulação simpática (Leonardi & Azmitia 1994).

### 2.2.2. MDMA e Sistema Dopaminérgico

A libertação de Dopamina (DA) induzida pela MDMA foi demonstrada quer *in vivo* (Koch & Galloway 1997; Nash & Brodtkin 1991; Yamamoto et al. 1995; Yamamoto & Spanos 1988) quer *in vitro* (Schmidt et al. 1987).

A administração de MDMA a ratos desencadeia rapidamente, a nível do estriado, um aumento da concentração de dopamina e também a diminuição da concentração dos seus metabolitos, o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) (Colado et al. 1999). A diminuição aguda destes metabolitos pode ser em grande parte explicada pela inibição da MAO (Colado et al. 1999; Colado et al. 2004).

A nível cerebral, o envolvimento do transportador pré-sináptico na libertação da dopamina permanece controverso (Green et al. 2003). Foi demonstrado que o efeito da MDMA a nível serotoninérgico leva, pelo menos em parte, à activação das vias dopaminérgicas com libertação de dopamina (Gudelsky & Nash 1996). Além disso, a MDMA ao actuar como agonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> dos neurónios gabaérgicos (Nash 1990; Sprague et al. 1998) desencadeia a diminuição dos níveis de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) com a consequente estimulação da síntese e libertação de dopamina (Nash 1990; Yamamoto et al. 1995).

Crespi e colaboradores (1997) demonstraram que a libertação aguda de dopamina induzida pelas anfetaminas MDA, MDMA, MDEA e MDBA é um fenómeno dependente de influxo de cálcio através de canais de cálcio de tipo P (Crespi et al. 1997).

### 2.2.3. MDMA e Sistema Adrenérgico

Estudos *in vitro* demonstraram que a MDMA ao actuar em tecido cerebral do hipocampo e do estriado, desencadeia a libertação de noradrenalina (NA) sendo esta libertação bloqueada pela desipramina (bloqueador da recaptação neuronal da noradrenalina) (Fitzgerald & Reid 1990).

Tal como já se referiu, nos humanos, a MDMA tem maior afinidade para o transportador pré-sináptico da noradrenalina do que para o transportador da serotonina e da dopamina. (Han & Gu 2006). No entanto, *in vivo*, a importância da libertação de noradrenalina directamente pela acção da MDMA sobre os transportadores pré-sinápticos permanece pouco esclarecida podendo os efeitos sobre o sistema adrenérgico resultar de uma mediação indirecta por mecanismos serotoninérgicos (Green et al. 2003). Os efeitos cardiovasculares da MDMA detectados em humanos são contrariados essencialmente pela administração de citalopram, sugerindo que a libertação de NA (responsável por esses efeitos) resulta essencialmente da activação do sistema serotoninérgico e não da interacção directa da MDMA e/ou dos seus metabolitos com o sistema de recaptação da noradrenalina. (Liechti & Vollenweider 2000).

### 2.2.4. Resposta Neuroendócrina

A MDMA faz elevar os níveis de corticosterona e de prolactina. O aumento da corticosterona é dependente da dose. Pelo contrário, o aumento da prolactina não depende da dose. A utilização dos inibidores da recaptação da serotonina como: a quetanserina, mianserina ou fluoxetina atenuam a elevação de corticosterona causada pela MDMA, indicando que este mecanismo é dependente do sistema serotoninérgico. Os níveis de prolactina não são afectados pelos inibidores da recaptação da serotonina (Nash et al. 1988).

Burns e colaboradores verificaram também o aumento da secreção de aldosterona e renina após a administração de MDMA a ratos e sugeriram que este aumento se deveu à acção do sistema serotoninérgico (Burns et al. 1996).

Estudos *in vitro* usando tecido hipotalâmico de rato demonstraram que a MDMA leva ao aumento de oxitocina e vasopressina (AVP), sendo a resposta dependente da

dose (Forsling et al. 2001; Forsling et al. 2002). O aumento da vasopressina induzido pela MDMA foi relacionado com a ocorrência de hiponatremia acompanhada com edema cerebral, sendo esta uma resposta potencialmente fatal. Este mecanismo de toxicidade será abordado com mais pormenor no CAPÍTULO III - Hiponatremia e MDMA (Forsling et al. 2001; Forsling et al. 2002; Maxwell et al. 1994; Parr et al. 1997).

#### **2.2.5. Resposta Imune**

A administração de MDMA a ratos desencadeia um aumento dependente da dose de corticosterona (Nash et al. 1988) que é detectável 30 minutos após a administração (Connor et al. 1998). Apesar de este aumento já não ser detectável 6 horas após a administração (Connor et al. 1998), a contagem total de linfócitos aos 30 minutos e às 6 horas revelou uma redução em 50% do número total inicial. Além disso, verificou-se também a supressão da proliferação linfocitária induzida pela concavalina A (Connor et al. 1998). Estas observações sugerem que os utilizadores da MDMA podem estar sujeitos a imunossupressão.

Os estudos de Connor e colaboradores demonstraram que estas alterações funcionais desencadeadas pela MDMA só ocorrem com o aumento de corticosterona plasmática, logo é um efeito relacionado com a sua acção glucocorticoide (Connor 2004; Connor et al. 1998).

#### **2.2.6. Efeito no Sistema Termorregulador**

A alteração da temperatura corporal é um dos efeitos mais conhecidos da MDMA. A administração da MDMA a ratos colocados à temperatura ambiente (20-22 °C) produz uma resposta hipertérmica traduzida por aumentos de 1 a 2 °C da temperatura corporal. O pico desta resposta é detectado entre os 40 e os 60 minutos após a administração (Green et al. 2003).

A variação da temperatura corporal induzida pela MDMA depende da temperatura ambiente. Estudos de Malberg e Seiden em ratos Holtzman revelaram, após a administração de MDMA, respostas hipotérmicas para temperaturas ambientes de 20-22

°C e respostas hipertérmicas para os animais mantidos a 28-30 °C (Malberg & Seiden 1998). Outro estudo, em ratos, mostrou resposta hipertérmica para temperatura ambiente de 22 °C e resposta hipotérmica para 17 °C, mostrando que existe grande sensibilidade a pequenas variações da temperatura ambiente (Dafters & Lynch 1998).

As diferentes respostas dos animais à MDMA, em função da temperatura ambiente, estão relacionadas com os efeitos da MDMA nos mecanismos termorreguladores. Gordon e colaboradores executaram um estudo em ratos com o objectivo de determinar a actividade metabólica, quantificar a perda de água por evaporação e determinar a temperatura rectal em ratos mantidos a diferentes temperaturas ambiente. Os ratos mantidos a 10 °C apresentaram respostas hipotérmicas sem alterações na actividade metabólica. Por outro lado, os ratos mantidos a 20 e 30 °C apresentaram respostas hipertérmicas com grandes perdas de água por evaporação e com aumento da actividade metabólica (Gordon et al. 1991).

Um estudo mais recente sobre os mecanismos termorreguladores, detectou que a temperatura da cauda não varia após a administração de uma dose de MDMA (Mechan et al. 2002). Como a vasodilatação dos vasos sanguíneos da cauda é um mecanismo de perda de calor, este estudo sugere que a MDMA interfere com este mecanismo de termorregulação (Mechan et al. 2002). Esta descoberta está de acordo com a ausência de resposta hipertérmica nos animais mantidos a temperaturas baixas. Provavelmente, quando os ratos são mantidos a temperaturas baixas a perda dos mecanismos de termorregulação assume menor relevância na dissipação de calor, e a hipertermia não ocorre (Green et al. 2003).

#### **2.2.6.1. Farmacologia e patofisiologia da resposta hipertérmica**

A origem molecular da hipertermia é difusa, podendo estar relacionada com a acção da MDMA a nível do sistema nervoso central e a nível periférico.

Na comunidade científica é consensual a ideia de que a estimulação do sistema serotoninérgico desencadeia resposta hipertérmica. A utilização de L-triptofano com inibidores da monoaminaoxigenase (MAO) corresponde a um exemplo de uma associação pró-serotoninérgica capaz de aumentar a temperatura corporal (Grahame-Smith 1971). Outro exemplo é a hipertermia provocada pela droga de abuso p-cloroamfetamina (PCA) devido à sua capacidade de libertar serotonina (Colado et al.

1993). Assim, considerou-se que a hipertermia provocada pela MDMA teria origem na activação de receptores serotoninérgicos (Shankaran & Gudelsky 1999).

No entanto, apesar de a MDMA ter como alvo o sistema serotoninérgico, verificou-se que a hipertermia resulta da capacidade desta molécula libertar dopamina. A utilização dos antagonistas metisergida e ritanserina selectivos para os receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> respectivamente, não bloquearam a resposta hipertérmica da MDMA (Mechan et al. 2002). A dissociação entre a resposta hipertérmica e a estimulação serotoninérgica foi também confirmada pela utilização do inibidor da recaptação da serotonina, a fluoxetina. Esta molécula, capaz de inibir quase totalmente o aumento intracelular de serotonina, não teve qualquer efeito na resposta hipertérmica dos animais em estudo (Malberg et al. 1996).

A confirmação do envolvimento da dopamina na resposta hipertérmica surgiu quando a utilização do antagonista selectivo para os receptores da dopamina D<sub>1</sub>, SCH 23390, produziu uma resposta inibitória da hipertermia, tendo sido essa inibição dependente da dose (Mechan et al. 2002).

Além do envolvimento da dopamina é também conhecida a necessidade da activação do sistema nervoso simpático para desencadear a resposta hipertérmica. A administração de antagonistas para os receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e para os receptores adrenérgicos  $\beta_3$  atenuou a resposta hipertérmica quando usados separadamente. A co-administração dos dois tipos de antagonistas resultou no desaparecimento da resposta hipertérmica (Sprague et al. 2003). Este fenómeno pode estar relacionado com a inibição da vasoconstrição cutânea desencadeada pela MDMA (Pedersen & Blessing 2001).

O aumento da temperatura do organismo é acompanhado com aumentos significativos da temperatura do músculo esquelético, fenómeno que é revertido também pelo bloqueio dos receptores  $\beta_3$  (Sprague et al. 2003). As capacidades inibitórias dos antagonistas dos receptores  $\beta_3$  sobre a hipertermia muscular induzida pela MDMA sugere o envolvimento das proteínas de desacoplamento na termogénese induzida pela MDMA a nível do músculo (Rusyniak et al. 2005). De facto, ratos deficientes em proteína de desacoplamento 3 (UCP-3) não são sensíveis aos efeitos hipertérmicos da MDMA, sendo resistentes aos efeitos letais da hipertermia (Mills et al. 2003). Rusyniak e colaboradores mostraram que a MDMA desencadeia o desacoplamento da fosforilação oxidativa *in vivo*, mas o mecanismo permanece desconhecido. Estes estudos mostram que o desacoplamento ocorre através de

mecanismos indirectos logo independentes de efeitos directos da MDMA e dos seus metabolitos, resultando em reduções de ATP e fosfocreatina com a consequente hipertermia e rabdomiólise.

O eixo hipotálamo-pituitária-tiróide parece contribuir também para o fenómeno da hipertermia. A administração de MDMA a ratos sem hipotálamo ou sem tiróide não desencadeou resposta hipertérmica ocorrendo até uma resposta paradoxal de hipotermia (Sprague et al. 2003). Nesse estudo, a hipertermia foi fortemente associada à tiroxina (hormona  $T_4$ ) já que nos animais tiroidectomizados a administração de tiroxina reactivou a hipertermia induzida pela MDMA (Sprague et al. 2003). Foi então proposto um mecanismo em que o sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-pituitária-tiróide são activados pela MDMA e que através dos agonistas  $\beta$ , agonistas  $\alpha$ , e tiroxina desencadeiam hipertermia pela activação das proteínas de desacoplamento (Sprague et al. 2003).

## **2.3. Toxicocinética da MDMA**

### **2.3.1. Absorção e Distribuição**

A MDMA é uma amina que pode existir como base livre ou como sal de vários ácidos. Os utilizadores recreativos desta substância recorrem normalmente a sais que são solúveis em água e que podem ser administrados por via oral, inalatória ou intravenosa. A via de administração mais comum é a via oral, através da ingestão de comprimidos em dose única (Kalant 2001).

Vários estudos mostram que as dosagens mais comuns variam entre os 80 e os 150 mg de MDMA e que os utilizadores mais experientes podem repetir a administração mais do que uma vez ao longo de cada utilização. Na utilização recreativa, o início dos efeitos estimulantes, psicológicos e eufóricos ocorre entre os 20 e os 60 minutos, com um efeito máximo observado entre os 60 e os 90 minutos após a ingestão (Green et al. 2003). Os efeitos da MDMA duram cerca de 6 horas (Hegadoren et al. 1999).

A MDMA é extensivamente metabolizada no fígado. No entanto, é importante considerar que o metabolismo também ocorre noutros órgãos. O metabolismo cerebral da MDMA, apesar de não contribuir decisivamente para a depuração global da

substância, parece ter importância na neurotoxicidade e nas diferentes respostas de cada utilizador à substância (de la Torre et al. 2004a).

A concentração plasmática máxima é atingida 2 horas após a administração ( $t_{\max}=2h$ ). O tempo de semi-vida para uma dose de 100 mg é de 8-9 horas e o volume de distribuição é de cerca de 4L/kg (de la Torre et al. 2004a). O efeito de primeira passagem é considerável, já que o metabolito plasmático mais comum (HHMA ou 3,4-dihidroximetanfetamina) tem um  $t_{\max}$  pouco maior do que 2h (de la Torre et al. 2004b). A ligação às proteínas plasmáticas é baixa, e é da ordem dos 20% (de la Torre et al. 2004a).

A administração de diferentes doses leva a variações não proporcionais das concentrações plasmáticas, o que sugere que a MDMA tem uma cinética não linear. A “clearance” renal é constante mas a “clearance” não renal diminui com o aumento da dose (de la Torre et al. 2000). Este fenómeno parece estar relacionado com a capacidade da MDMA inibir o citocromo P450, levando à redução do metabolismo hepático, o que justifica a cinética não linear (de la Torre et al. 2000). Num estudo clínico, foram administradas a nove indivíduos duas doses de 100 mg de MDMA separadas por 24 horas. Verificou-se que, na segunda administração, as concentrações plasmáticas eram de tal forma elevadas que não podiam ser explicadas apenas pela acumulação da droga, indicando a ocorrência do fenómeno de inibição metabólica com duração superior a 24 horas (Farré et al. 2004)

A falta de proporcionalidade e a cinética não linear da MDMA, resultante da inibição do metabolismo realizado pelo citocromo P450 CYP2D6, faz com que a administração de doses repetidas se torne uma atitude perigosa pois, na segunda administração, os níveis plasmáticos da MDMA podem ser imprevisivelmente elevados (Farré et al. 2004).

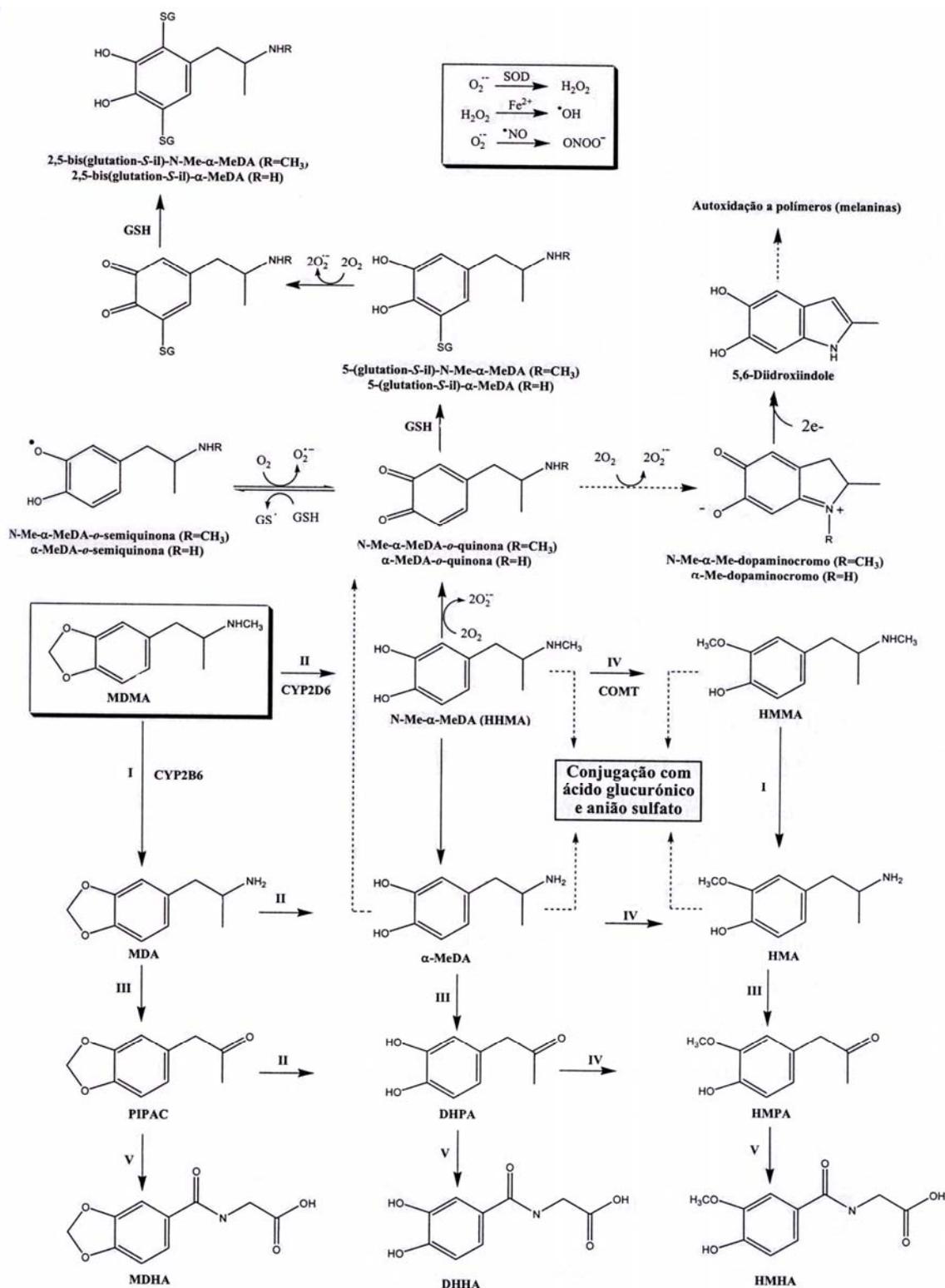
A disposição da MDMA parece ser estéreo-selectiva já que a administração do racemato leva a perfis plasmáticos distintos para os dois enantiómeros. Assim, verificou-se que a concentração plasmática máxima obtida para o enantiómero R(-)-MDMA é significativamente maior do que a concentração plasmática máxima do S(+)-MDMA. Além disso, o enantiómero farmacologicamente mais activo [S(+)-MDMA] é mais rapidamente eliminado (Fallon et al. 1999; Pizarro et al. 2004). Uma possível explicação, está no facto de o metabolismo da MDMA ser também estéreo-selectivo já que a isoenzima CYP2D6 tem maior afinidade para o (S)-(+)-MDMA, resultando em tempos de semi-vida mais curtos para este enantiómero (de la Torre et al. 2004b).

### 2.3.2. Metabolismo da MDMA

O metabolismo da MDMA foi extensamente estudado e encontra-se descrito e caracterizado em várias revisões (Figura 4) (de la Torre et al. 2004b; Green et al. 2003). As reacções que ocorrem são em, grande parte, responsáveis pelas manifestações de toxicidade aguda e crónica características da substância, já que ocorre um fenómeno de bioactivação metabólica (Morton 2005).

A MDMA é metabolizada por duas vias metabólicas principais:

1. O-desmetilenação, seguida da metilação mediada pela catecol-O-metiltransferase e/ou por conjugação com ácido glucurónico ou sulfato (vias metabólicas II e IV representadas na Figura 4).
2. N-desalquilação, desaminação e oxidação para formar as fenilcetonas posteriormente oxidadas a derivados do ácido benzóico, que finalmente originam ácidos hipúricos pela conjugação com glicina. (vias metabólicas I, III e V, representadas na Figura 4) (de la Torre et al. 2004b).



**Figura 4** - Metabolismo da MDMA. Representação das vias metabólicas.

Via I: N-desmetilação; Via II: desmetilenação; Via III: desaminação oxidativa; Via IV: O-metilação; Via V: conjugação com a glicina. Legenda de Abreviaturas: MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDA, 3,4 metilenodioxianfetamina; HHMA ou N-Me- $\alpha$ -MeDA, dihidroxiabfetamina ou N-metil- $\alpha$ -metildopamina;  $\alpha$ -MeDA,  $\alpha$ -metildopamina; HHMA, hidroximetoximetanfetamina; HMA, hidroximetoxianfetamina; PIPAC, peperonilacetona; MDHA, ácido 3,4-metilenodioxihipúrico; DHPA, 3,4-diidroxifenilacetona; DHHA, ácido 3,4-diidroxihipúrico; HMPA, 4-hidroxi-3-metoxifenilacetona; HMHA, ácido 4-hidroxi-3-metoxihipúrico (Carmo 2007).

A N-desmetilação da MDMA mediada pelo citocromo P450 origina 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA). Ambas, MDMA e MDA, sofrem reacção de desmetilação mediada pelo Citocromo P450 para originar os dois catecóis respectivos, a 3,4-dihidroxi metanfetamina (HHMA ou N-Me- $\alpha$ -MeDA) e a 3,4-dihidroxi anfetamina (HHA) também designada por  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDA). Por sua vez, estes catecóis são metilados pela catecol-O-metiltransferase dando origem à 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) e à 4-hidroxi-3-metoxiamfetamina (HMA), respectivamente. Os quatro metabolitos, HHMA, HHA, HMMA e HMA são conjugados com sulfato ou ácido glucurónico e podem ser encontrados principalmente no plasma e na urina (Green et al. 2003).

A sucessiva degradação da cadeia lateral da MDMA, HHMA e HMMA através das reacções de N-desmetilação e desaminação oxidativa originam os respectivos deaminometabolitos: piperonilacetona (PIPAC); 3,4-dihidroxi fenilacetona (DHPA); 4-hidroxi-3-metoxifenilacetona (HMPA). Finalmente, a conjugação das cetonas com glicina vai originar os seguintes ácidos hipúricos: ácido 3,4-metilenodioxihipúrico (MDHA), ácido 3,4-dihidroxihipúrico (DHHA) e ácido 4-hidroxi-3-metoxihipúrico (HMHA).

A auto-oxidação dos catecóis resulta na formação de radicais livres, ROS e RNS que têm sido implicados na acção neurotóxica da MDMA (Cadeta & Brannocka 1998). A sua elevada reactividade permite a oxidação sucessiva originando as respectivas quinonas que, por sua vez, sofrem oxidação intramolecular originando os aminocromos. Estes também oxidam para dar origem aos respectivos 5,6-hidroxiindóis que finalmente polimerizam para formar pigmentos semelhantes a melaninas (Bolton et al. 2000).

Deste processo resultam grandes quantidades de ROS e RNS que, tal como as quinonas, reagem com grupos nucleófilos nomeadamente: grupos sulfidrilo das proteínas e da glutatona, lípidos e DNA (Bolton et al. 2000; Cadeta & Brannocka 1998).

Os metabolitos catecólicos podem também conjugar-se com moléculas de glutatona num processo acompanhado pela formação de ROS e RNS (Hiramatsu et al. 1990). Neste processo, formam-se os metabolitos: 5-(glutation-S-il)- $\alpha$ -MeDA, 2-(glutation-S-il)- $\alpha$ -MeDA e a 2,5-bis(glutation-S-il) $\alpha$ -MeDA (Hiramatsu et al. 1990). A formação destes aductos tem potencial tóxico, sendo esta biotransformação uma via de toxificação para as células do rim (Carvalho et al. 2002b), do fígado (Carvalho et al. 2001b; Carvalho et al. 2004a; Carvalho et al. 2004b), do coração (Carvalho et al. 2004c) e do

sistema nervoso central (Bai et al. 1999; Capela et al. 2007; Capela et al. 2006; Easton et al. 2003).

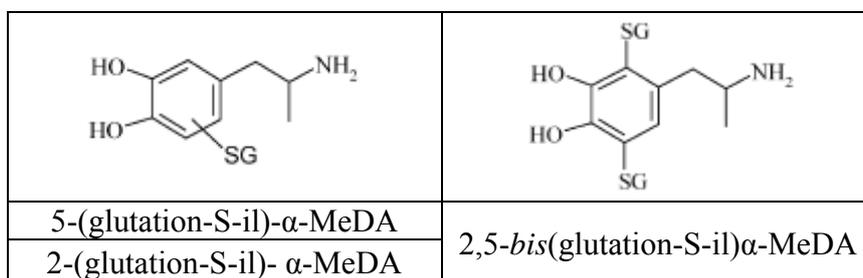


Figura 5 – Aductos com a glutathiona.

Finalmente, foi identificada em ratos uma terceira via metabólica que consiste na hidroxilação aromática com formação de triidroxianfetaminas (triidroxianfetamina e triidroximetanfetamina) (Lim & Foltz 1991). Estes metabolitos triidroxilados foram mais tarde identificados como neurotóxicos (Zhao et al. 1992).

### 2.3.3. Excreção

A principal via de excreção das anfetaminas em geral é a via urinária, logo o pH urinário é um factor que condiciona a excreção renal. Como estes compostos são bases fracas, a excreção renal aumenta com a acidificação da urina e diminui com a alcalinização. Assim, o tempo de semi-vida destas substâncias varia em função do pH urinário havendo até utilizadores que recorrem ao bicarbonato com o objectivo de prolongar os efeitos da droga (de la Torre et al. 2004a).

Os derivados anfetamínicos que possuem o substituinte metilendioxilo no anel aromático sofrem metabolização extensa, pelo que a quantidade excretada na urina sem biotransformação é relativamente pequena (de la Torre et al. 2004a). A MDMA é um exemplo deste fenómeno. Embora se consigam detectar moléculas intactas na urina, a percentagem de MDMA não biotransformada e excretada é de 15% do total administrado. Assim, cerca de 80% da MDMA administrada é excretada sob a forma de metabolitos (de la Torre et al. 2004a).

A clearance renal da MDMA é constante e independente da dose administrada, por contraposição à clearance não renal que depende da dose (de la Torre et al. 2004a).

A MDA é um metabolito encontrado no plasma em pequenas quantidades, correspondendo a cerca de 8-9% da MDMA administrada, o que é confirmado com uma presença urinária de 1% para a dosagem de 100 mg de MDMA (de la Torre et al. 2004b). Os principais metabolitos encontrados no plasma e na urina são a HHMA e a HMMA. Ambas não são detectáveis na sua forma livre já que são rapidamente conjugadas com sulfato ou ácido glucurónico. A quantidade urinária destes metabolitos corresponde a cerca de 40% dos 100 mg de MDMA administrados (de la Torre et al. 2004b). A HMA é um metabolito menor que aparece na urina, também conjugado, numa quantidade correspondente a 1,5% da MDMA administrada (de la Torre et al. 2004b).

A excreção da MDMA pode ocorrer por vias alternativas nomeadamente, através da saliva e do suor. Estas vias alternativas constituem possibilidades não invasivas para a detecção da ingestão de MDMA (de la Torre et al. 2004a).

Os estudos farmacocinéticos demonstram que a excreção da MDMA também é estereoselectiva sendo o isómero (S)-(+)-MDMA excretado mais rapidamente do que o isómero (R)-(-)-MDMA (de la Torre et al. 2004b).

#### **2.3.4. Farmacogenética – O polimorfismo genético e a MDMA**

Nos humanos e mamíferos em geral, existem duas vias que assumem o papel principal no perfil metabólico da MDMA: o sistema enzimático citocromo P450 e a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) (de la Torre et al. 2004b).

Estas enzimas apresentam variações genéticas dentro da população. A isoenzima CYP2D6 do citocromo P450 é altamente polimórfica existindo alterações genéticas que modificam a expressão da enzima e conseqüentemente, a sua actividade. Os indivíduos com deficiências metabólicas nesta isoenzima correspondem a 7-10% da população caucasiana Europeia e são designados de metabolizadores pobres (“poor metabolizers” ou “PM’s”) (Bertilsson et al. 2002). Para a COMT, o polimorfismo genético leva à existência de três fenótipos: a COMT de alta actividade, a COMT de actividade intermédia e a COMT de baixa actividade. Verifica-se que cerca de 25% da população caucasiana possui COMT de baixa actividade (Zhu 2002).

O polimorfismo genético da CYP2D6 poderia ser o factor explicativo para a variabilidade interindividual nas manifestações de toxicidade da MDMA. Seria de

esperar que os indivíduos com baixa capacidade metabólica fossem mais sensíveis aos efeitos tóxicos. No entanto, a MDMA inibe a isoenzima CYP2D6 e existem também outras isoenzimas do citocromo P450 capazes de metabolizar esta molécula (Tabela 1) o que faz prever que o polimorfismo tenha pouca importância na expressão da toxicidade aguda (de la Torre et al. 2004b; Maurer et al. 2000).

Em relação à COMT, esta é responsável pela metilação da HHMA em HMMA, havendo indícios de que esta transformação acarreta consequências na manifestação de toxicidade. Estudos *in vitro* revelam que a HMMA é a principal responsável pelo aumento da hormona anti-diurética (vasopressina) (Forsling et al. 2002). Esta alteração da secreção da vasopressina leva a hiponatremia colocando em risco de vida o utilizador de MDMA (Forsling et al. 2002). As diferenças interindividuais na secreção de vasopressina podem estar relacionadas com o polimorfismo genético da COMT.

**Tabela 1** - Isoenzimas do citocromo P450 envolvidas no metabolismo da MDMA e MDA (Maurer et al. 2000).

Molécula Alvo	Desmetilação		N-desalquilação	
	Isoenzima do citocromo P450 envolvida			
	Homem	Rato	Homem	Rato
MDMA	CYP1A2 CYP2D6 CYP3A4	CYP2D1 CYP3A2	CYP1A2 CYP2D6	CYP1A2 CYP2D1
MDA	CYP2D6 CYP3A4	CYP2D1 CYP3A2		

### 2.3.5. Interações Farmacodinâmicas e Farmacocinéticas com a MDMA

As substâncias que inibem a CYP2D6 interferem com o metabolismo da MDMA e de outras substâncias que também sejam extensivamente metabolizadas por esta isoenzima (de la Torre et al. 2004b).

Um bom exemplo desta interação é a utilização concomitante de MDMA e paroxetina. Um estudo executado por Segura e colaboradores usou a paroxetina como inibidor metabólico da CYP2D6. Neste estudo foram criados dois grupos de voluntários: um grupo foi tratado com paroxetina administrada na dose terapêutica de 20 mg/dia durante 3 dias, enquanto que o outro foi tratado com placebo durante três dias. A administração de 100 mg de MDMA aos indivíduos de cada grupo revelou uma

AUC (“area under the curve”: área sob a curva num gráfico de concentração plasmática em função do tempo) 30% maior para o grupo tratado com paroxetina (Segura et al. 2005). Este tipo de interação pode ocorrer também com a fluoxetina (Oesterheld et al. 2004).

No caso particular da paroxetina e da fluoxetina, além da interação farmacocinética descrita pode ocorrer também interação farmacodinâmica já que estas moléculas são inibidores da recaptação da serotonina, podendo reduzir a quantidade de serotonina libertada pela MDMA para a fenda sináptica (Green et al. 2003; Mechan et al. 2002).

Outras interações exclusivamente farmacocinéticas com potencial de inibir a CYP2D6 e de aumentar as concentrações plasmáticas de MDMA ocorrem com a bupropiona, metabolitos do haloperidol, metadona, quinidina, pimozide, entre outros (Oesterheld et al. 2004).

A forma mais grave de interação farmacocinética ocorre com substâncias capazes de inibir em simultâneo as principais isoenzimas do citocromo P450 envolvidas no metabolismo da MDMA: CYP1A2, CYP2D6 e CYP3A4. Nesta situação, o metabolismo está altamente comprometido com manifestações de toxicidade aguda mais graves e evidentes. Um exemplo claro desta interação é o ritonavir. Este anti-retroviral tem a capacidade de inibir várias isoenzimas do citocromo P450, CYP2B6, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4 o que permite o aumento da concentração plasmática da MDMA (Hesse et al. 2001; Moltke et al. 2000; Moltke et al. 1998). Existem vários relatos de interações fatais e não fatais que realçam a perigosidade da co-administração (Henry & Hill 1998).

Podem também ocorrer interações farmacodinâmicas que resultam da co-administração de MDMA com substâncias com acção pró-serotonérgica. Por vezes, estas substâncias encontram-se em formulações contendo MDMA: anfetaminas e/ou MDA. Também se adicionam intencionalmente cocaína, dextrometorfano, tramadol, venlafaxina, lítio, clomipramina e outras substâncias que podem levar com maior facilidade à síndrome serotonérgica e ao maior risco de toxicidade fatal e não fatal (Oesterheld et al. 2004).

Esta síndrome caracteriza-se por uma actividade física intensa e descoordenada, confusão mental, bruxismo, agitação, hipertermia, reflexos aumentados, tremuras, rabdomiólise, acidose metabólica, mioclonus (contrações involuntárias de grupos de músculos), nistagmos (movimentos involuntários dos olhos) e trismus (contração tónica dos músculos da mastigação) (Schifano 2004).

Finalmente, são de referir as interações farmacodinâmicas entre a MDMA e substâncias que inibem a MAO como a meclobemida que também podem desencadear a síndrome serotoninérgica (Vuori et al. 2003).

## **2.4. Neurotoxicidade da MDMA**

Na comunidade científica é amplamente aceite que a utilização da MDMA desencadeia neurotoxicidade. Os utilizadores recreativos podem sofrer efeitos neuropsiquiátricos resultantes das alterações cerebrais causadas pela droga (Morton 2005).

O estudo da neurotoxicidade da MDMA em modelos animais recorre principalmente a ratos e primatas não humanos. Existem também estudos de neurotoxicidade em humanos (Lyles & Cadet 2003).

No rato, estudos neuroquímicos e anatómicos mostraram reduções a longo prazo de marcadores do sistema serotoninérgico. Verificaram-se a diminuição dos níveis de serotonina e do seu principal metabolito (5-HIAA ou ácido 5-hidroxiindolacético), a redução do número de transportadores de recaptção da serotonina (SERT) e a inibição da triptofano hidroxilase (TPH) (enzima responsável pela reacção limitante da síntese de serotonina). (Lyles & Cadet 2003). No cérebro do rato, as reduções mais severas dos níveis de serotonina ocorrem no neocortex, corpo estriado e no hipocampo (Lyles & Cadet 2003).

Estudos de histologia demonstraram, no rato, a degeneração dos terminais nervosos após a administração de MDMA. A utilização de anticorpos específicos para a serotonina permitiu detectar a perda de axónios no neocortex, estriado e hipotálamo (Lyles & Cadet 2003).

A neurotoxicidade a longo prazo, detectada em ratos, foi também encontrada em primatas não humanos, sendo estes últimos mais sensíveis (Ricaurte 1989; Souza et al. 1990). Tal como no rato, foram detectadas reduções nos níveis de serotonina cerebral e do seu metabolito 5-HIAA. Também se observaram reduções do SERT e da THP (Ricaurte et al. 1988a; Ricaurte & McCann 1992; Ricaurte et al. 1988b; Souza et al. 1990).

Em primatas não humanos, a redução dos níveis de serotonina continuou a ser evidente 7 anos após a administração (Hatzidimitriou et al. 1999). Detectaram-se

também reduções do número de axónios serotoninérgicos duas semanas e sete anos após a administração de MDMA (Hatzidimitriou et al. 1999). No hipotálamo e nas amígdalas a destruição de axónios serotoninérgicos foi acompanhada de uma reorganização das projecções serotoninérgicas ainda existentes. No entanto, esta reorganização foi anormal (Fischer et al. 1995).

Em relação ao sistema dopaminérgico, verifica-se que a administração de MDMA em ratos desencadeia rapidamente, a nível do estriado, um aumento da concentração de dopamina e também a diminuição da concentração dos metabolitos do ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e do ácido homovanílico (HVA) (Colado et al. 1999). A redução das concentrações dos metabolitos da dopamina resulta provavelmente da redução do metabolismo intraneuronal, isto porque a recaptção e a MAO<sub>A</sub> estão inibidas pela MDMA e seus metabolitos. Por outro lado, os estudos realizados em humanos não detectaram alterações nos níveis dos metabolitos da dopamina, nomeadamente do HVA (McCann et al. 1994).

No que se refere ao sistema serotoninérgico, os efeitos da MDMA sobre os neurónios serotoninérgicos são dependentes da espécie em estudo. Os neurónios dos primatas são mais sensíveis do que os dos ratos. Nos ratinhos os neurónios serotoninérgicos são mais resistentes aos efeitos da MDMA verificando-se toxicidade selectiva para os neurónios dopaminérgicos (Verrico et al. 2005).

Os estudos em modelos animais demonstraram, até agora, a neurotoxicidade da MDMA. No entanto, as doses em estudo são em geral elevadas e numa fase inicial foi difícil correlacionar estes resultados com a possibilidade de neurotoxicidade em humanos. No entanto, actualmente, é consensual a ideia de que a MDMA é neurotóxica em humanos (Lyles & Cadet 2003).

Em humanos utilizadores de MDMA foram detectados níveis reduzidos de 5-HIAA no líquido cefalorraquidiano, indicando diminuição da função serotoninérgica (Ricaurte et al. 1990). Estudos de Tomografia por Emissão de Positrões (PET) com substrato selectivo para os transportadores da serotonina permitiram detectar diminuições do SERT nos utilizadores de MDMA (McCann et al. 1998). Também se avaliaram alterações da presença de receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>2A</sub> para a serotonina através de Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) usando substrato de alta afinidade para esse receptor. Com este estudo, por comparação com grupos controlo de não utilizadores, detectaram-se menos receptores pós-sinápticos nos utilizadores recentes de MDMA. Por outro lado, em ex-utilizadores de MDMA detectaram-se mais

receptores pós-sinápticos. A menor densidade de receptores nos utilizadores recentes resultará possivelmente da grande disponibilidade de serotonina cuja libertação foi induzida pela MDMA (Reneman et al. 2002). A maior densidade de receptores nos ex-utilizadores pode estar relacionada com toxicidade a longo prazo, em que a depleção da serotonina desencadeou um efeito compensatório de aumento de receptores 5HT<sub>2A</sub> (Reneman et al. 2002).

Finalmente, as alterações neuronais em humanos pelo uso de MDMA foram também confirmadas investigando o metabolismo cerebral da glicose. Nestes estudos detectaram-se reduções da utilização de glicose no hipocampo, amígdalas e cíngulo. Por outro lado, detectaram-se aumentos no gasto de glicose na área de Brodmann. Estas alterações podem estar relacionadas com a neurotoxicidade a longo termo (Obrocki et al. 1999).

#### **2.4.1. Mecanismos que desencadeiam a Neurotoxicidade**

O stress oxidativo, a excitotoxicidade, a hipertermia e a disfunção mitocondrial são os quatro fenómenos que muito provavelmente actuam em sinergia desencadeando a neurotoxicidade mediada pela MDMA.

##### **2.4.1.1. Metabolitos tóxicos da MDMA e Formação de Radicais Livres, ROS e RNS**

A relação entre a neurotoxicidade das anfetaminas e a produção de espécies reactivas foi desde cedo proposta. O envolvimento de processos oxidativos foi inicialmente demonstrado por estudos em que a inibição da triptofano hidroxilase (TPH) pela MDMA era revertida através de compostos capazes de reduzir grupos sulfidrilo (Stone et al. 1989). Verificou-se também que, *in vitro*, a MDMA era incapaz de inibir a TPH e que essa inibição apenas ocorria *in vivo* confirmando o envolvimento dos radicais livres (Schmidt & Taylor 1987).

A ideia de que o stress oxidativo está envolvido nos mecanismos de neurotoxicidade da MDMA foi consolidada através de estudos onde a utilização de antioxidantes e

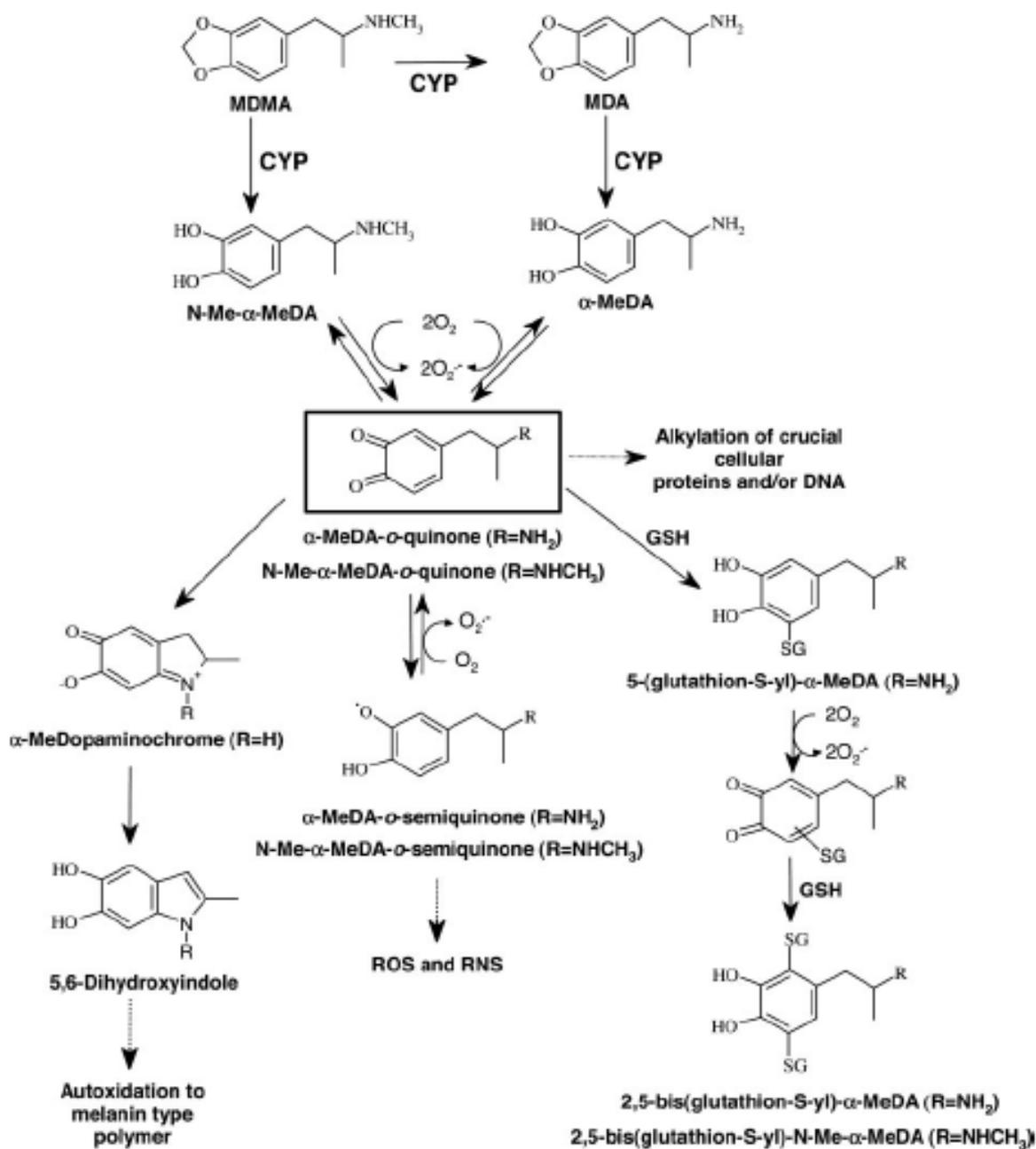
sequestradores de radicais livres conduzia à redução desses efeitos (Colado & Green 1995; Gudelsky 1996).

A génese do stress oxidativo está no metabolismo da MDMA. Este é responsável pela formação de metabolitos neurotóxicos com estruturas semelhantes a quinonas que são capazes de gerar espécies reactivas de oxigénio e de azoto através de reacções de oxidação-redução (Figura 6) (Bolton et al. 2000).

O metabolismo da MDMA mediado pelas enzimas do citocromo P450 é o responsável pela formação de catecóis como a 3,4-dihidroxi metanfetamina (HHMA ou N-Me- $\alpha$ -MeDA) e a 3,4-dihidroxi anfetamina (HHA ou  $\alpha$ -MeDA).

A formação das quinonas, N-Me- $\alpha$ -MeDA-*o*-quinona e  $\alpha$ -MeDA-*o*-quinona, a partir dos catecóis levam a quatro vias de toxicidade possíveis (Figura 6).

- 1) A partir das ortoquinonas pode ocorrer oxidação intramolecular com formação de aminocromos. As oxidações subsequentes formam os 5,6-diidroxiindois que polimerizam originando estruturas semelhantes a melaninas (Bolton et al. 2000).
- 2) As ortoquinonas podem originar semi-quinonas com formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (NOS) (Capela et al. 2006).
- 3) As ortoquinonas podem reagir directamente com os constituintes celulares levando à alteração e destruição dos neurónios (Capela et al. 2006).
- 4) As ortoquinonas, devido à sua capacidade reactiva, reagem com a glutathiona (GSH) originando os aductos correspondentes que podem, por sua vez, ser metabolizados aos derivados de N-acetilcisteína (NAC).



**Figura 6** - Vias metabólicas responsáveis pela formação de metabolitos neurotóxicos.

As primeiras reacções são mediadas pelo citocromo P450: a MDMA sofre N-desmetilação para dar origem à MDA. MDA e MDMA sofrem ambas desmetilação para formar os respectivos catecóis a partir dos quais se inicia todo um processo de stress oxidativo. Além de ROS e RNS surgem as ortoquinonas que podem seguir quatro vias: 1) Oxidação intramolecular seguida de oxidação e autooxidação para formar polímeros do tipo da melanina. 2) Formação de semiquinonas e espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de azoto (NOS). 3) Conjugação com glutathione levando à depleção das defesas anti-oxidantes. 4) Reacção directa com constituintes celulares [adaptado de Capela et al. (2006)].

Em resumo, estas reacções são capazes de gerar catecóis, quinonas, semiquinonas e hidroquinonas que podem ceder electrões ao oxigénio originando superóxidos, peróxido de hidrogénio e outras espécies que, por sua vez, levam à depleção das defesas antioxidantes, peroxidação lipídica, inibição da TPH, alteração das proteínas em geral, alteração do DNA e, finalmente, à degeneração dos terminais serotoninérgicos. Todos estes danos podem ser acompanhados com produção secundária de radical hidroxilo que traz ainda mais danos, num ciclo destrutivo de oxidação-redução (Colado & Green 1995).

Estudos *in vitro* demonstraram que os metabolitos resultantes da conjugação com glutathione são neurotoxinas fortes com maior toxicidade do que os catecóis que lhes deram origem. Além disso, verificou-se também que a incubação das células em hipertermia potenciava a neurotoxicidade da MDMA (Capela et al. 2007; Capela et al. 2006).

A formação dos aductos com glutathione, foi demonstrada em microsomas de fígado humano. Ao mesmo tempo, a administração intracerebral do conjugado 5-(glutathione-S-yl)- $\alpha$ -MeDA a ratos desencadeou sintomas de intoxicação pela MDMA mostrando que tem actividade no sistema nervoso central (Easton et al. 2003). A administração intracerebral destes conjugados desencadeou também depleção de serotonina (Bai et al. 1999).

Por fim, é importante referir a formação dos metabolitos trihidroxilados em ratos que demonstraram ter acção neurotóxica quando administrados directamente no estriado (Lim & Foltz 1991; Zhao et al. 1992).

#### **2.4.2. Acumulação de Dopamina – ROS, RNS e Stress Oxidativo**

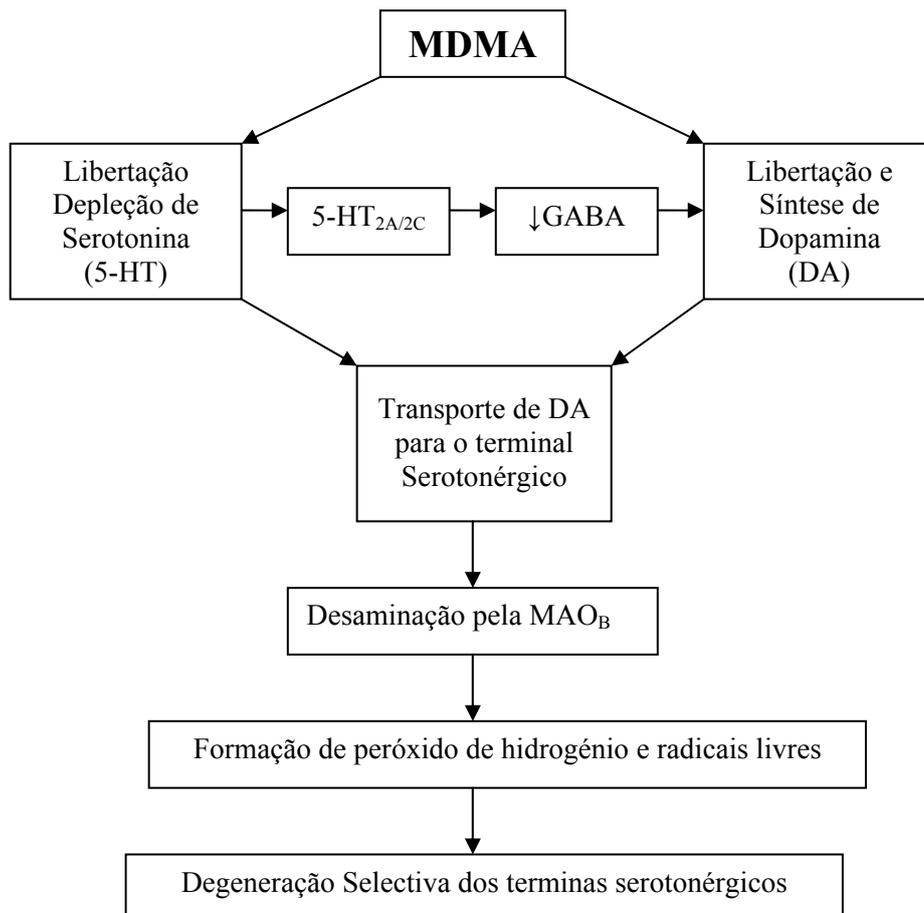
Tal como foi referido, para os primatas não humanos e para o rato, a MDMA é neurotóxica para o sistema serotoninérgico e praticamente não apresenta efeitos deletérios no sistema dopaminérgico. No ratinho ocorre o contrário, já que há maior resistência do sistema serotoninérgico ao efeito neurotóxico, enquanto o sistema dopaminérgico é mais sensível (Lyles & Cadet 2003).

A libertação de serotonina mediada pela MDMA leva à activação dos receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> pós-sinápticos dos interneurónios gabaérgicos. Isto reduz a neurotransmissão gabaérgica e conseqüentemente aumenta a síntese e libertação de dopamina pelos neurónios dopaminérgicos (Gudelsky & Nash 1996). Existem assim dois mecanismos

de libertação de dopamina: directamente pela MDMA (Schmidt et al. 1987) e através da regulação serotoninérgica mediada pelos interneurónios gabaérgicos (Gudelsky & Nash 1996). Além disso, a inibição preferencial da MAO<sub>A</sub> também contribui para o aumento da dopamina extracelular (Leonardi & Azmitia 1994).

Pensa-se que, devido à quantidade excessiva de dopamina extracelular existente, esta pode ser transportada para o interior dos terminais serotoninérgicos através do transportador da serotonina (SERT) (Lyles & Cadet 2003). Tal pressuposto está de acordo com a descoberta de que a dopamina pode ser transportada pelo SERT (Faraj et al. 1994).

Uma vez no interior do terminal serotoninérgico, a autoxidação da dopamina exerce por si só acção neurotóxica (Graham 1978). Além disso, no interior do terminal, a dopamina pode ser metabolizada pela MAO<sub>B</sub> formando peróxido de hidrogénio que, por sua vez, pode desencadear peroxidação lipídica e stress oxidativo (Sprague et al. 1998). Este mecanismo pode potenciar a destruição dos terminais serotoninérgicos e contribuir para a toxicidade a longo prazo (Figura 7) (Lyles & Cadet 2003).



**Figura 7** - Envolvimento da dopamina na neurotoxicidade mediada pela MDMA. Adaptado de Sprague et al. (1998).

#### **2.4.2.1. Serotonina – activação de receptores 5-HT<sub>2A</sub>**

A libertação de serotonina (5-HT) para a fenda sináptica permite activar os receptores 5-HT<sub>2A</sub> que parecem estar envolvidos em mecanismos de neurotoxicidade. Uma vez activados, estes receptores causam alterações na homeostase do cálcio através da translocação da proteína cínase C do citosol para a membrana plasmática e respectiva activação (Kramer et al. 1998). Esta teoria é suportada pelo facto da nimodipina, um bloqueador dos canais de cálcio, reduzir a toxicidade neuronal mediada pela MDMA (Farfel et al. 1992).

Foi colocada também a hipótese de que a serotonina, ou um dos seus metabolitos, fossem responsáveis pela neurotoxicidade da MDMA, já que a inibição da recaptação da serotonina pela fluoxetina ou citalopram antagonizava os indicadores de toxicidade nomeadamente, a depleção da serotonina induzida pela MDMA (Schmidt 1987) e a inibição da actividade da triptofanohidroxilase (Schmidt & Taylor 1987). Supunha-se então, que o transportador da serotonina (SERT) fosse capaz de captar o metabolito tóxico da serotonina colocando-o no interior do terminal nervoso onde este poderia desencadear um processo de stress oxidativo com destruição selectiva do terminal serotoninérgico. Esta hipótese é no entanto controversa porque não foram encontrados os metabolitos da serotonina capazes de desencadear toxicidade (Sprague et al. 1998). Além disso, outro estudo (Sprague et al. 1994) em que se instituiu um regime com triptofano ou 5-hidroxitriptofano que aumenta a quantidade de serotonina endógena (Gudelsky & Nash 1996) e consequentemente os seus hipotéticos metabolitos tóxicos, demonstrou que os níveis aumentados de serotonina não traduzem agravamento da neurotoxicidade, colocando mais uma vez em dúvida a teoria do envolvimento de produtos de oxidação da serotonina no mecanismo de neurotoxicidade da MDMA (Sprague et al. 1998).

#### **2.4.2.2. Excitotoxicidade – Envolvimento do glutamato e/ou do monóxido de azoto (NO) na neurotoxicidade da MDMA**

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante do sistema nervoso central. A libertação excessiva de glutamato está associada a morte neuronal num processo designado de excitotoxicidade. A quantidade excessiva de glutamato na fenda

sináptica leva à activação dos receptores ionotrópicos [2-amino-3-(3-hidroxi-5-methylisoxazol-4-il)propionato ou AMPA] e metabotrópicos (N-metil-D-aspartato ou NMDA) do glutamato que fazem aumentar o cálcio intracelular. Este aumento, por sua vez, activa cínases, lípases, proteases, endonucleases e outras vias metabólicas que provocam degeneração neuronal directa ou através da formação de ROS, de RNS e da ocorrência de stress oxidativo. (Arundine & Tymianski 2003; Sattler & Tymianski 2000).

A questão do envolvimento da excitotoxicidade no mecanismo de neurodegeneração provocado pela MDMA é ainda controversa (Quinton & Yamamoto 2006; Sprague et al. 1998).

Um estudo realizado em ratos utilizando o MK-801, um inibidor do receptor do glutamato NMDA, demonstrou protecção contra a depleção dos níveis de serotonina, 7 dias depois da administração da MDMA (Farfel et al. 1992). Por outro lado, outro estudo revelou não haver efeito do bloqueador MK-801 sobre a inibição da triptofanhidroxilase (TPH) provocada pela MDMA (Johnson et al. 1989).

O envolvimento do glutamato na neurotoxicidade da MDMA levou a especular se este não seria responsável pelo aumento do monóxido de azoto (NO) intracelular, sendo este o mediador último da toxicidade. Esta suposição baseia-se na capacidade que o glutamato tem de activar o receptor NMDA que, por sua vez, sinaliza a activação da NO-sintetase e desencadeia a produção de NO que finalmente seria responsável pela toxicidade (Sattler & Tymianski 2000).

Tendo por base esta hipótese, foi realizado um estudo onde se testaram três inibidores da sintetase do óxido nítrico: metilester da N(G)-nitro-L-arginina (L-NAME), N(G)-monometil-L-arginina e N(G)-nitro-L-arginina. Destes três inibidores, apenas o L-NAME consegue proteger contra os efeitos neurotóxicos da MDMA (depleção de serotonina e dopamina). Como este inibidor é o único que induz hipotermia, os autores concluíram que o efeito protector deveria estar relacionado com o abaixamento da temperatura e não com a inibição da produção de NO. Deste modo concluíram que o NO não teria um papel importante na neurotoxicidade mediada pela MDMA (Taraska & Finnegan 1997).

Por outro lado, num estudo *in vitro* em cultura de células serotoninérgicas humanas, verificou-se que a incubação simultânea de MDMA e de dador de NO (nitroprussiato de sódio) resulta no aumento de morte celular em relação aos controlos. Esse mesmo

estudo demonstrou o efeito protector do inibidor da NO-sintetase (L-NAME), na ausência do efeito hipotérmico verificado *in vivo* (Simantov & Tauber 1997).

Mais uma vez se verifica que o envolvimento do glutamato e/ou do NO na neurotoxicidade mediada pela MDMA é uma questão que permanece em aberto.

Finalmente, é importante salientar que para outras anfetaminas, como a metanfetamina, existem evidências mais claras sobre o envolvimento do glutamato e da excitotoxicidade nos mecanismos de neurodegeneração (Quinton & Yamamoto 2006).

#### **2.4.2.3. Envolvimento da Hipertermia nos Mecanismos de Neurotoxicidade**

A MDMA causa hipertermia em ratos e essa alteração da temperatura depende da temperatura ambiente. Assim, a administração de MDMA em ratos mantidos a 30 °C desencadeia uma resposta hipertérmica, enquanto que ratos mantidos a 10 °C têm uma resposta hipotérmica (Gordon et al. 1991). Estas observações levam a crer que a MDMA causa alterações nos mecanismos termorreguladores. Os efeitos hipertérmicos também ocorrem nos humanos e são potencialmente fatais (Dar & McBrien 1996).

A utilização do antagonista dos receptores da serotonina, quetanserina, protege contra a neurotoxicidade e bloqueia a hipertermia induzida por uma dose baixa (10 mg/kg) de MDMA administrada a ratos. Se a dose for aumentada este bloqueio deixa de ser eficaz e a temperatura corporal aumenta (Schmidt et al. 1990). Verificou-se também que os efeitos protectores da quetanserina são contrariados aumentando a temperatura ambiente (Malberg et al. 1996). Estes dois estudos mostram que a protecção contra a neurotoxicidade mediada pela quetanserina se deve à hipotermia por ela provocada.

Existem também substâncias capazes de fornecer protecção contra a neurotoxicidade sem alterar a resposta hipertérmica da MDMA. Um bom exemplo é a fluoxetina que apesar de proteger contra os efeitos neurotóxicos da MDMA não contraria a hipertermia (Malberg et al. 1996).

Estes estudos permitem concluir que a redução da temperatura corporal é um mecanismo de protecção contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA, ao mesmo tempo que se verifica que, para além da hipertermia, existem outros mecanismos para os efeitos neurotóxicos.

Esta conclusão está de acordo com o conhecimento geral de que a redução da temperatura protege contra danos cerebrais com as mais variadas origens. Deste modo, será de considerar que, possivelmente, todas as substâncias capazes de baixar a temperatura corporal tenham efeito protector contra a neurodegeneração (Sprague et al. 1998). Pode-se desta forma dizer que a hipertermia, além de ser um sintoma grave de intoxicação aguda por MDMA, é também um factor que potencia fortemente a neurotoxicidade (Kiyatkin 2005).

#### **2.4.2.4. Alteração da Função Mitocondrial potencia a Neurotoxicidade**

A neurotoxicidade da MDMA (e das anfetaminas em geral) parece estar também relacionada com alterações funcionais das mitocôndrias. Esta possibilidade foi levantada já que a inibição da cadeia transportadora de electrões pelo malonato, agrava a neurotoxicidade da MDMA (Nixdorf et al. 2001). Ao mesmo tempo, a utilização de substratos para o metabolismo energético, como a nicotinamida e a ubiquinona (ou coenzima Q10), permitiu a redução da toxicidade da MDMA com menor depleção dos níveis de serotonina no hipocampo e no estriado (Darvesh & Gudelsky 2005).

Estes fenómenos podem estar relacionados com a inibição da cadeia transportadora de electrões de forma rápida e transitória após a administração de MDMA (Burrows et al. 2000), sendo que essa inibição ocorre ao nível dos complexos I e II da cadeia transportadora de electrões (Quinton & Yamamoto 2006).

A origem das alterações da função mitocondrial induzidas pela MDMA ainda não está esclarecida mas pode estar relacionada com os mecanismos que envolvem stress oxidativo, excitotoxicidade e proteínas de desacoplamento, como anteriormente se referiu.

Assim, o aumento do gasto energético induzido pela MDMA (Darvesh & Gudelsky 2005) associado à alteração da função mitocondrial pode potenciar a neurotoxicidade (Quinton & Yamamoto 2006).

### **2.4.3. Efeitos Neuropsiquiátricos da MDMA**

Do que até aqui se expôs, a MDMA é uma substância que interage de forma complexa com o sistema nervoso central. Vários sistemas neurotransmissores podem ser influenciados. Os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico são os mais afectados. No entanto, também ocorrem alterações na libertação de noradrenalina. Esta interacção difusa desencadeia respostas neurológicas e neuroendócrinas que caracterizam os efeitos descritos pelos utilizadores de “ecstasy”.

#### **2.4.3.1. Efeitos Agudos**

Os efeitos agudos descritos pelos utilizadores de MDMA são euforia, alterações na percepção da luz e do som, redução da atitude defensiva (afecto negativo), abertura emocional, empatia e redução das inibições (Morton 2005). A generalidade dos efeitos psicológicos foi relacionada com a libertação de serotonina, enquanto que os efeitos estimulantes e eufóricos foram relacionados com a libertação de dopamina (Liechti & Vollenweider 2001).

Apesar de não haver o fenómeno de ressaca, existe um período depois da toma em que humor piora, aparecem sintomas de depressão e tristeza, irritabilidade, insociabilização, dificuldades de concentração, problemas de memória, dificuldade em dormir e dores musculares. Apesar de ser reversível, este fenómeno persiste durante alguns dias (cerca de 4 dias) e é conhecido como “midweek blues”. É provável que estas alterações estejam relacionadas com a depleção monoaminérgica (Parrott 2002).

##### **2.4.3.1.1. Síndrome serotoninérgica**

A síndrome serotoninérgica corresponde a um conjunto de sintomas agudos que resultam do excesso de serotonina na fenda sináptica. Os sintomas descritos incluem hiperactividade comportamental, confusão mental, agitação, hiperreflexia, hiperpirexia, taquicardia, clonus, mioclonus, oscilações oculares e tremuras (Gillman 1998).

Esta síndrome surge normalmente como reacção adversa, principalmente quando se combinam inadvertidamente diferentes substâncias pró-serotoninérgicas. Por exemplo, a

associação de inibidores da monoaminaoxidase (MAOIs) com inibidores da recaptção da serotonina (SSRIs) pode desencadear a síndrome (Gillman 1998).

Quando ocorre uma manifestação pouco grave, com apenas três sintomas, não é geralmente necessário apoio médico, a redução da temperatura corporal é suficiente para controlar os sintomas. No entanto, a evolução para manifestações mais graves com quatro ou mais sintomas, pode ocorrer rapidamente e colocar o doente em risco de vida. Neste caso, a intervenção médica é urgente e a terapêutica passa por antagonizar os efeitos da serotonina com bloqueadores dos receptores 5-HT<sub>2</sub>/5HT<sub>1A</sub>: ciproheptadina ou clorpromazina (Gillman 1998; Gillman 1999).

A utilização de MDMA nas doses recreativas está sempre acompanhada de síndrome serotoninérgica em grau variável. Normalmente, os sintomas são moderados e incluem hiperactividade, confusão mental, hipertermia e trismus (bruxismo). Estas reacções são bem conhecidas dos utilizadores habituais e não são consideradas graves (Parrott 2002). Por vezes, podem ocorrer sintomas de hiperactividade serotoninérgica mais intensos que chegam a colocar o utilizador em perigo de vida (Green et al. 2003).

Vários factores podem influenciar a intensificação da resposta pró-serotoninérgica. A dose administrada e a sensibilidade variável de cada utilizador são cruciais. Interações com outras substâncias pró-serotoninérgicas como inibidores da monoaminaoxidase (MAOIs), inibidores do transportador de recaptção da serotonina (SSRIs), cocaína, entre outras, podem aumentar os níveis de serotonina na sinapse. Finalmente, as condições ambientais: temperaturas elevadas, música repetitiva em volume elevado, dança prolongada e locais sobrelotados, contribuem para o aumento do risco da síndrome serotoninérgica (Parrott 2002).

#### **2.4.3.2. Efeitos Crónicos**

Os efeitos crónicos mediados pela MDMA devem ser também considerados em função do padrão de utilização. Os efeitos crónicos são descritos até por utilizadores recentes que recorreram à MDMA entre 1 e 9 vezes. No entanto, estes efeitos são mais frequentes nos utilizadores recorrentes (Parrott et al. 2002).

#### **2.4.3.2.1. Efeitos Crônicos Cognitivos e na Memória**

Existem vários estudos em humanos que mostraram os efeitos deletérios a longo prazo na memória e na capacidade de aprendizagem dos utilizadores de MDMA. A extensão desses efeitos deletérios é proporcional à frequência de uso (Parrott et al. 2002).

Os défices de memória verbal nos utilizadores jovens de MDMA são significativos em comparação com grupos controlo das mesmas idades. Em testes de “Delayed Word Recall” e de “Immediate Word Recall”, os utilizadores de MDMA lembraram-se de menos palavras que os não utilizadores. Estes défices foram confirmados em estudos de acompanhamento dos mesmos utilizadores (Parrott & Lasky 1998; Parrott et al. 1998). Mais tarde, foi introduzido outro grupo controlo constituído por utilizadores de múltiplas drogas à excepção da MDMA, mostrando com este grupo que as diferenças na memória verbal estão realmente relacionadas com a MDMA e não com as outras drogas que os utilizadores de MDMA frequentemente usam (Morgan 1999).

Dificuldades no reconhecimento de palavras e figuras, e dificuldades de memória espacial/visual determinadas pelo “Corsi block-tapping-test”, foram também detectadas num estudo em que se realizou uma análise em que foi afastada a possibilidade de influência de outras variáveis nomeadamente, a utilização de outras drogas (Verkes et al. 2001).

Outro estudo de testes cognitivos foi realizado em três grupos de humanos: não utilizadores de drogas, utilizadores de cannabis, e utilizadores de MDMA e cannabis em que o perfil de uso da cannabis era semelhante ao grupo controlo. Não foram detectadas diferenças cognitivas significativas entre os utilizadores de cannabis e o grupo não utilizador de drogas. Contudo, o grupo de utilizadores de MDMA obteve nas tarefas cognitivas resultados significativamente piores do que os grupos controlo. Estes indivíduos apresentaram igualmente o pior desempenho na aprendizagem, memória, resolução de problemas e planeamento estratégico (Gouzoulis-Mayfrank et al. 2000).

Reneman et al. (2000) relacionou resultados da investigação da densidade de receptores 5-HT<sub>2A</sub> no córtex occipital com os resultados do estudo cognitivo “Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVALT)” num grupo de 5 utilizadores de MDMA e num grupo de controlo. Em todos os utilizadores de MDMA verificou uma densidade maior de receptores 5-HT<sub>2A</sub> pós-sinápticos, o que indica um mecanismo compensatório positivo devido à depleção de serotonina. Em simultâneo, detectou no teste RAVALT

que todos eles obtiveram resultados significativamente piores do que os controlos, conseguindo em média lembrar-se de 8,1 palavras contra 12,3 palavras no controlo (Reneman et al. 2000).

Apesar de existirem várias evidências de que a MDMA é responsável por disfunções cognitivas, nem sempre é fácil estabelecer a relação causa-efeito. Os estudos realizados em humanos são sempre necessariamente retrospectivos e podem ter muitos factores que induzem em erro. A questão das várias drogas utilizadas é pertinente. Além disso, é praticamente impossível assegurar que o utilizador tomou realmente MDMA pois muitas vezes as formulações utilizadas contêm outras substâncias que não a MDMA (Morton 2005). Apesar disso, as metodologias utilizadas em alguns dos estudos referidos permitem afastar os factores de erro e comprovar que por si só a MDMA é uma substância que causa défices cognitivos.

#### **2.4.3.2.2. Efeitos Crónicos Psiquiátricos**

Existem vários casos clínicos descritos em que os utilizadores de “ecstasy” descrevem situações de depressão, pânico, psicose, agressividade, ansiedade e distúrbios alimentares (McCann et al. 2000; Morgan 1998; Schifano 2000). Mas as observações individuais destas manifestações têm a limitação de poderem ser vistas como inespecíficas ou idiossincráticas (Parrott 2002). Por este motivo, foram realizados estudos sistemáticos para avaliar até que ponto os efeitos psiquiátricos são ou não devidos à utilização da MDMA (Parrott 2002).

Uma análise realizada num centro de tratamento de toxicodependentes com 150 utilizadores de MDMA revelou as seguintes queixas psiquiátricas: depressão, psicose e pânico. Este estudo verificou também que utilizadores mais frequentes apresentam mais sintomas. Os autores referiram que a amostra clínica pode ser um factor de erro no estudo, já que não representa todos os tipos de utilizadores de MDMA (Schifano et al. 1998).

Estudos em utilizadores australianos descreveram problemas de depressão, irritabilidade, confusão, problemas do sono, ansiedade e paranóia (Topp et al. 1999).

Noutro estudo, realizado em 50 jovens irlandeses, através de questionários de auto-avaliação, foram descritos os seguintes problemas: ansiedade, hostilidade, obsessão,

ideação paranóica, psicose, somatização, alterações do apetite, sono não reparador e impulsividade (Parrott et al. 2000).

Finalmente, num estudo mais abrangente, 758 jovens adultos italianos e da Grã-Bretanha foram divididos em seis grupos: não utilizadores de drogas, utilizadores de drogas legais (álcool e/ou nicotina), utilizadores de cannabis, utilizadores de múltiplas drogas ilícitas à excepção da “ecstasy”, utilizadores pouco frequentes da “ecstasy” e outras drogas, e utilizadores frequentes da “ecstasy” e outras drogas. Todos os indivíduos foram avaliados pelo SCL-90 que consiste num inventário para avaliar problemas psicológicos e psicopatológicos complementado com um questionário de 30 perguntas. Os resultados deste estudo mostraram que os utilizadores de múltiplas drogas são mais afectados por sintomas psiquiátricos. No entanto, entre os grupos utilizadores de múltiplas drogas e os grupos de utilizadores de “ecstasy” não se encontraram diferenças significativas na incidência de sintomas psiquiátricos o que levou os autores a concluir que este tipo de sintomas não é específico da ‘ecstasy’ e que se encontram presentes nos utilizadores de drogas em geral (Parrott et al. 2001).

Existem, como se pode verificar, uma série de evidências que revelam a capacidade da “ecstasy” desencadear efeitos psiquiátricos. Mas os estudos que levam a estas conclusões são sempre retrospectivos. Além disso, a utilização concomitante de outras drogas pode confundir os resultados e, finalmente, nem sempre é fácil perceber se a droga é a causa da disfunção ou se a disfunção é a causa para o indivíduo utilizar a droga.

#### **2.4.4. Explicação mecanística para as alterações de memória, cognitivas e psiquiátricas.**

Apesar de não existirem muitos estudos que aprofundam as causas mecanísticas responsáveis pelas manifestações neurológicas, existe a noção de que há sempre uma base degenerativa, principalmente a nível serotoninérgico (Morgan 1998; Parrott 2000; Parrott et al. 2001; Parrott et al. 2000; Verkes et al. 2001). Estudos realizados por Morgan, Parrott e colaboradores, e por Verkes e colaboradores, mostram que, possivelmente, os défices de memória têm origem em alterações serotoninérgicas no hipocampo e os défices cognitivos e executivos têm origem nos danos do córtex frontal (Morgan 1998; Parrott 2000; Parrott et al. 2001; Parrott et al. 2000; Verkes et al. 2001).

Num estudo que tentou explicar, a nível molecular, o mecanismo subsequente aos défices de memória causados pela MDMA foram avaliados os aumentos da subunidade NR1 do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e os aumentos da cínase II dependente do  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina desencadeados quando os ratos são sujeitos a um determinado treino. Nos ratos tratados com MDMA o aumento de NR1 e da cínase II dependente do  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina induzido pelo treino não ocorreu. Uma vez que estas duas moléculas estão envolvidas na consolidação da memória, isso indica que este mecanismo pode estar relacionado com os défices causados pela MDMA (Moyano et al. 2004).

## **2.5.Toxicidade Não Neuronal**

### **2.5.1. Toxicidade Hepática**

Existem na literatura vários registos clínicos de hepatotoxicidade mediada pela MDMA (Andreu et al. 1998; Fidler et al. 1996). Os diversos casos relatam hepatites de gravidade variável.

O espaço de tempo entre a última utilização de “ecstasy” e o aparecimento dos sintomas é muito variável. Foram detectados intervalos de tempo entre alguns dias até duas ou três semanas, tornando a determinação da MDMA ou dos seus metabolitos inútil para a avaliação clínica (Andreu et al. 1998).

As doses descritas nestes casos são também muito variáveis. Em algumas situações os danos hepáticos ocorreram após a administração de um ou dois comprimidos enquanto que noutras ocorreu uma utilização regular de “ecstasy” (Andreu et al. 1998).

Além disso, não foi possível estabelecer uma relação entre a extensão das lesões e o padrão de utilização. Existe, por exemplo, um caso descrito de hepatite fulminante após a toma de um único comprimido de “ecstasy” (Ellis et al. 1996). Finalmente, é importante salientar que, além da MDMA, podem estar presentes outras substâncias que contribuem para a toxicidade hepática (Parrott 2004).

Assim, de um modo geral, considera-se que a hepatotoxicidade mediada pela MDMA é uma complicação comum e relativamente frequente (Henry et al. 1992).

A descoberta de elevado número de eosinófilos no tracto portal suporta a hipótese de haver um mecanismo de hipersensibilidade associado aos casos de intoxicação com falência hepática aguda (Andreu et al. 1998). O facto do choque térmico desencadear

lesão hepática por isquemia levou alguns autores a colocarem a hipótese de ser a hipertermia o factor inicial da lesão hepática (Andreu et al. 1998).

Considerando todas as hipóteses levantadas, pensa-se que a toxicidade hepática tem origem em mecanismos tóxicos exercidos pelos neurotransmissores libertados, directamente pela MDMA, e pelos seus metabolitos (Andreu et al. 1998).

#### 2.5.1.1. Catecolaminas

A activação pelas catecolaminas endógenas dos receptores adrenérgicos presentes na artéria hepática pode levar à vasoconstrição com redução do fluxo sanguíneo e consequente hipoxia hepática (Losser & Payen 1996). A activação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos dos hepatócitos pode resultar na redução dos níveis de glutathione, no aumento do cálcio livre e no aumento da respiração mitocondrial. Estes mecanismos podem contribuir para a toxicidade hepática induzida pela MDMA (James et al. 1983; Sies & Graf 1985; Taylor et al. 1983).

O metabolismo das catecolaminas endógenas pode também originar lesão hepática. Estas catecolaminas são principalmente metabolizadas pela monoaminaoxidase (MAO) e pela catecol-O-metiltransferase (COMT). A libertação de catecolaminas induzida pela MDMA faz aumentar o metabolismo pela MAO levando ao aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) intracelular, já que este é um subproduto da desaminação oxidativa catalisada por esta enzima (Goodman et al. 2006).

A libertação exacerbada de catecolaminas pode levar à saturação da capacidade metabólica da MAO e da COMT. Deste modo, as catecolaminas podem mais facilmente entrar em fenómenos de auto-oxidação com formação de ROS e RNS com capacidade para originar stress oxidativo intracelular (Bindoli et al. 1992; Bindoli et al. 1989). Uma vez esgotadas as defesas antioxidantes intracelulares a célula pode morrer por necrose ou apoptose (Bindoli et al. 1992; Bindoli et al. 1989).

Na oxidação das catecolaminas, o grupo catecólico é oxidado formando uma semi-quinona que se oxida a quinona (Bindoli et al. 1989). A catecolamina-*o*-quinona é instável e após desprotonação do grupo amina ocorre o ataque nucleófilo intramolecular do átomo de azoto ao carbono 6 do anel quinónico. Após esta ciclização intramolecular irreversível ocorre a formação de leucoaminocromo. Este é oxidado a semi-quinona e quinona para resultar no respectivo aminocromo. A pH fisiológico a velocidade deste

processo metabólico é lenta e varia em função dos grupos substituintes presentes em cada catecolamina (Carvalho et al. 2004a; Carvalho et al. 2004b; Carvalho et al. 2004c; Chavdarian et al. 1978; Remiao et al. 2002). Apesar disso, a velocidade deste processo de auto-oxidação pode aumentar na presença de catalisadores enzimáticos (ex. xantina oxidase e lipoxigenase) e não enzimáticos (ex. cobre, ferro, manganês, cobalto, níquel, quelatos de cobre e de ferro) (Bindoli et al. 1992). Durante todo o processo descrito, as quinonas e os aminocromos reactivos têm capacidade de entrar em processo oxidativo. Os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) produzidos vão, por acção da superóxido dismutase, originar peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Este, na presença dos metais de transição ferro ou cobre, sofre redução pela reacção de Fenton originando radicais hidroxilos ( $OH^{\cdot}$ ) altamente reactivos. O radical hidroxilo pode ainda reagir com o monóxido de azoto levando à formação de espécies reactivas de azoto (RNS) nomeadamente o anião peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que tem elevado potencial tóxico.

As espécies reactivas de oxigénio (ROS;  $O_2^{\cdot-}$ ;  $OH^{\cdot}$ ;  $H_2O_2$ ) e as espécies reactivas de azoto (RNS;  $ONOO^-$ ) para além de desencadarem fenómenos de stress oxidativo podem também catalisar a oxidação das catecolaminas (Bindoli et al. 1992; Carvalho et al. 2004a; Carvalho et al. 2004b).

Os aminocromos são moléculas instáveis que podem sofrer rearranjos intramoleculares originando diidroxiindoles com capacidade para polimerizar e formar pigmentos escuros e insolúveis designados de melaninas. Além disso, também podem sofrer reacções de oxidação e redução (Bindoli et al. 1992; Carvalho et al. 2004a; Carvalho et al. 2004b; Remiao et al. 2002).

As *o*-quinonas e os aminocromos, além de serem responsáveis pela formação de ROS e RNS, também podem reagir directamente com os constituintes celulares nucleófilos. Assim os produtos de oxidação das catecolaminas podem também inibir enzimas importantes para o metabolismo e para a defesa anti-oxidante nomeadamente, a MAO, a glutathiona peroxidase (GPX), a glutathiona reductase (GR) e a glutathiona-S-transferase (GST) (Remiao et al. 1999).

É também possível que as *o*-quinonas e os aminocromos reajam com a cisteína e com a glutathiona originando tioéteres de elevada reactividade e potencialmente citotóxicos. As reacções podem ocorrer por substituição ou por adição. As quinonas podem também reagir com grupos  $NH_2$  formando bases de Schiff. Apesar dos grupos amina serem pouco nucleófilos a sua abundância pode tornar este fenómeno importante (Bindoli et al. 1989; Carvalho et al. 2004a; Carvalho et al. 2004b; Remiao et al. 2002).

Estes mecanismos de toxicidade estão de acordo com um estudo *in vitro* onde ocorreu indução de morte celular de hepatócitos de rato induzida por vários compostos de natureza quinónica (Nakagawa & Moldeus 1992). Além disso, a morte celular foi precedida pela diminuição dos níveis intracelulares de GSH, grupos SH proteicos e de ATP (Nakagawa & Moldeus 1992).

#### 2.5.1.2. MDMA e metabolitos

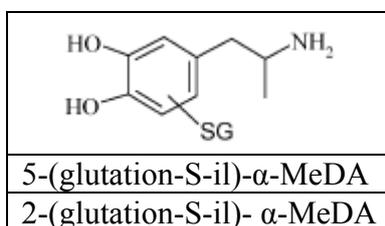
Além da provável toxicidade resultante da oxidação das catecolaminas também se deve considerar a biotransformação da MDMA como potencial via de toxicidade. Isto porque, tal como já foi referido, a principal via de metabolização corresponde à desmetilenação com formação de dois metabolitos catecólicos nomeadamente: o HHA ( $\alpha$ -MeDA) e HHMA (N-Me- $\alpha$ MeDA). Estes dois catecóis podem, à semelhança do que se descreveu para as catecolaminas endógenas, sofrer reacções de oxidação com formação de aminocromos e conjugados com glutathiona e cisteína. A reactividade das quinonas, semi-quinonas aminocromos e tioéteres formados pode desencadear a formação de ROS e RNS induzindo stress oxidativo, depleção das defesas antioxidantes e lesão celular (Bindoli et al. 1992; Carvalho et al. 2004a; Carvalho et al. 2004b).

Estudos recentes comprovam o envolvimento do metabolismo da MDMA nos mecanismos de stress oxidativo e de toxicidade (Carvalho et al. 2004b). Em preparações de hepatócitos isolados, a adição de MDMA levou à depleção de glutathiona (GSH) sem que ocorresse alterações na viabilidade celular, nos níveis de ATP, e nas actividades da glutathiona reductase (GR), glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona S-transferase (GST). Mas, por outro lado, a adição do metabolito HHMA (N-Me- $\alpha$ -MeDA) aos hepatócitos levou à depleção de GSH, à redução da viabilidade celular e à redução da actividade das enzimas anti-oxidantes. A redução da viabilidade celular e a depleção de GSH foram revertidas através de antioxidantes, indicando o possível envolvimento do stress oxidativo. Este estudo demonstra que o metabolismo contribui para a toxicidade hepática da MDMA (Carvalho et al. 2004b).

Estudos realizados pelo mesmo grupo mostraram que a incubação do metabolito MDA com os hepatócitos, tal como para a MDMA, apenas desencadeou depleção de GSH sem interferir com a viabilidade celular e com as actividades das enzimas GR, GPX e GST. Pelo contrário, a adição do metabolito HHA ( $\alpha$ -MeDA) provocou depleção

da GSH, redução da viabilidade celular e redução da actividade da GR, GPX e GST (Carvalho et al. 2004a).

Para todas as moléculas testadas, a depleção de GSH não foi acompanhada pelo aumento do nível de GSSG (glutathiona oxidada), já que a glutathiona foi conjugada com os metabolitos. Neste estudo, foram identificados dois conjugados: 2-(glutathion-S-il)- $\alpha$ -MeDA e 5-(glutathion-S-il)- $\alpha$ -MeDA. Este fenómeno leva à ruptura da homeostase da glutathiona traduzindo-se em menor capacidade antioxidante, o que resulta em alterações proteicas iniciando uma cascata de eventos que leva à lesão hepatocelular (Carvalho et al. 2004a).



**Figura 8** – Metabolitos resultantes da conjugação com glutathiona.

### 2.5.1.3. Hipertermia

A hipertermia também parece contribuir para a toxicidade hepática da MDMA. Os danos hepatocelulares, causados *in vivo* pela MDMA, são semelhantes aos observados *in vitro* em condições de hipertermia (Santos-Marques et al. 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram que a incubação de hepatócitos de rato a 41 °C leva à diminuição significativa de GSH intracelular, aumento de GSSG, peroxidação lipídica e morte celular (Carvalho et al. 1997). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos *in vitro* com hepatócitos de ratinho (Carvalho et al. 2001b). Estudos *in vivo* realizados em ratinhos mostraram que a toxicidade hepática induzida pela MDMA é agravada com o aumento da temperatura ambiente (Carvalho et al. 2002a).

#### 2.5.1.4. Apoptose

Tal como já foi referido, a MDMA tem capacidade para induzir morte celular programada em hepatócitos. A acção pro-apoptótica foi demonstrada em hepatócitos isolados de rato e em células hepáticas mantidas em cultura celular (linha CFSC-2G) (Montiel-Duarte et al. 2004; Montiel-Duarte et al. 2002). A apoptose foi, nesse estudo, acompanhada com redução da proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub>, libertação de citocromo c da mitocôndria e activação da caspase 3. Nas células em cultura celular ocorreu proteólise da poli(ADP-ribose)-polimerase (PARP), uma enzima envolvida na morte celular programada e na reparação do ADN (Montiel-Duarte et al. 2002).

O envolvimento do stress oxidativo para desencadear a apoptose foi estudado na linha celular CFSC-2G. A exposição das células à MDMA desencadeou a acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a redução dos níveis de glutathiona (GSH) (Montiel-Duarte et al. 2004). Estes efeitos foram contrariados pela utilização de antioxidantes. No entanto, a apoptose induzida pela MDMA manteve-se. Assim, os autores concluíram que o stress oxidativo não está envolvido na apoptose desencadeada pela MDMA (Montiel-Duarte et al. 2004). Além disso, verificou-se até que a indução de stress oxidativo leva à activação do factor de transcrição NF-κB que bloqueia parcialmente a acção apoptótica da MDMA (Montiel-Duarte et al. 2004).

Este grupo estudou também o impacto do metabolismo da MDMA sobre a sua capacidade apoptótica. Assim, utilizando quinidina para inibir a CYP2D6 que, como já foi referido, é crucial para o metabolismo oxidativo da MDMA (Maurer et al. 2000), observou-se a diminuição do efeito apoptótico da MDMA. Desta forma, este grupo concluiu que a acção apoptótica da MDMA depende do metabolismo e possivelmente da formação de conjugados com a glutathiona e com a cisteína (Montiel-Duarte et al. 2004).

### 2.5.2. Sistema Cardiovascular

A toxicidade cardiovascular mediada pela MDMA foi desde cedo detectada em diversas situações clínicas de utilizadores de ‘ecstasy’ (Milroy et al. 1996).

Estes acontecimentos desencadearam o interesse em estudar os efeitos cardiovasculares desta molécula. As primeiras investigações observaram, no rato, efeitos estimulantes sobre o coração nomeadamente, taquicardia e arritmia (Gordon et al. 1991). Além disso, a MDMA facilita a vasoconstrição (Fitzgerald & Reid 1994).

A hipertensão é outro sintoma que se pode detectar em ratos, sendo um efeito dependente da dose. A administração de MDMA a ratos desencadeia redução da frequência cardíaca, mesmo para doses abaixo de 1 mg/kg por via intravenosa. A bradicardia possivelmente resulta como resposta reflexa (mediada pelos barorreceptores) à hipertensão (O’Cain et al. 2000). A subida da pressão arterial também foi detectada em utilizadores de MDMA (Vollenweider et al. 1998).

O perfil da resposta cardiovascular tende a variar ao longo dos vários episódios de administração. Os estudos realizados em ratos mostraram que a administração repetida aumenta os efeitos cardiovasculares e agrava a cardiotoxicidade após cada administração (Badon et al. 2002). Esta descoberta pode ser um indicador da perigosidade para o sistema cardiovascular dos utilizadores de ‘ecstasy’ com um padrão de utilização frequente desta droga.

Finalmente, estudos recentes em cardiomiócitos isolados de rato revelaram que, além da cardiotoxicidade mediada pelas alterações monoaminérgicas, ocorre também toxicidade directa. Os principais metabolitos da MDMA (MDA, HHMA e HHA) levam a alterações morfológicas dos cardiomiócitos, alterações na homeostase da glutathione, formação de conjugados da HHMA e HHA com glutathione, aumento dos níveis de cálcio extracelular, depleção de ATP e redução da actividade de enzimas antioxidantes. Estas manifestações de toxicidade não se verificaram para a MDMA, o que mostra que, *in vitro*, a cardiotoxicidade só acontece depois de o metabolismo ocorrer (Carvalho et al. 2004c).

À semelhança do que foi descrito anteriormente para o fígado, também no coração ocorre toxicidade resultante do metabolismo das catecolaminas (Carvalho et al. 2001a; Carvalho et al. 2004c; Chavdarian et al. 1978).

### 2.5.3. Sistema Imunitário

À semelhança de outras drogas de abuso, a MDMA é uma substância imunossupressora, podendo por isso aumentar a susceptibilidade a doenças infecciosas. Num estudo de revisão (Connor 2004) foram sumariados os efeitos imunossupressores a seguir enumerados.

1. Redução da fagocitose pelos neutrófilos.
2. Supressão da produção de citocinas pro-inflamatórias.
3. Supressão da produção de factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).
4. Supressão da produção de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).
5. Aumento da citocina imunossupressora interleucina 10 (IL-10) e promoção do fenótipo imunossupressivo.
6. Redução do número de linfócitos circulantes, com redução expressiva das células T CD4<sup>+</sup>.
7. Alteração da funcionalidade das células T com diminuição da mitose estimulada.

A maior parte destes efeitos não resulta da acção directa da MDMA sobre as células imunes, mas sim indirectamente através da libertação descontrolada de imunomoduladores nomeadamente, glucocorticoides e catecolaminas, que podem desencadear respostas imunossupressoras (Connor 2004).

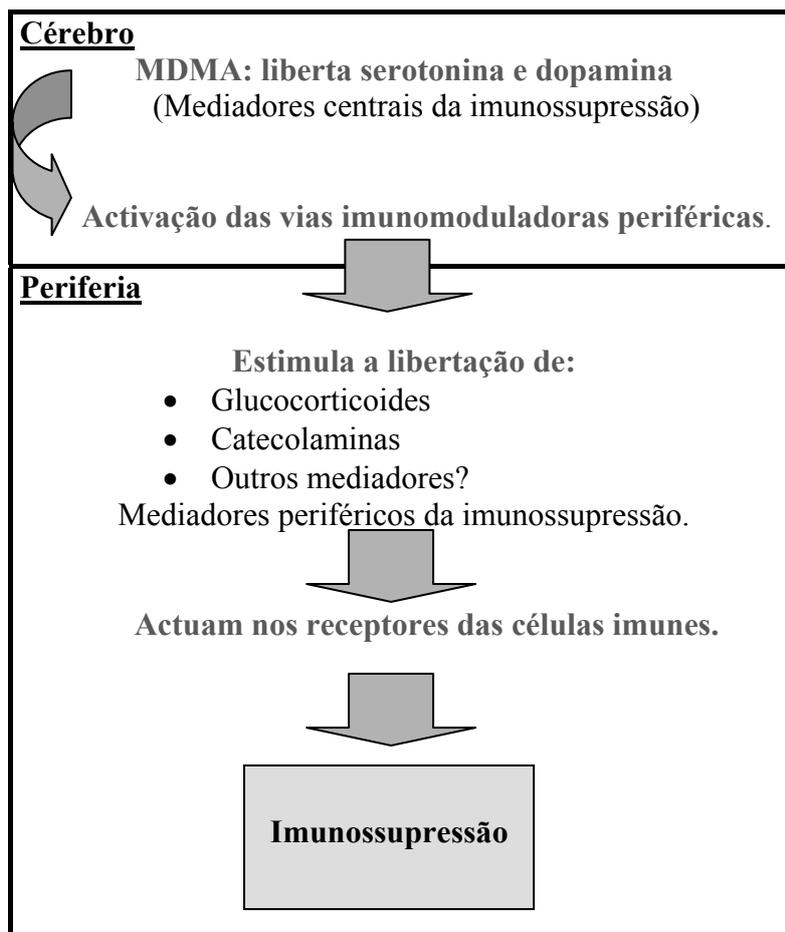
Apesar disso, existem evidências de que as células do sistema imunitário produzem transportadores da serotonina e da dopamina e que sofrem a acção directa da MDMA. (Gordon & Barnes 2003; Mossner & Lesch 1998) Os estudos realizados por House e colaboradores concluíram que, *in vitro*, os efeitos directos da MDMA são moderados e variáveis, dependendo da dose e do parâmetro em estudo (House et al. 1995). Num sentido oposto, os estudos *in vivo* e *in vitro* com zymosan (um tipo de parede celular da *Saccaromyces cerevisiae* altamente imunogénica) detectaram efeitos supressores directos da MDMA na resposta imune nomeadamente no que respeita à fagocitose realizada pelos neutrófilos. Neste caso, parece ocorrer uma acção directa da MDMA sobre o neutrófilo (Connor et al. 2004).

Os efeitos indirectos da MDMA devem-se essencialmente às alterações na libertação de neurotransmissores a nível do sistema nervoso central. A incidência destas modificações ocorre principalmente sobre a serotonina e a dopamina (Green et al. 2003) e produzem consequentemente a activação de vias de imunomodulação periféricas

nomeadamente, a nível do eixo hipotálamo-pituitária-supra-renal e a nível do sistema nervoso simpático (Green et al. 2003; Nash et al. 1988).

A relação entre a libertação de serotonina e os efeitos imunossupressores foi inicialmente estabelecida através de estudos comparativos entre a fenfluramina e a MDMA. A fenfluramina é uma substância capaz de induzir a libertação selectiva de serotonina. Além disso, exerce efeitos imunossupressores semelhantes aos verificados para a MDMA. Através deste estudo deduziu-se que os efeitos imunossupressores dependem da activação serotoninérgica (Connor & Kelly 2002; Connor et al. 2000). Um estudo recente em humanos mostra que o tratamento com um inibidor da recaptação da serotonina (paroxetina), que impede a entrada de MDMA para o terminal pré-sináptico e previne a libertação de serotonina, consegue bloquear os efeitos imunossupressores da MDMA (Pacifici et al. 2004). A libertação de dopamina pela MDMA também pode conduzir a efeitos imunossupressores já que outras drogas com potente acção sobre a libertação dopaminérgica, como a anfetamina ou a metanfetamina, têm efeitos imunossupressores em roedores (Connor 2004).

Tal como já se referiu, a consequência última da libertação destes neurotransmissores a nível central é a activação do eixo hipotálamo-pituitária-supra-renal e do sistema nervoso simpático (Green et al. 2003; Nash et al. 1988). Estes produzem glucocorticoides e catecolaminas com potencial de desencadear respostas imunossupressoras (Bateman et al. 1989; Elenkov et al. 2000).



**Figura 9** - Mecanismo responsável pela Imunossupressão mediada pela MDMA. Adaptado de Connor (2004).

#### 2.5.4. Rim

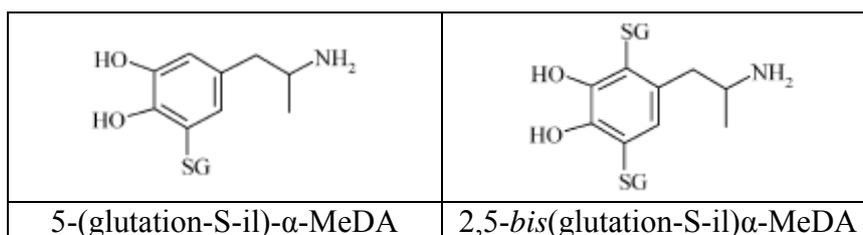
Existem na literatura várias descrições de falência renal após a utilização recreativa de MDMA (Bingham et al. 1998; Fahal et al. 1992; Henry et al. 1992; Walubo & Seger 1999).

Podem ser nomeados vários fenómenos induzidos pela MDMA que possivelmente estão envolvidos na falência renal. A coagulação intravascular disseminada, a vasoconstrição, a rabdomiólise, a hipotensão e a hipertermia são alguns exemplos de possíveis causas que contribuem para estas ocorrências, e que estão geralmente presentes nos casos clínicos descritos (Fahal et al. 1992; Henry & Hill 1998; Walubo & Seger 1999).

A coagulação intravascular disseminada e a rabdomiólise estão envolvidas na isquemia renal, na falência renal e na necrose tubular aguda devido à obstrução da

microvasculatura pelos agregados plaquetários e precipitação de mioglobina (Cunningham 1997).

Além dos factores descritos existe a possibilidade da MDMA ou dos seus metabolitos exercerem toxicidade renal. Estudos *in vitro* realizados em culturas primárias de células tubulares proximais humanas e de rato mostraram que a MDMA e a MDA não são directamente tóxicos, mas que os metabolitos HHA ( $\alpha$ -MeDA), 5-(glutation-S-il) $\alpha$ -MeDA e 2,5-bis(glutation-S-il) $\alpha$ -MeDA são nefrotóxicos potentes (Carvalho et al. 2002b). Paradoxalmente, a citotoxicidade mais intensa foi detectada para os conjugados com a glutatona. A conjugação da glutatona com grupos electrófilos resulta normalmente na destoxificação e eliminação sob a forma de ácidos mercaptúricos. Neste caso, essa conjugação intensificou a toxicidade dos metabolitos da MDMA sobre as células renais (Carvalho et al. 2002b).

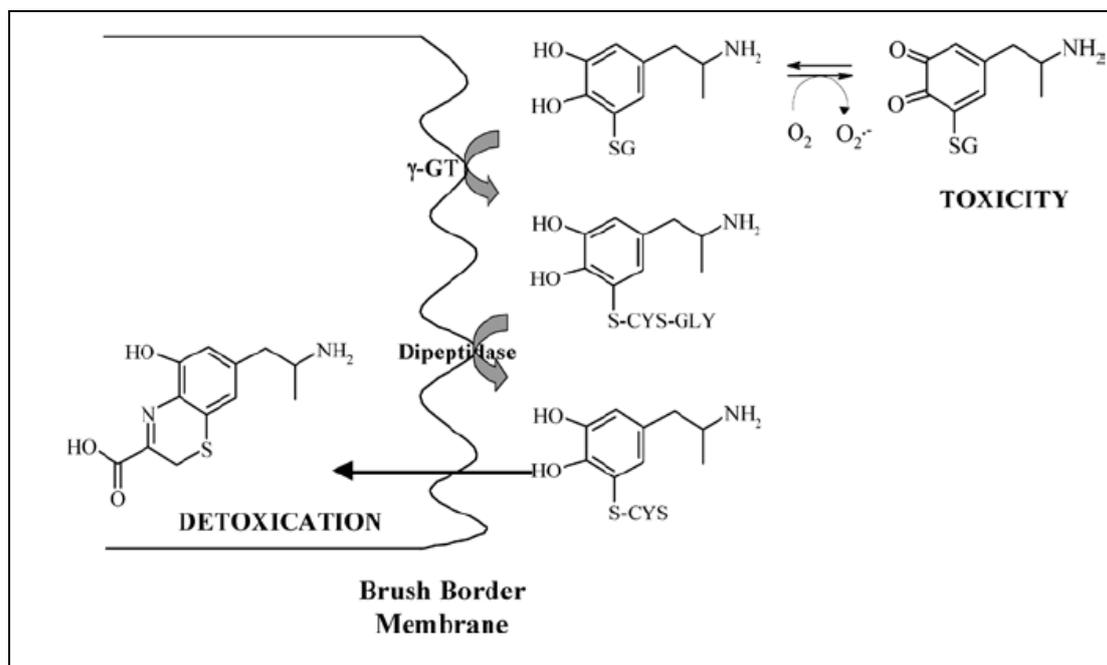


**Figura 10** - Metabolitos resultantes da conjugação com a glutatona.

A redução da viabilidade celular deve-se à acção pro-oxidante destes metabolitos. Tal como já foi descrito, os catecóis iniciam o ciclo redox com a formação de espécies reactivas de oxigénio. Em primeiro lugar forma-se o anião superóxido ( $O_2^-$ ), seguido do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e por fim forma-se o radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). O anião superóxido sofre dismutação espontânea ou mediada pela superóxido dismutase formando peróxido de hidrogénio. Além disso, o anião superóxido também reage com o monóxido de azoto para formar peroxinitrito ( $ONNO^-$ ) que é um citotóxico potente. Após a redução do  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  pelo radical superóxido, o  $Fe^{2+}$  reage com o peróxido de hidrogénio para dar origem ao radical hidroxilo que reage com macromoléculas essenciais ao funcionamento celular (Carvalho et al. 2002b). O metabolito HHA ( $\alpha$ -MeDA) pode sofrer polimerização oxidativa originando produtos diméricos e poliméricos. A presença de pigmentos semelhantes a melanina nas culturas tratadas com  $\alpha$ -MeDA confirma esse processo (Carvalho et al. 2002b).

Em geral, a nefrotoxicidade dos metabolitos conjugados com glutaciona pode ser aumentada devido à elevada actividade renal da  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT). Esta enzima, localizada na membrana das células epiteliais dos túbulos proximais, leva à formação de dipéptidos cisteinilglicina. Os dipéptidos são substratos das dipeptidases que também estão presentes em grande quantidade na membrana das células epiteliais dos túbulos proximais. O conjugado de cisteína resultante é transportado para o interior da célula através dos transportadores de aminoácidos. Aí a hidroquinona pode ser oxidada a quinona entrando em ciclo redox (Bolton et al. 2000).

No caso específico do metabolito 5-(glutation-S-il) $\alpha$ -MeDA este mecanismo parece funcionar no sentido da destoxificação (Figura 11). Após a hidrólise mediada pela  $\gamma$ -GT e a subsequente clivagem mediada pela dipeptidase ocorre a ciclização do conjugado de cisteína. Nesta reacção, o grupo amino cisteinil condensa com o grupo carbonilo da quinona originando um composto do tipo benzotiazolilo. Esta reacção elimina a função quinona responsável pela reactividade molecular, prevenindo assim a entrada em ciclo redox (Carvalho et al. 2002b).



**Figura 11** - Via de destoxificação do conjugado com a glutaciona: 5-(glutation-S-il) $\alpha$ -MeDA. A hidrólise mediada pela  $\gamma$ -GT e a subsequente clivagem mediada pela dipeptidase formam um conjugado com cisteína. O grupo amino cisteinil condensa com o grupo carbonilo da quinona originando um composto do tipo benzotiazolil que é mais estável e menos tóxico (retirado de Carvalho et al. 2002b).

### 2.5.5. Músculo

Um dos efeitos mais conhecidos da MDMA é a rabdomiólise caracterizada por dores musculares, fraqueza muscular e urina acastanhada (Cunningham 1997). Potencialmente fatal, a incidência da rabdomiólise nos utilizadores de “ecstasy” é elevada (Henry et al. 1992).

A rabdomiólise consiste na destruição do músculo esquelético com a libertação de enzimas musculares como a creatinina fosfocínase (CK) e a transaminase glutâmico-oxaloacética (GOT), libertação de ADP (adenosina difosfato), de mioglobina, potássio, fósforo, cálcio, creatinina e outros constituintes celulares (Lane & Phillips 2003).

Existem três factores que contribuem para a rabdomiólise induzida pela MDMA: a hiperpirexia, o consumo aumentado de energia devido ao exercício físico intenso e as lesões acidentais (Cunningham 1997). No seu conjunto, estes factores vão contribuir para os fenómenos de falência renal e coagulopatia.

A libertação de creatinina cínase e creatinina conjuntamente com a libertação de noradrenalina e vasopressina mediada pela MDMA podem, de forma sinérgica, desencadear agregação plaquetária (Bushfield et al. 1987; Filep & Rosenkranz 1987). Além disso, a libertação de um activador do plasminogénio muscular pode provocar aumento da fibrinólise que conduz a um estado de coagulação intravascular disseminada, que por sua vez contribui para o desenvolvimento da toxicidade renal (Terada et al. 1988).

A mioglobulinúria contribui para a falência renal aguda. Esta resulta dos elevados níveis plasmáticos de mioglobina e da redução do pH urinário. A mioglobina precipita nos túbulos renais causando obstrução. A obstrução leva a lesão da parede epitelial dos túbulos renais o que inverte o sentido da difusão do filtrado. A hipoperfusão renal e a isquemia contribuem finalmente para a necrose renal (Cunningham 1997).

## 2.6. Conclusões

O acrónimo químico MDMA é o mais conhecido no mundo das drogas. Este facto deve-se aos efeitos cognitivos e psicológicos quase exclusivos desta substância. A acção entactogénica é central e responsável pela utilização disseminada a nível geográfico e demográfico.

Com esta revisão geral pode-se concluir que os efeitos observados resultam de uma interacção difusa entre a substância e o sistema nervoso afectando principalmente o sistema serotoninérgico, o sistema dopaminérgico e o sistema adrenérgico.

A par dos efeitos comportamentais, esta substância exhibe um perfil de toxicidade disseminado e que abrange diversos sistemas fisiológicos. Muitas das respostas observadas são secundárias à activação desses sistemas fisiológicos. Um bom exemplo de resposta secundária é a imunossupressão que resulta da activação do eixo hipotálamo-pituitária-supra-renal que, por sua vez, produz glucocorticoides e catecolaminas com potencial imunossupressor.

A toxicidade da MDMA está intimamente relacionada com o metabolismo. Uma vez metabolizada, a MDMA origina metabolitos que além de actuarem directamente sobre receptores são também responsáveis pela formação de ROS e RNS que desencadeiam stress oxidativo.

Os estudos até hoje realizados mostraram que a toxicidade sobre células, neuronais, renais, hepáticas e cardíacas depende da ocorrência de metabolismo que produz substâncias reactivas capazes de quebrar o equilíbrio redox da célula.

As respostas de cada utilizador recreativo à droga são muito variáveis e até imprevisíveis. Os motivos para este fenómeno prendem-se com a qualidade das formulações apresentadas no mercado e com as características fisiológicas do utilizador.

Desta forma, a importância da investigação da “ecstasy” engloba a caracterização da droga, do utilizador e da interacção entre a droga, o utilizador e o meio cultural e social do mesmo.

Actualmente, existe grande actividade científica em torno da biotransformação e do seu impacto sobre o utilizador mas, apesar de muito se saber nesta área, ainda não existem conhecimentos suficientes para estabelecer uma terapêutica eficaz nos sintomas agudos e na prevenção dos efeitos crónicos associados à MDMA. Uma terapêutica direccionada para o metabolismo só será possível depois de compreender quais as vias

metabólicas e quais os metabolitos responsáveis por cada efeito observado. Por outro lado, será também essencial compreender a importância da variabilidade genética nas respostas à MDMA.



# Capítulo III

## Hiponatremia e MDMA



### **3. CAPÍTULO III - Hiponatremia e MDMA**

#### **3.1. Hiponatremia**

A hiponatremia é uma alteração do equilíbrio electrolítico relativamente comum (Zilberberg et al. 2008). Considera-se a hiponatremia quando a concentração plasmática do catião sódio ( $\text{Na}^+$ ) é inferior a 135 mEq/L (Nathan 2007). Na maior parte das situações é uma condição pouco grave e relativamente assintomática. No entanto, situações agudas de hiponatremia severa podem causar níveis elevados de mortalidade e morbidade, sendo o cérebro o principal órgão afectado. Nestes casos, a ausência de intervenções rápidas pode desencadear défices neurológicos graves e até a morte (Verbalis et al. 2007).

##### **3.1.1. Arginina-Vasopressina**

A hormona arginina-vasopressina (AVP) é um péptido com 9 aminoácidos, sintetizado no hipotálamo supraóptico e no núcleo paraventricular, e armazenado na hipófise posterior. A sua principal acção fisiológica é o controlo do equilíbrio electrolítico do organismo. A acção desta hormona sobre o rim desencadeia uma resposta anti-diurética, conduzindo à retenção de água e sais. Em situações patológicas, a excessiva secreção de AVP pode levar à hiponatremia (Goodman et al. 2006).

##### **3.1.2. Importância da Vasopressina (AVP) na Hiponatremia**

A maior parte dos estados de hiponatremia resultam de níveis excessivamente elevados de AVP e estão relacionados com patologias pré-existentes (Tabela 2 e Tabela 3). A secreção desta hormona é normalmente activada pelo aumento da osmolaridade plasmática, através da activação de osmoreceptores localizados no hipotálamo, ou através da diminuição do volume sanguíneo ou da pressão detectada pelos seios carotídeos, arco aórtico, aurículas cardíacas e vasos pulmonares. Quando a

osmolaridade diminui até atingir o limiar osmótico, os níveis de AVP circulante baixam ocorrendo excreção de água sem electrólitos. Desta forma, o organismo evita a redução da osmolaridade plasmática, repondo o equilíbrio electrolítico (Verbalis et al. 2007).

Quando a secreção de AVP não é inibida perante o estímulo hipo-osmolar, ocorre retenção de água e aumenta a possibilidade de ocorrência de hiponatremia (Verbalis et al. 2007).

Na síndrome de secreção inapropriada da AVP (SIADH) a secreção persistente de AVP, mesmo perante o estímulo hipo-osmolar, desencadeia retenção de água impedindo o restabelecimento do equilíbrio hidro-electrolítico. Os motivos para a SIADH são vários e incluem a ingestão de substâncias como a MDMA que modificam os mecanismos de controlo da secreção da AVP (Verbalis et al. 2007).

### **3.1.3. Classificação da Hiponatremia**

A osmolaridade dos fluidos corporais é mantida dentro dos limites fisiológicos através da secreção da AVP e da ingestão de água. Embora existam variações individuais, na população em geral, e sob condições normais de hidratação, a osmolaridade varia entre os 280 e 295 mOsm/kg H<sub>2</sub>O (Verbalis et al. 2007).

Apenas os solutos para os quais as membranas são impermeáveis contribuem para a osmolaridade efectiva. Estes são assim responsáveis pela criação de gradientes através das membranas, influenciando o movimento osmótico da água entre o compartimento extracelular e o compartimento intracelular. A concentração dos solutos que efectivamente contribuem para o movimento osmótico da água é importante para determinar se o estado de hipo-osmolaridade está presente. Como o sódio e os seus respectivos aniões (dos quais se destaca o cloreto) são os solutos que mais contribuem para o equilíbrio osmótico, pode-se dizer que, geralmente, a hipo-osmolaridade é sinónimo de hiponatremia (Verbalis et al. 2007).

No contexto da hiponatremia desencadeada pela MDMA, importa referir os tipos de hiponatremia hipotónica. De uma forma simplificada, assume-se que a hipo-osmolaridade plasmática traduz hiponatremia hipotónica que resulta do excesso de água em relação ao soluto ou que, pelo contrário, resulta da depleção de soluto (Diringer 1992). Normalmente, nos estados de hiponatremia as duas situações estão presentes: excesso de água e depleção de soluto. A hiponatremia hipotónica pode ser de três tipos:

Hiponatremia Hipovolémica, Hiponatremia Euvolémica e Hiponatremia Hipervolémica (Verbalis et al. 2007).

### 3.1.3.1. Hiponatremia Hipovolémica

A hiponatremia hipovolémica resulta da redução do volume de fluido extracelular e da hipovolémia. A depleção de volume pode ter várias causas tal como descrito na Tabela 2.

Como o volume extracelular não pode ser medido, a depleção é normalmente diagnosticada clinicamente através da história clínica, exame físico e dos resultados laboratoriais. Nesta situação, a concentração urinária de sódio é usualmente inferior a 30 mmol/L (Adroque & Madias 2000).

**Tabela 2** - Etiologias da hiponatremia com origem na perda de sódio (adaptado de Verbalis, 2007).

<b>Perdas renais de sódio</b>	<b>Perdas extra renais de sódio</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratamentos com diuréticos</li> <li>• Síndrome da perda de sal cerebral (“Cerebral salt wasting syndrome” ou “CSWS”)</li> <li>• Deficiência mineralocorticoide</li> <li>• Nefropatia da perda de sal (“Salt-wasting nephropathy”)</li> <li>• Bicarbonatúria, glicosúria, cetonúria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perdas gastrointestinais               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Vômito</li> <li>○ Diarreia</li> </ul> </li> <li>• Perdas pelo suor               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Exercício físico de resistência (prolongado)</li> </ul> </li> <li>• Outras perdas               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pancreatite</li> <li>○ Lesões musculares</li> <li>○ Queimaduras</li> <li>○ Obstruções intestinais</li> </ul> </li> </ul>

### 3.1.3.2. Hiponatremia Euvolémica

Existem diversas situações de hipo-osmolaridade com volume extracelular normal ou com alterações tão pequenas que não são clinicamente detectáveis (Tabela 3). A maior parte das situações de hiponatremia euvolémica estão relacionadas com a SIADH. Clinicamente não existem sinais da alteração do volume extracelular e as concentrações urinárias de sódio estão aumentadas verificando-se progressivamente a diminuição da concentração do sódio plasmático à medida que a água ingerida é retida pela acção da

AVP. Nesta situação a concentração urinária é normalmente superior a 30 mmol/L. Por vezes, devido à depleção de sódio, esta concentração pode ser secundariamente baixa (Verbalis et al. 2007).

### 3.1.3.3. Hiponatremia Hipervolémica

A ocorrência de aumento de volume extracelular clinicamente detectável reflecte geralmente hipervolemia. Nesta situação a hipo-osmolaridade, sendo secundária a patologias associadas (Tabela 3), resulta da acumulação de água devido à redução da excreção desencadeada pela secreção de AVP (Nathan 2007).

As concentrações urinárias de sódio são usualmente baixas, abaixo dos 30 mmol/L devido à activação do eixo renina-angiotensina-aldosterona que impede a excreção renal de sódio apesar do excesso de volume de líquidos.

**Tabela 3** - Etiologias da hiponatremia com origem na diluição (adaptado de Verbalis, 2007).

<b>Excreção Renal de Água Diminuída</b>	
<p><b>Hiponatremia Euvolémica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SIADH                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tumores</li> <li>○ Distúrbios do Sistema Nervoso Central</li> <li>○ Induzida por drogas (ex. MDMA)</li> <li>○ Doenças pulmonares</li> <li>○ SIDA</li> <li>○ Exercício físico prolongado</li> </ul> </li> <li>• Deficiência glucocorticoide</li> <li>• Hipotireoidismo</li> </ul>	<p><b>Hiponatremia Hipervolémica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insuficiência Cardíaca congestiva</li> <li>• Cirrose</li> <li>• Síndrome nefrótica</li> <li>• Falha renal</li> </ul>
<b>Ingestão Excessiva de Água</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polidipsia primária</li> </ul>	

### 3.2. Hiponatremia desencadeada pela MDMA

Existem na literatura vários relatos da ocorrência de hiponatremia e edema cerebral após a utilização de MDMA. Esses casos clínicos estão resumidos na Tabela 4. Os efeitos adversos descritos são graves e potencialmente fatais (Henry et al. 1992; Holden & Jackson 1996; Maxwell et al. 1994; Parr et al. 1997). Todos os casos relatados ocorreram em jovens do sexo feminino, indicando uma possível predisposição deste gênero. Além disso, a ingestão excessiva de água parece ter contribuído para o agravamento da situação clínica.

Em variadas situações clínicas descritas na literatura, na análise toxicológica apenas se detectou a presença de MDMA e seus metabolitos. A ausência de outras drogas permitiu avaliar e confirmar a contribuição da MDMA para o efeito de hiponatremia (Holden & Jackson 1996; Maxwell et al. 1994; Parr et al. 1997).

Os principais sintomas detectados estão de acordo com a SIADH, à exceção do edema que não acontece nesta síndrome (Henry et al. 1998; Holden & Jackson 1996; Parr et al. 1997).

Os critérios que definem a SIADH são: hiponatremia hipotônica, osmolaridade da urina superior ao valor adequado para a osmolaridade plasmática, natriurese aumentada, ausência de edema ou depleção de volume e função renal e supra-renal normais. Esta síndrome é causa relativamente comum da hiponatremia e resulta do aumento aberrante ou sustentado dos níveis de AVP produzida pelo hipotálamo e libertada pela hipófise. A elevação da hormona AVP leva à retenção renal de água e expansão do fluido extracelular o que é compensado pelo aumento da excreção urinária de sódio ( $\text{Na}^+$ ). A retenção de água em simultâneo com excreção aumentada de sódio leva à hiponatremia (Rai et al. 2006).

A classificação da hiponatremia desencadeada pela MDMA pode ser difícil já que, embora ocorra a sintomatologia da SIADH, tipicamente associada à hiponatremia euvolêmica, nos casos de ingestão de MDMA deve ser considerado o edema pois além da retenção de água mediada pela AVP pode haver ingestão excessiva de água. A hiponatremia pode ainda ser agravada pela perda de sódio no suor devido à hipertermia desencadeada pela MDMA.

A ocorrência de situações de hiponatremia associadas à utilização de MDMA levou alguns autores a tentar estabelecer a relação entre os níveis plasmáticos da MDMA e os

níveis de AVP. Num estudo em humanos a administração de doses baixas de MDMA (40 mg) a indivíduos do sexo masculino provocou o aumento intenso e agudo do nível de vasopressina plasmática. Este ensaio mostrou um perfil de libertação totalmente aberrante da AVP quando comparado com a variação circadiana normal dos controlos (Forsling et al. 1998; Henry et al. 1998). Além disso, o estudo refere não haver correlação estatisticamente significativa entre a variação dos níveis plasmáticos da MDMA e da AVP (Henry et al. 1998). Esta falta de correlação foi mais tarde relacionada com a possibilidade de serem os metabolitos da MDMA os responsáveis pela libertação da AVP (Fallon et al. 2002; Forsling et al. 2001; Forsling et al. 2002).

Forsling e colaboradores, nestes ensaios em humanos, detectaram mais tarde uma significativa correlação negativa entre as concentrações de MDMA e AVP uma hora após a administração. Esta correlação negativa mais uma vez mostrou a possibilidade de ser um metabolito, e não a MDMA, a provocar o aumento da AVP (Forsling et al. 2001). Estes resultados foram a base para que este grupo de trabalho realizasse um estudo para verificar a importância do metabolismo da MDMA na libertação da AVP e no desencadear da SIADH. Nesse contexto, foram realizadas experiências *in vitro* em hipotálamo isolado de rato. Além da MDMA foram testados os seus principais metabolitos (Figura 4): 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), N-metil- $\alpha$ -metildopamina (HHMA),  $\alpha$ -metildopamina (HHA), 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA) e 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA). Todos os compostos afectaram a libertação da vasopressina. Os metabolitos HMMA e HHA apresentam maior capacidade do que a MDMA para induzir a libertação de AVP. O metabolito HHMA apresentou menor actividade indutiva do que a HMMA e a HHA (Forsling et al. 2002). Este estudo, ao ser realizado em hipotálamo isolado de rato, permitiu excluir qualquer contribuição dos efeitos sistémicos provocados pela MDMA na libertação da AVP. Assim, os resultados obtidos mostram que a MDMA e os seus metabolitos actuam directamente no hipotálamo (Forsling et al. 2002). Os efeitos da MDMA no ser humano podem portanto resultar da acção directa da MDMA e seus metabolitos sobre o hipotálamo (Forsling et al. 2002).

Tal como já foi referido, existem numerosos mecanismos capazes de desencadear a libertação de AVP. Mas não estão ainda estabelecidas as relações entre esses mecanismos, a acção da MDMA e a consequente libertação de AVP. Como a acção da MDMA resulta na estimulação do sistema serotoninérgico, o mecanismo que mais provavelmente está envolvido é a regulação serotoninérgica da secreção neuro-hormonal.

A activação de receptores serotoninérgicos leva a aumentos dos níveis de AVP sistémica. A utilização de agonistas e antagonistas de selectividades conhecidas permitiu descobrir que os receptores 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub> são importantes na regulação da secreção de AVP pela hipófise (Jørgensen et al. 2003b).

Além da secreção, a serotonina também está envolvida na síntese da AVP. A síntese da AVP ocorre nos neurónios magnocelulares do núcleo hipotalâmico supraóptico e do núcleo hipotalâmico supraventricular. Verificou-se que a nível do núcleo hipotalâmico supraventricular a activação dos receptores 5-HT<sub>2</sub> leva ao aumento do mRNA correspondente à vasopressina. Por outro lado, a síntese que ocorre no núcleo hipotalâmico supraóptico não depende da estimulação serotoninérgica (Jørgensen et al. 2003a).

Do que até agora foi exposto pode concluir-se que existem vários mecanismos que podem desencadear a hiponatremia mediada pela MDMA e que tais mecanismos podem acontecer em simultâneo. Além disso, verificou-se a importância do metabolismo na indução da libertação da AVP pela MDMA. Finalmente, na literatura apenas estão descritas ocorrências de SIADH em mulheres. Estes pressupostos levam a questionar quais os factores que regulam a susceptibilidade individual ao aparecimento do SIADH.

A contribuição do metabolismo da MDMA para a libertação de AVP destaca mais uma vez a importância das diferenças entre a capacidade metabólica individual.

Como anteriormente se referiu, a transformação da MDMA em HHMA mediada pela isoenzima CYP2D6 do citocromo P450 pode influenciar a susceptibilidade individual para a libertação de AVP já que esta enzima apresenta polimorfismo genético existindo na população indivíduos com diferentes capacidades metabólicas (Bertilsson et al. 2002; Forsling et al. 2001; Lin et al. 1997).

A formação do metabolito HMMA, que tem maior capacidade de induzir a libertação de AVP *in vitro*, depende da catecol-O-metiltransferase (COMT). A susceptibilidade individual também pode ser afectada pelo polimorfismo desta enzima (Forsling et al. 2002). De facto, na população humana, o polimorfismo genético da COMT apresenta uma distribuição trimodal onde se incluem: os indivíduos com baixa actividade enzimática (COMT<sup>LL</sup>), com actividade enzimática intermédia (COMT<sup>LH</sup>) e com alta actividade enzimática (COMT<sup>HH</sup>) (Männistö & Kaakkola 1999).

Estudos com ratos fêmea mostraram que a sensibilidade do organismo à acção da AVP varia durante os ciclos reprodutivos (Forsling et al. 1996). A variação dos efeitos da AVP durante o ciclo menstrual também foi detectada em mulheres (Claybaugh et al.

2000). Assim, a variação da resposta à AVP associada a possíveis diferenças metabólicas e de género, podem ser a explicação para diferenças de susceptibilidade ao efeito de hiponatremia desencadeado pela MDMA (Forsling et al. 2001).

**Tabela 4** - Resumo de Casos Clínicos de intoxicação com MDMA em que ocorreu hiponatremia. F – feminino; Valores normais de sódio plasmático 135-145 mmol/L; Sódio plasmático <135 mmol/L é critério de hiponatremia.

Estudo	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Sintomas	Sódio plasmático mmol/L	Outras observações
(Maxwell et al. 1994) – Caso 1	F	17	Tremuras epiletiformes, confusão mental, incontinência urinária, resposta à dor mas com apatia	130	Presença de MDMA na urina Episódio não fatal Ausência de outras drogas psicoactivas
(Maxwell et al. 1994) – Caso 2	F	17	Confusão mental, sem capacidade de comunicar, incontinência	118	Presença de MDMA no plasma e na urina Dança contínua durante o final da tarde Ingestão de 5L de água Ausência de outras drogas
(Holden & Jackson 1996)	F	20	Incontinência urinária, confusão mental, prostração, sem resposta à dor, apatia, pupilas dilatadas e reflexo à luz reduzido, edema cerebral	112	Presença de MDMA na urina Ingestão de grande quantidade de água Excesso de Arginina-vasopressina (4,5pmol/L) Episódio não fatal
(Parr et al. 1997)	F	15	Vômito, confusão mental, dificuldade respiratória, hipoventilação, apneia, taquicardia, coma, edema pulmonar e edema cerebral	125	Ingestão de grande quantidade de água Presença de MDMA na urina e no plasma Ausência de outras drogas Episódio Fatal
(Matthai et al. 1996) – Caso 1	F	15	Consciência diminuída, coma, edema cerebral moderado	119	Presença de MDMA na urina Episódio não fatal
(Matthai et al. 1996) – Caso 2	F	16	Coma	112	Presença de MDMA na urina Episódio não fatal
(Ajaelo et al. 1998)	F	19	Contracções involuntárias das pernas e braços, coma, edema cerebral	115	Ingestão de MDMA e cerveja Episódio não fatal

### **3.3. Conclusões**

A ingestão de MDMA desencadeia a libertação de AVP. A alteração do padrão de libertação desta hormona leva à SIADH. Esta síndrome associada aos efeitos de hipertermia com ingestão excessiva de água e perda de sódio pelo suor, levam à hiponatremia frequentemente associada a hipervolemia. A redução das concentrações do sódio plasmático pode desencadear finalmente o edema e a morte cerebral.

Desta forma, os profissionais de saúde envolvidos na gestão deste tipo de intoxicações devem estar alertados para este fenómeno, podendo assim optar pelas atitudes terapêuticas mais adequadas.

Capítulo IV  
Validação do método de Cromatografia  
Gasosa com Detecção por  
Espectrometria de Massa (GC-MS/MS)  
para a quantificação simultânea da  
MDMA e dos seus metabolitos MDA,  
HMA e HMMA em plasma e urina



## **4. CAPÍTULO IV - Validação do método de Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS/MS) para a quantificação simultânea da MDMA e dos seus metabolitos MDA, HMA e HMMA em plasma e urina**

### **4.1. Introdução**

Este trabalho resultou da necessidade de desenvolver um novo método para a quantificação simultânea da MDMA e três dos seus metabolitos. A utilidade do método abrange não só a investigação científica da toxicocinética da MDMA, mas também a área clínica e forense da intoxicação com “ecstasy”.

A quantificação da MDMA e da MDA é de grande utilidade já que estas duas substâncias estão frequentemente presentes nas formulações apreendidas. No que diz respeito aos metabolitos estes podem ser usados como marcadores de exposição à MDMA, além disso, os metabolitos da MDMA têm potencial tóxico. A capacidade da HMMA desencadear a libertação de vasopressina no hipotálamo isolado de rato é um exemplo de uma interacção mediada por um metabolito com potencial tóxico (Forsling et al. 2002).

O desenvolvimento deste novo método resulta de algumas dificuldades sentidas na execução de métodos anteriormente publicados, nomeadamente no que diz respeito à dificuldade de obtenção de metabolitos deuterados para serem utilizados como padrões internos (Kim et al. 2007; Kolbrich et al. 2008; Pirnay et al. 2006).

O objectivo deste trabalho experimental foi validar um método que utilizasse um só padrão interno, comercialmente disponível, para a quantificação das quatro substâncias em questão: MDMA, metilendioxianfetamina (MDA), 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA) e 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA).

Neste método, pretenderam-se atingir limites de quantificação baixos e gamas de linearidades amplas. As linearidades amplas, podem ser úteis na aplicação clínica e forense já que as concentrações de MDMA e dos seus metabolitos na urina e no plasma são muito variáveis, dependendo das formulações ingeridas e do metabolismo. Na investigação da toxicocinética da MDMA em animais de laboratório é importante ter

um método que consiga detectar elevadas concentrações de MDMA e metabolitos na urina e, por outro lado, detectar concentrações mais baixas no plasma.

## 4.2. Materiais e Métodos

### 4.2.1. Materiais utilizados

Todos os reagentes utilizados tinham elevado grau de pureza. O anidrido trifluoroacético (TFAA) e a 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina (PI ou Padrão Interno) foram obtidos da Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri). O cloridrato de ( $\pm$ )3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) foi obtido por extracção de comprimidos apreendidos pela Policia Judiciária. A MDMA assim obtida foi caracterizada por ressonância magnética nuclear e por espectrometria de massa. Os metabolitos 3,4-metilenodioximetamfetamina (MDA), 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA), e 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) foram sintetizadas pelo REQUIMTE/CQFB, Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Para a hidrólise enzimática foi utilizada a enzima  $\beta$ -glucuronidase do tipo HP-2 de *Helix pomatia* adquirida à Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri). A extracção em fase sólida foi executada com as colunas Oasis<sup>®</sup> MCX SPE de 1cm<sup>3</sup> (30 mg) obtidas da Waters (Milford, Massachusetts).

### 4.2.2. Matriz para análise

Urina e plasma sem analitos foram obtidos de ratos Wistar adquiridos ao laboratório Charles River (Barcelona, Espanha). Os ratos foram mantidos durante 24 horas em gaiolas metabólicas com livre acesso a água e alimento. As urinas foram recolhidas no final desse período. Os animais mantidos nestas condições foram anestesiados com éter e após incisão cirúrgica o sangue foi recolhido da veia cava inferior para tubos heparinizados.

### 4.2.3. Soluções Padrão

As soluções concentradas de MDMA, MDA, HMA, HMMA e do padrão interno foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. Todas as soluções de concentração intermédia foram preparadas, diariamente, por diluição das respectivas soluções concentradas em metanol.

### 4.2.4. Reacção de Hidrólise Enzimática

Após administração, a MDMA sofre metabolismo extenso. Apenas uma pequena fracção é excretada intacta na urina. Depois da metabolização de fase I, que leva à formação dos metabolitos MDA, HHMA e HHA e da reacção de fase II, que origina a HMA e a HMMA, ocorrem outras reacções de fase II em que estes metabolitos são conjugados com o anião sulfato e o ácido glucurónico (de la Torre et al. 2000; Green et al. 2003).

Para que seja possível a quantificação total dos metabolitos é necessário proceder à respectiva hidrólise dos conjugados. Com este objectivo, recorreu-se à acção da enzima  $\beta$ -glucuronidase de *Helix pomatia*. Esta enzima encontra-se comercialmente disponível (Ortuño et al. 1999). As  $\beta$ -glucuronidasas dos moluscos têm actividade glucuronidase e sulfatase. Desta forma, conseguem-se hidrolisar, com uma só enzima, os conjugados com ácido glucurónico e com anião sulfato (Ortuño et al. 1999).

A reacção de hidrólise foi realizada em todas as amostras de plasma e urina fortificadas com os analitos, de forma a mimetizar a matriz e o procedimento executado em amostras reais.

#### 4.2.4.1. Técnica para hidrólise da urina

- Aliquotas de 1 mL de urina de rato fortificadas com MDMA, MDA, HMA e HMMA, foram transferidas para tubos de vidro rolhados de 25 mL.
- Adicionou-se 1 mL de uma solução tampão de acetato de sódio 0,2 M com pH ajustado a 5,2.
- Adicionaram-se 50  $\mu$ L da solução de  $\beta$ -glucuronidase de *Helix pomatia*.

- As amostras assim preparadas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

#### 4.2.4.2. Técnica para hidrólise do plasma

- Alíquotas de 500 µL de plasma de rato fortificadas com MDMA, MDA, HMA e HMMA foram transferidas para tubos de vidro rolhados de 25 mL.
- Adicionaram-se 500 µL de uma solução tampão de acetato de sódio 0,2 M com pH ajustado a 5,2.
- Adicionaram-se 25 µL da solução de β-glucuronidase do *Helix pomatia*.
- As amostras assim preparadas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

#### 4.2.5. Isolamento dos Compostos de Interesse - Extração em Fase Sólida (SPE)

Para concentrar os analitos e eliminar impurezas e possíveis interferências de matriz, foi realizada a separação dos compostos de interesse através de uma extração em fase sólida.

As colunas Oasis<sup>®</sup> MCX SPE de 1cm<sup>3</sup> (30mg) são colunas de fase reversa com troca iônica capazes de reter compostos básicos. Deste modo, estas colunas permitem reter os compostos de interesse através de interação hidrofóbica e através de troca iônica ([www.waters.com](http://www.waters.com)).

##### 4.2.5.1. Técnica para a Extração em Fase Sólida

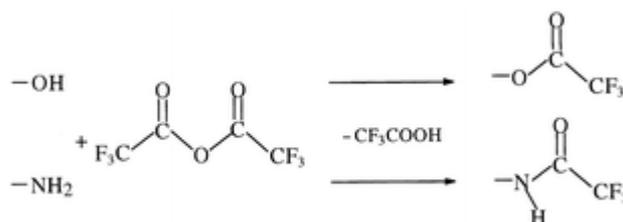
- Aplicou-se a totalidade da amostra hidrolisada na coluna descartável Oasis<sup>®</sup> MCX SPE.
- Através da aplicação de pressão positiva fez-se a eluição da amostra.
- De seguida, foram aplicados através da coluna 2 mL de HCl 0,1 M.
- De seguida, foram aplicados através da coluna 2 mL de metanol.
- Finalmente, os compostos foram eluídos com 2 mL de uma solução de metanol contendo 5% de NH<sub>4</sub>OH.

- As fracções resultantes da última eluição foram evaporadas à secura tendo permanecido no exsiccador, sob vácuo, durante a noite.

#### 4.2.6. Derivatização por perfluoroacilação

Para preparar a MDMA e os metabolitos MDA, HMA e HMMA para a quantificação por GC-MS/MS, procedeu-se a uma derivatização com anidrido trifluoroacético (TFAA) (Figura 12). A reacção de trifluoroacilação ocorre nos átomos mais electrófilos: no átomo de azoto, formando N-TFA, e no átomo de oxigénio, formando O-TFA (Figura 12).

Desta forma, foram obtidos os derivados N-TFA da MDMA e da MDA, N-TFA e O-TFA da HMMA, HMA e do PI (Tabela 5) (Ortuño et al. 1999; Pirnay et al. 2006; Pizarro et al. 2002).



**Figura 12** – Reacção genérica de derivatização com o reagente anidrido trifluoroacético em meio de acetato de etilo, obtendo-se derivados O-TFA e N-TFA.

##### 4.2.6.1. Técnica para a derivatização

- Ao resíduo obtido, após a extracção por SPE, adicionaram-se 50 µL de acetato de etilo e 50 µL de TFAA.
- A mistura anterior foi incubada a 70 °C durante 30 min.
- Depois de arrefecidas à temperatura ambiente, as amostras foram evaporadas à secura sob corrente de azoto.
- O resíduo obtido foi dissolvido em 100 µL de acetato de etilo, estando assim preparado para a quantificação por cromatografia gasosa.

#### 4.2.7. Cromatografia Gasosa com detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS/MS)

Os extractos derivatizados e dissolvidos em acetato de etilo foram analisados com o cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 equipado com um detector selectivo de massa Varian Saturn 4000. A coluna cromatográfica utilizada para a quantificação foi da Varian, VF-5ms×0.25mm×0,25µm modelo Factor Four. O gás transportador utilizado foi o Hélio C-60 fornecido pela Gasin Portugal. Os dados obtidos do cromatógrafo foram geridos com o programa Saturn GC/MS Workstation Software 6.8.

A injeção das amostras foi feita em injetor manual à temperatura de 250 °C em modo “split”, com razão de divisão da amostra de 1/10. Para a eluição da amostra na coluna cromatográfica, a temperatura do forno do GC foi ajustada para 100 °C, tendo sido mantida durante 1 minuto. De seguida, a temperatura aumentou à razão de 15°C/minuto até se atingirem os 300°C que se mantiveram por um período de 10 minutos.

A detecção por espectrometria de massa foi efectuada utilizando um analisador do tipo “Ion Trap”. A fonte de ionização utilizada foi por impacto electrónico a 70 eV (correspondendo a uma ionização em m/z forte). Durante os primeiros 4 minutos o filamento gerador de electrões manteve-se desligado não havendo ionização. O analisador “Ion Trap” foi programado da seguinte forma: a temperatura da linha de transferência, do “manifold” e do “Ion Trap” foram respectivamente, 280, 50 e 180 °C. Só os iões com m/z entre os 50 e 600 é que foram analisados no “Ion Trap”. A corrente de emissão foi de 50 µA e o tempo máximo de ionização foi de 2500 µsec.

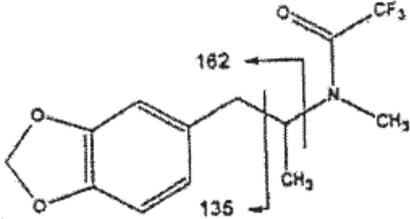
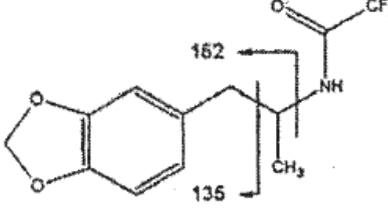
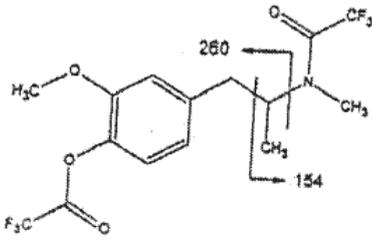
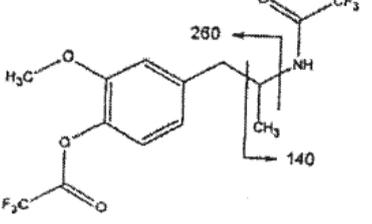
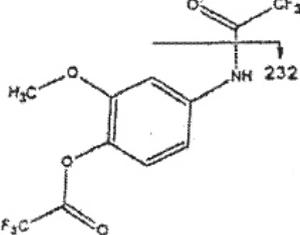
A análise cromatográfica foi realizada em dois modos: “Full Scan Mode”, permitindo a detecção total dos iões (TIC ou “total ion current”) resultantes da fragmentação e em “µSIS mode” no qual os iões a fragmentar são previamente seleccionados e só estes entram para a fonte de fragmentação “Ion Trap” permitindo, deste modo, aumentar a sensibilidade da detecção. Nos dois modos a aquisição de espectros de massa foi feita entre os 4 e os 20 minutos após a injeção da amostra.

Os iões seleccionados para a análise dos cromatogramas estão descritos na Tabela 6. Nas condições referidas foram obtidos os espectros de massa para os derivados da MDMA (Figura 13), MDA (Figura 14), HMMA (Figura 15), HMA (Figura 16) e do Padrão Interno (Figura 17). Os tempos de retenção obtidos para cada analito e padrão

interno foram: PI (7,0 min); HMA (7,5 min); MDA (7,8 min); HMMA (8,2 min) e MDMA (8,7 min) (Figura 18).

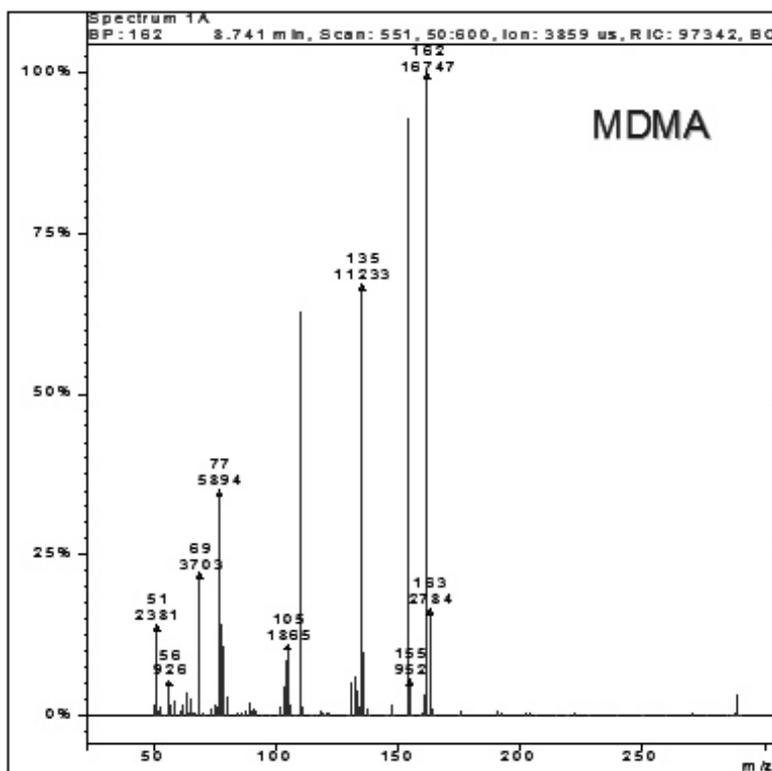
A identificação de cada analito nas amostras foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos compostos puros com os compostos das amostras injectados nas mesmas condições cromatográficas. Para cada pico cromatográfico foi obtido o respectivo espectro de massa.

**Tabela 5** - Estrutura dos analitos e do padrão interno derivatizados, com proposta do padrão de fragmentação (Pizarro et al. 2002).

Estrutura dos analitos e do padrão interno derivatizados	Identificação
	<p>MDMA N-TFA Padrão de fragmentação proposto. (Pizarro et al. 2002)</p>
	<p>MDA N-TFA Padrão de fragmentação proposto. (Pizarro et al. 2002)</p>
	<p>HMMA N-TFA, O-TFA Padrão de fragmentação proposto. (Pizarro et al. 2002)</p>
	<p>HMA N-TFA, O-TFA Padrão de fragmentação proposto. (Pizarro et al. 2002)</p>
	<p>4-hidroxi-3-metoxibenzilamina Padrão Interno N-TFA, O-TFA Padrão de fragmentação proposto.</p>

**Tabela 6** - Iões seleccionados para a quantificação dos analitos por GC-MS/MS.

Analito	Iões seleccionados (m/z)
Padrão Interno ou PI (4-hidroxi-3-metoxibenzilamina)	232
MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina)	135
	162
MDA (3,4-metilenodioxianfetamina)	135
	162
HMMA (4-hidroxi-3-metoximetanfetamina)	154
	260
HMA (4-hidroxi-3-metoxianfetamina)	140
	260



**Figura 13** - Espectro de massa do derivado N-TFA da MDMA.

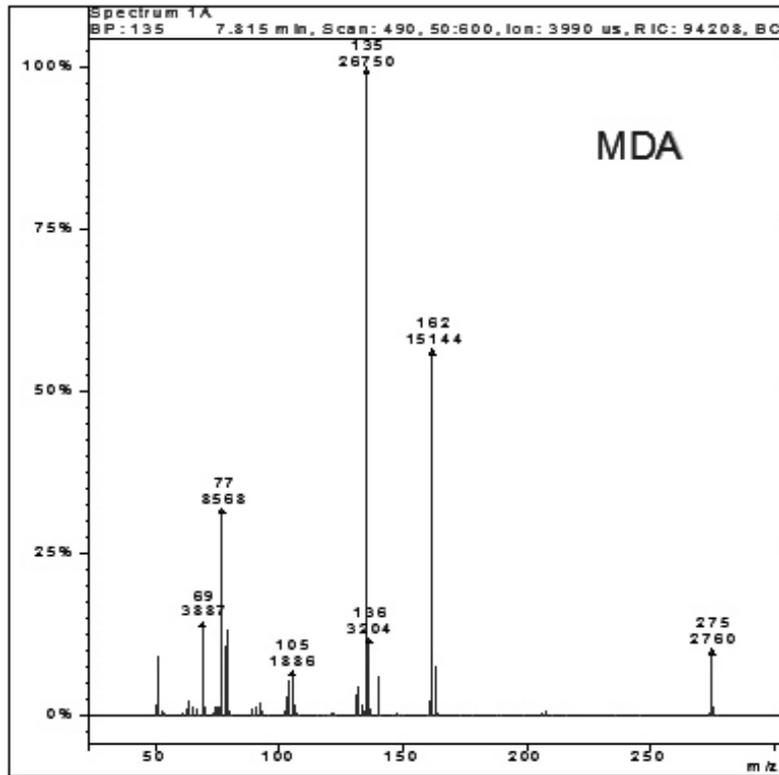


Figura 14 - Espectro de massa do derivado N-TFA da MDA.

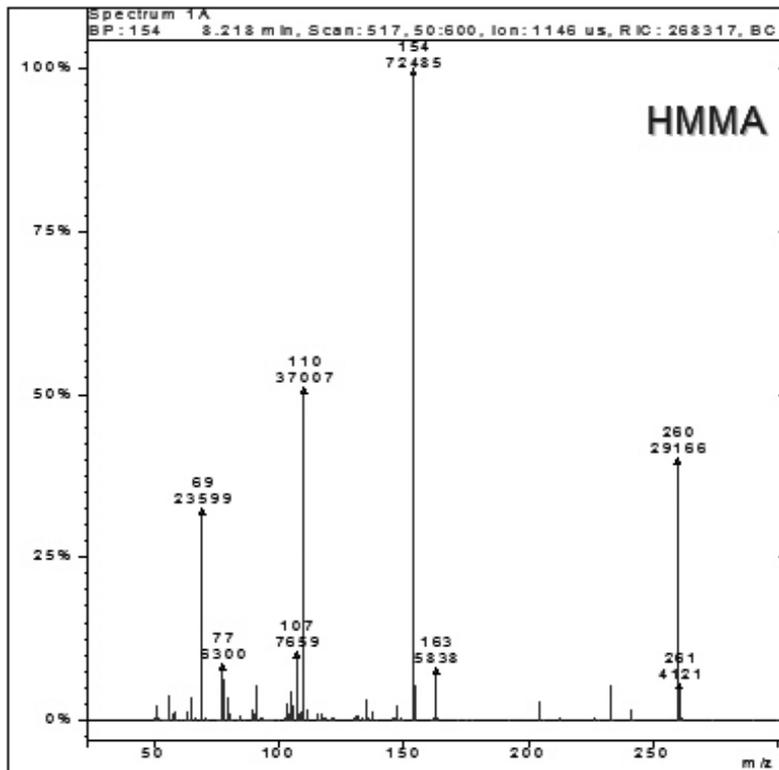


Figura 15 - Espectro de massa do derivado N-TFA e O-TFA da HMMA.

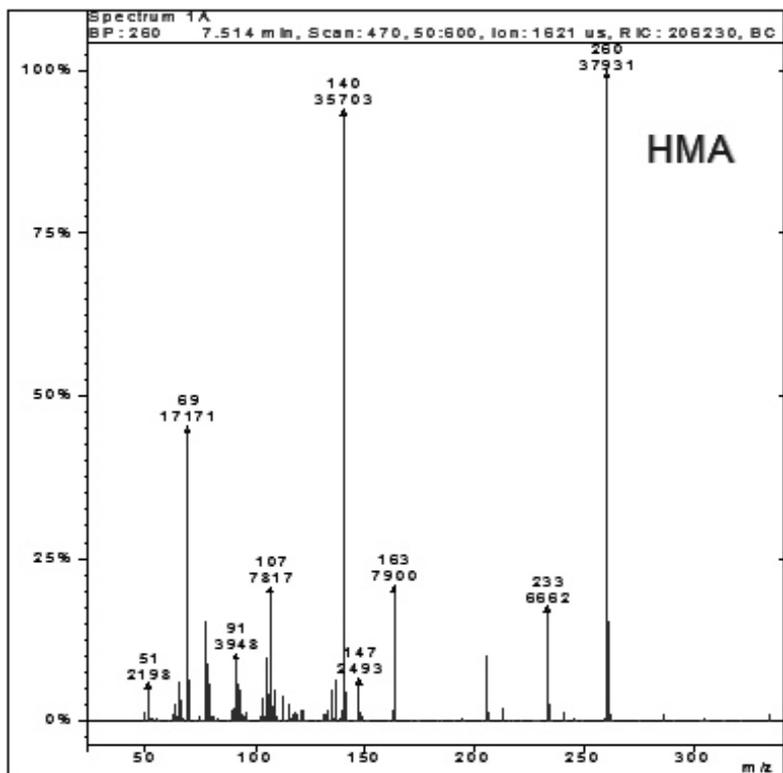


Figura 16 - Espectro de massa do derivado N-TFA e O-TFA da HMA.

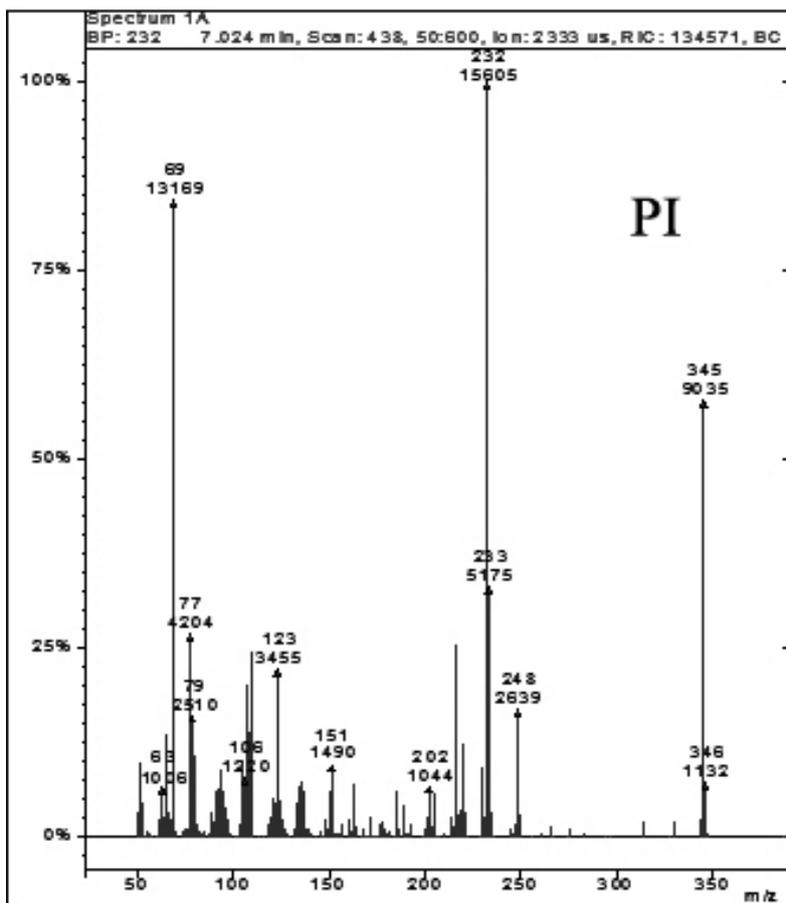
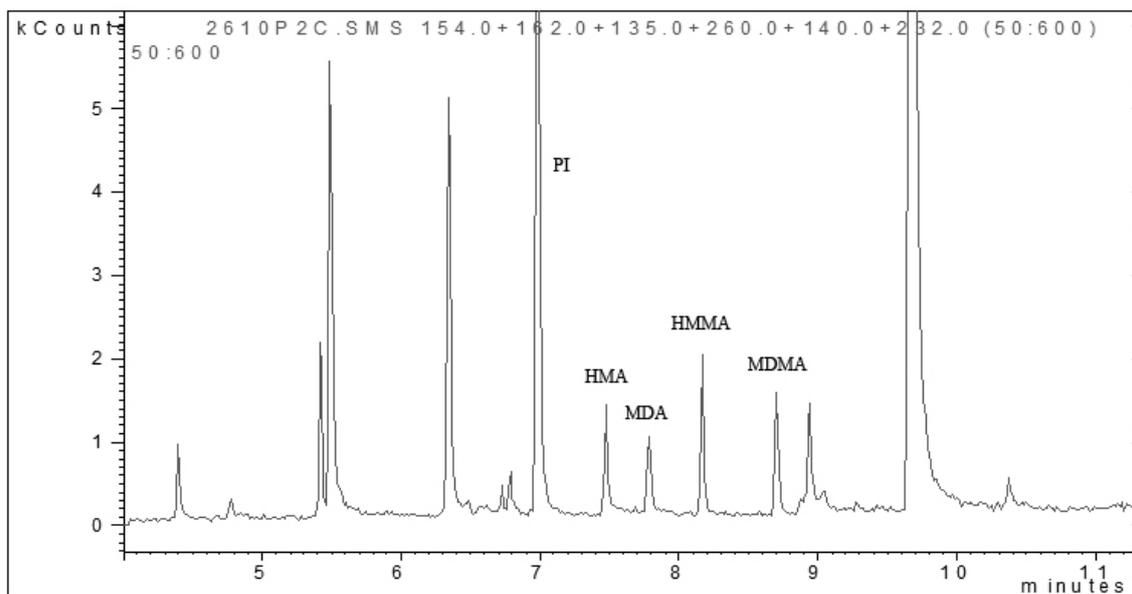


Figura 17 - Espectro de massa do derivado N-TFA e O-TFA da 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina.



**Figura 18** – Cromatograma de uma amostra de plasma obtido em modo "Selected Ion" com os seguintes íons:  $m/z=135$ ,  $m/z=162$  para a MDMA e MDA;  $m/z=140$ ,  $m/z=260$  para a HMA;  $m/z=154$ ,  $m/z=260$  para a HMMA;  $m/z=232$  para o PI. Os tempos de retenção foram: PI (7,0 min); HMA (7,5 min); MDA (7,8 min); HMMA (8,2min) e MDMA (8,7 min).

### 4.3. Validação do Método

A validação do método consistiu na avaliação da linearidade através da preparação das curvas de calibração, na avaliação do limite de quantificação (LOQ ou "Limit of Quantification"), na avaliação do limite de detecção (LOD ou "Limit of Detection"), na avaliação da precisão, da exactidão e do rendimento do processo de extracção.

#### 4.3.1. Calibração

Foram preparadas curvas de calibração em plasma e urina. Cada um dos analitos foi adicionado a plasma e urina sem analitos (brancos), a partir das soluções concentradas previamente preparadas. As concentrações finais nas amostras foram: 0, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 e 10000 ng/mL. Foi também adicionado a todas as amostras o PI na concentração final de 2500 ng/mL na urina e 5000 ng/mL no plasma.

### **4.3.1.1. Técnica para a preparação das amostras para as curvas de calibração**

#### **4.3.1.1.1. Urina**

- Prepararam-se alíquotas de 1 mL de urina.
- A cada alíquota adicionaram-se 10 µL da solução de concentração adequada do respectivo analito, de forma a obter as concentrações finais referidas.
- A cada uma das amostras assim preparadas adicionaram-se 10 µL de uma solução de PI com concentração de 250 µg/mL.
- As amostras assim preparadas foram submetidas a hidrólise enzimática, extracção por SPE e derivatização, tal como foi anteriormente descrito.

#### **4.3.1.1.2. Plasma**

- Prepararam-se alíquotas de 500 µL de urina.
- A cada alíquota adicionaram-se 10 µL da solução de concentração adequada do respectivo analito, de forma a obter as concentrações finais referidas.
- A cada uma das amostras assim preparadas adicionaram-se 10 µL de uma solução de PI com concentração de 250 µg/mL.
- As amostras assim preparadas foram submetidas a hidrólise enzimática, extracção por SPE e derivatização, tal como foi anteriormente descrito.

### **4.3.2. Precisão**

Foi determinada a precisão intra-dia do método de GC-MS/MS para todos os analitos através de cinco quantificações de uma mesma amostra, ao longo de um dia. Na urina, a concentração das amostras testadas foi de 500 ng/mL. No plasma a concentração das amostras foi de 200 ng/mL.

Foi também avaliada a precisão do método de extracção, executando a extracção de cinco alíquotas da mesma amostra. A concentração das alíquotas de urina foi de 200

ng/mL e a concentração das alíquotas de plasma foi de 500 ng/mL para todos os analitos.

A precisão inter-dia foi avaliada para todos os analitos em três amostras com concentrações diferentes fazendo uma determinação por dia, durante três dias. Na urina, foram testadas as concentrações de 50, 100 e 500 ng/mL. No plasma, foram testadas concentrações de 50, 100 e 200 ng/mL.

Todos os extractos foram injectados em duplicado.

#### **4.3.3. Exactidão**

A exactidão foi determinada para todos os analitos em três amostras de concentrações distintas. Nas amostras de urina as concentrações testadas foram de 50, 100 e 500 ng/mL. Nas amostras de plasma as concentrações testadas foram de 50, 100 e 200 ng/mL.

Todos os extractos foram injectados em duplicado.

#### **4.3.4. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)**

Os limites de detecção foram determinados com amostras de plasma e urina cuja concentração originou um sinal 3 vezes superior ao ruído.

Os limites de quantificação foram determinados com amostras de plasma e urina cuja concentração originou um sinal 10 vezes superior ao ruído.

Os limites foram determinados injectando 10 vezes a amostra cuja concentração correspondeu aos critérios referidos. Foram utilizados dois modos de aquisição de sinal: “Full Scan Mode” com aquisição total de iões (TIC ou “total ion current”) com razão m/z entre 50-600 unidades de massa atómica (uma) e “Full Scan Mode” com “ $\mu$ SYs” em que os iões a fragmentar são previamente seleccionados e só estes entram para a fonte de fragmentação, aumentando desta forma a sensibilidade da detecção.

#### **4.3.5. Avaliação do Rendimento do Procedimento de Extração**

O rendimento da extração por SPE foi avaliado para todos os analitos testando três amostras fortificadas com concentrações distintas e avaliando as respectivas recuperações por comparação a extractos fortificados com os respectivos analitos em que o PI foi adicionado após a extração.

Nas amostras de plasma as concentrações testadas foram de 20, 50 e 800 ng/mL. Na urina apenas foi testada a concentração de 20 ng/mL.

Todos os extractos foram injectados em duplicado.

#### 4.4. Resultados e Discussão

A quantificação da MDMA e dos seus metabolitos no plasma e na urina, pelo método de GC-MS/MS descrito, foi validada. Um exemplo de cromatograma tipicamente observado, numa amostra de plasma, está representado na Figura 18.

Os espectros obtidos para cada um dos analitos e PI derivatizados estão representados nas figuras Figura 13 - Figura 17.

Para a realização dos cálculos foram determinadas as razões de áreas entre os picos dos analitos e o pico do PI:

$$S_{anal} = \frac{\text{Área do Pico de Analito}}{\text{Área do Pico do PI}}$$

De acordo com os métodos de validação, foram obtidos os resultados que se seguem.

##### 4.4.1. Curvas de Calibração e Linearidade

As curvas de calibração do método de GC-MS/MS foram lineares para todos os analitos entre os 0-10000 ng/mL. Esta gama de linearidade foi observada para ambas as matrizes em estudo. Os coeficientes de correlação obtidos nas respectivas regressões lineares foram sempre superiores a 0,99 (Tabela 7).

**Tabela 7** - Estudo da linearidade. Curvas de Calibração e coeficientes de correlação obtidos.

<b>Estudo de linearidade</b>			
<b>Plasma</b>	Equação	gama (ng/mL)	r <sup>2</sup>
HMA	y=0,005x+0,0022	0-10000	0,9944
MDA	y=0,0004x+0,0074	0-10000	0,9983
HMMA	y=0,0007x+0,0194	0-10000	0,9963
MDMA	y=0,0004x-0,0139	0-10000	0,9995
<b>Urina</b>			
HMA	y=0,0008x-0,0177	0-10000	0,9985
MDA	y=0,0046x-0,0972	0-10000	0,9989
HMMA	y=0,0021x-0,0778	0-10000	0,9933
MDMA	y=0,0045x+0,263	0-10000	0,9996

#### 4.4.2. Precisão

A precisão do método foi expressa como coeficiente de variação:

$$Precisão (\%) = \frac{Desvio\ Padrão}{Média} \times 100$$

A precisão intra-dia do método de GC-MS/MS foi inferior a 10% para todos os analitos e em ambas as matrizes (Tabela 8).

A precisão do método extractivo também foi determinada, para todos os analitos e nas duas matrizes, tendo sido sempre inferior a 13% (Tabela 8).

No que diz respeito à precisão inter-dia foram obtidos valores abaixo dos 14% e dos 16% para a urina e para o plasma respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 8** - Precisão intra-dia do método de GC-MS/MS e do método de extracção para as duas matrizes. A concentração das amostras de plasma foi de 200 ng/mL, a concentração das amostras de urina foi de 500 ng/mL

	Precisão (%)			
<b>Plasma (200 ng/mL)</b>	HMA	MDA	HMMA	MDMA
Método GC-MS/MS	3,96	4,12	5,00	4,87
Método de Extracção	3,10	9,92	4,96	9,88
<b>Urina (500 ng/mL)</b>				
Método GC-MS/MS	6,81	8,76	9,65	3,57
Método de Extracção	4,77	12,37	9,11	11,03
Precisão (%) = Desvio Padrão/Média (n=5)				

**Tabela 9** - Precisão inter-dia do método GC-MS/MS para as duas matrizes.

<b>Urina</b>	<b>Concentração final (ng/mL)</b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Plasma</b>	<b>Concentração final (ng/mL)</b>	<b>Precisão (%)</b>
HMA	50	6,30	HMA	50	14,50
	100	3,90		100	10,10
	500	2,60		200	2,33
MDA	50	6,34	MDA	50	9,72
	100	6,63		100	15,90
	500	6,34		200	6,37
HMMA	50	10,20	HMMA	50	4,32
	100	13,30		100	4,32
	500	3,10		200	1,23
MDMA	50	6,20	MDMA	50	6,33
	100	12,10		100	13,79
	500	10,50		200	5,61
Precisão (%) = (Desvio Padrão/Média)*100 (n=3)					

#### 4.4.3. Exactidão

A exactidão foi calculada como a percentagem da concentração alvo previamente conhecida.

$$\text{Exactidão (\%)} = \frac{\text{Concentração determinada}}{\text{Concentração alvo conhecida}} \times 100$$

A exactidão do método para a matriz urina variou entre os 93-120%. Para o plasma a exactidão variou entre os 90-116% (Tabela 10).

**Tabela 10** - Exactidão do método GC-MS/MS para as duas matrizes.

Urina	Concentração alvo (ng/mL)	Exactidão (%)	Plasma	Concentração alvo (ng/mL)	Exactidão (%)
HMA	50	119,8	HMA	50	113,2
	100	94,3		100	106,3
	500	96,8		200	107,8
MDA	50	105,4	MDA	50	106,6
	100	93,2		100	92,1
	500	93,4		200	96,9
HMMA	50	104,4	HMMA	50	105,6
	100	92,6		100	95,1
	500	98,4		200	90,3
MDMA	50	96,8	MDMA	50	94,2
	100	116,7		100	115,5
	500	111,2		200	108,2

Exactidão (%) = (Concentração determinada/Concentração alvo conhecida)\*100 (n=3)

#### 4.4.4. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Os limites de quantificação em “Full-Scan mode” e testados para todos os analitos, foram: 10 ng/mL para a urina e de 5 ng/mL para o plasma.

Utilizando o “ $\mu$ SIS-MS mode” foi possível reduzir os limites de quantificação para 5 ng/mL na urina e para 2 ng/mL no plasma (Tabela 11).

Os limites de detecção foram testados em “ $\mu$ SIS-MS mode” e foram de 3 ng/mL na urina e de 1,5 ng/mL no plasma.

**Tabela 11** – Limites de quantificação para todos os analitos, nas duas matrizes, em modo “Full-Scan” e em modo “ $\mu$ SIS”.

	Limite de Quantificação (ng/mL)	
	Full-Scan (n=5)	$\mu$ SIS (n=3)
<b>Plasma</b>		
HMA	5 (7,1)	2 (4,8)
MDA	5 (4,5)	2 (8,0)
HMMA	5 (8,4)	2 (9,2)
MDMA	5 (10,3)	2 (6,8)
<b>Urina</b>		
HMA	10 (12,5)	5 (13,2)
MDA	10 (9,8)	5 (4,2)
HMMA	10 (4,1)	5 (4,1)
MDMA	10 (7,0)	5 (12,0)
( ) – Coeficiente de variação em %		

#### 4.4.5. Rendimento do Procedimento de Extração

As recuperações foram calculadas em percentagem da razão entre as concentrações obtidas após a extração de amostras fortificadas em que o PI foi adicionado antes da extração e as respectivas concentrações obtidas para as amostras fortificadas em que o PI foi adicionado depois da extração.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida depois de adicionar o PI}}{\text{Concentração obtida antes de adicionar o PI}} \times 100$$

Para o plasma foram obtidas extrações com eficiências entre os 72 e os 99%. Para a urina, foram obtidas extrações com eficiências entre os 84 e os 103%. As recuperações foram tendencialmente mais baixas para as concentrações mais elevadas (Tabela 12).

Tabela 12 - Rendimento do procedimento de extração por SPE.

Concentração ng/mL	Recuperação (%)			
	HMA	MDA	HMMA	MDMA
<b>Plasma</b>				
20	99,1	86,1	90,1	97,1
50	85,6	79,2	75,7	98,0
800	83,2	71,6	73,9	73,9
<b>Urina</b>				
20	103,4	87,3	84,4	90,6

#### 4.5. Conclusão

O método desenvolvido foi validado. Com este trabalho demonstrou-se a possibilidade de quantificar em simultâneo a MDMA, MDA HMMA e HMA recorrendo apenas a um padrão interno. O padrão interno seleccionado mostrou-se adequado, sendo fácil de adquirir e evitando deste modo o recurso à síntese de padrões deuterados.

O método apresentou linearidade, precisão, exactidão e limites de quantificação adequados para uma utilização científica, clínica e forense.



Capítulo V  
Indução da Secreção da Vasopressina  
pela MDMA



## 5. CAPÍTULO V - Indução da Secreção da Vasopressina pela MDMA

### 5.1. Introdução

Tal como já foi anteriormente referido, a MDMA é capaz de desencadear a secreção de AVP em humanos (Henry et al. 1998). Estudos *in vitro* demonstraram também que para além da MDMA, alguns dos seus metabolitos têm a capacidade de desencadear a libertação de AVP (Forsling et al. 2002).

Até ao presente momento não existem descritos na literatura estudos sobre a indução da secreção de AVP *in vivo* em animais de experiência. Tal conhecimento será útil para estudos futuros sobre estados de hiponatremia e desequilíbrio hidro-electrolítico causados pela MDMA. Neste trabalho foi estudada a capacidade da MDMA estimular a secreção da AVP no rato. Foram também avaliadas as possíveis correlações entre a secreção da AVP e os níveis plasmáticos e urinários de MDMA, MDA, HMA e HMMA.

O principal objectivo deste estudo foi elucidar a acção da MDMA na libertação da AVP num modelo animal, *in vivo*. Pretendeu-se também verificar a influência do metabolismo na libertação da AVP *in vivo* e observar quais as consequências desse mesmo efeito.

### 5.2. Materiais e Métodos

#### 5.2.1. Materiais utilizados

Todos os reagentes usados nas experiências tinham elevado grau de pureza. O inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) foi obtido da Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri). O cloridrato de ( $\pm$ )3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) foi obtido por extracção de comprimidos apreendidos pela Policia Judiciária Portuguesa. O sal assim obtido foi caracterizado por ressonância magnética nuclear e por espectrometria de massa.

### **5.2.2. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar “outbreed”, machos e fêmeas, com pesos compreendidos entre 250 e 300 g. Estes animais foram adquiridos ao laboratório Charles River (Barcelona, Espanha).

Os animais foram aclimatizados em gaiolas de polietileno de rede metálica no topo e acamadas com aparas de madeira. A temperatura do biotério foi mantida a  $22\pm 2$  °C, humidade entre 40 e 60% e ciclos dia/noite de 12/12 horas. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento até ao início das experiências. Nas experiências com duração de 1 hora o alimento foi retirado antes da administração de MDMA ou NaCl 0,9%.

Os ensaios tiveram sempre início às 16 h.

As experiências foram realizadas de acordo com as orientações para a experimentação animal declaradas pela União Europeia (Convenção Europeia para a protecção de animais vertebrados usados com objectivos experimentais e científicos de 1986, acrescentada da adenda de 1998 da respectiva convenção).

#### **5.2.2.1. Protocolo experimental para animais sacrificados uma hora após a administração de MDMA**

1. Seis animais seleccionados foram pesados e colocados separadamente em gaiolas de polietileno com rede metálica no topo.
2. O alimento foi retirado e os animais passaram a ter apenas acesso a água *ad libitum*.
3. As gaiolas foram alinhadas e devidamente identificadas, alternando animais controlo com animais tratados com MDMA.
4. Com intervalos de 10 minutos os animais foram injectados com uma solução de MDMA preparada em NaCl 0,9% ou com solução de NaCl 0,9%, por via intraperitoneal (i.p.). Para os animais tratados com MDMA o volume injectado foi ajustado ao peso de forma a administrar a dose de 20 mg/kg.
5. Uma hora após a injeção os animais foram anestesiados com éter.
6. Através da utilização de um cateter foi puncionada a veia cava inferior (Figura 19).

7. O primeiro mililitro de sangue foi rapidamente recolhido e transferido para um tubo contendo EDTA.
8. O restante sangue foi recolhido para uma seringa heparinizada e transferido para tubos contendo EDTA.
9. As amostras foram centrifugadas a 1600g durante 15 min a 4 °C.
10. O plasma assim obtido foi transferido para *ependorf* e guardado a -80 °C até à execução de ensaios posteriores.

**Nota:** os tubos para recolha das amostras foram mantidos em gelo até ao armazenamento final.

O estudo foi conduzido em diversas séries de ensaios. Os ensaios realizados com machos e com fêmeas ocorreram sempre em separado.

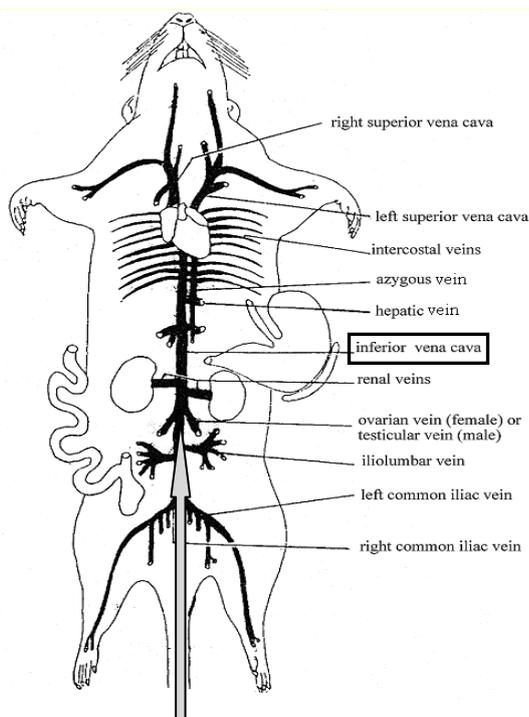
#### **5.2.2.2. Protocolo experimental para animais sacrificados 24h após a administração da MDMA**

1. Seis animais seleccionados foram pesados e colocados separadamente em gaiolas metabólicas da Tecniplast (Buguggiate, Itália).
2. As gaiolas foram alinhadas e devidamente identificadas, alternando animais controlo com animais tratados com MDMA.
3. Com intervalos de 10 minutos os animais foram injectados com uma solução de MDMA preparada em NaCl 0,9% ou com solução de NaCl 0,9%, por via intraperitoneal (i.p.). Para os animais tratados com MDMA o volume injectado foi ajustado ao peso de forma a administrar a dose de 20 mg/kg.
4. Os recipientes de recolha da urina foram mantidos em gelo e com 200 µL de PMSF 100 mM.
5. Vinte e quatro horas após a injeção, as urinas foram recolhidas e os animais foram anestesiados com éter.
6. Através da utilização de um cateter foi puncionada a veia cava inferior (Figura 19).
7. O primeiro mililitro de sangue foi rapidamente recolhido e transferido para um tubo contendo EDTA.

8. O restante sangue foi recolhido para uma seringa heparinizada e transferido para tubos contendo EDTA.
9. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1600g durante 15 min a 4 °C.
10. O plasma assim obtido foi transferido para *ependorf* e guardado a -80 °C até à execução de ensaios posteriores.
11. As amostras de urina foram centrifugadas a 1600g durante 15 min a 4 °C. Finalmente foram decantadas e guardadas a -80 °C até à execução de ensaios posteriores.

**Nota:**

- Os tubos para recolha das amostras foram mantidos em gelo até ao armazenamento final.



**Figura 19** - Sistema circulatório venoso do rato. A punção para recolha de amostra foi realizada na veia cava inferior.

### 5.2.2.3. Administração da MDMA

As soluções de MDMA foram preparadas em solução de NaCl 0,9% (m/v) e injectadas intraperitonealmente num volume de 1 mL/kg. A MDMA foi administrada na dose de 20 mg/kg.

Os animais controlo foram injectados com solução isotónica de NaCl 0,9% (m/v).

#### **5.2.2.4. Técnica de colheita de sangue**

A técnica de colheita de sangue venoso anteriormente descrita foi adaptada tendo em consideração as possíveis variações dos níveis de AVP consequentes à hipovolémia desencadeada durante a recolha.

Com o objectivo de evitar estas variações foi utilizada uma técnica de recolha sequencial do sangue venoso. Para tal, com a ajuda de um cateter, fez-se a recolha rápida e sem ocorrência de hemorragia do primeiro mililitro de sangue e de seguida procedeu-se à recolha do restante sangue.

Deste modo obtiveram-se duas amostras, a que foi recolhida em primeiro lugar foi utilizada exclusivamente para a quantificação da AVP e a que foi recolhida em segundo lugar foi utilizada exclusivamente para a quantificação dos metabolitos.

#### **5.2.3. Quantificação da AVP**

A quantificação da AVP foi realizada em amostras de plasma e de urina. Para as séries de ensaios em que os animais foram sacrificados 1h após a administração da MDMA ou NaCl 0,9% (m/v) a AVP foi quantificada no plasma. Nos animais sacrificados 24h após a administração da MDMA a AVP foi quantificada no plasma e na urina recolhida ao longo desse período.

##### **5.2.3.1. Princípio do método**

Neste trabalho, a quantificação da vasopressina foi executada através de um Imunoensaio Enzimático (EIA), que existe em “Kit” comercialmente disponível (Assay Designs, Michigan).

Este método de quantificação é um imunoensaio competitivo. Para tal, é utilizado um anticorpo policlonal específico para a vasopressina. Este anticorpo tem capacidade para se ligar competitivamente à AVP das amostras, do padrão e à AVP covalentemente associada a uma molécula de fosfatase alcalina.

Uma vez aplicados nos poços da placa, as moléculas de AVP dos padrões, das amostras e da fosfatase-AVP ligam-se competitivamente ao anticorpo durante uma

incubação a 4 °C. Os complexos assim formados fixam-se nos poços da placa, já que estes estão revestidos com anticorpos anti-IgG.

Após a lavagem dos poços, são adicionados os reagentes para que a reacção colorimétrica, catalisada pela fostatase alcalina, ocorra. Deste modo, a intensidade da cor amarela formada é inversamente proporcional à quantidade de AVP existente na amostra ou padrão. A intensidade da cor deve ser medida num leitor de placas.

Antes de executar a técnica, as amostras de plasma e urina foram sujeitas a um processo de extracção em que se removem as proteínas e possíveis interferentes lipófilos.

#### **5.2.3.2. Técnica de extracção**

- Prepararam-se alíquotas de 200 µL de amostra.
- Foram adicionados 400 µL de acetona refrigerada a 0 °C. Agitou-se em vortex.
- O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o resíduo rejeitado.
- Foram adicionados 1400 µL de éter de petróleo refrigerado a 0 °C. Agitou-se em vortex.
- A camada etérea superior foi rejeitada e a fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um tubo de vidro.
- Evaporou-se à secura sob corrente de azoto.
- Reconstituiu-se o resíduo com 120 µL de “Assay Buffer”

#### **5.2.3.3. Técnica para a quantificação**

##### **(Tabela 13)**

- Pipetaram-se 100 µL de “Assay Buffer” (tampão de ensaio) para o poço NSB (ligação não específica) e 100 µL para o poço B<sub>0</sub> (Padrão 0 pg/mL de AVP).
- Pipetaram-se 100 µL de cada padrão de AVP para os respectivos poços.
- Pipetaram-se 100 µL de cada amostra para os respectivos poços.
- Pipetaram-se 50 µL de “Assay Buffer” para o poço NSB.
- Pipetaram-se 50 µL do conjugado azul (complexo fosfatase-AVP) para cada poço à excepção do poço TA (actividade total) e Branco.

- Pipetaram-se 50 µL do anticorpo anti-AVP para todos os poços à excepção do poço TA, Branco e NSB.
- A placa foi selada e misturou-se cuidadosamente. A incubação durou 24h a 4 °C.
- Cada poço foi lavado três vezes com 400 µL de solução de lavagem.
- A placa foi cuidadosamente seca.
- Pipetaram-se 5 µL do conjugado azul ao poço TA.
- Pipetaram-se 200 µL da solução de p-nitrofenil fosfato (pNpp) para todos os poços (substrato para a fosfatase alcalina).
- A mistura foi incubada a 37 °C durante 1h, sem agitação.
- Para terminar a reacção, adicionaram-se 50 µL de solução STOP a cada poço (solução aquosa de fosfato trisódico).
- A leitura das densidades ópticas (DO) a 405 nm com correcção a 570 nm foi realizada imediatamente no leitor de placas (Ceres 9000).

**Tabela 13** - Resumo do procedimento experimental para a quantificação da AVP.

Poço	Tampão de ensaio	Padrões ou amostra	Conjugado Azul	anticorpo Anti-AVP	Incubação 24h a 4 °C e Lavagens 3×400µL.	Conjugado Azul	pNpp	Solução STOP	
B <sub>0</sub>	100µL		50µL	50µL				200µL	50µL
P1		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
P2		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
P3		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
P4		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
P5		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
P6		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
P7		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
Amostra		100µL	50µL	50µL				200µL	50µL
NSB	100+50µL		50µL					200µL	50µL
Branco								200µL	50µL
TA							5µL	200µL	50µL

#### 5.2.3.4. Cálculos

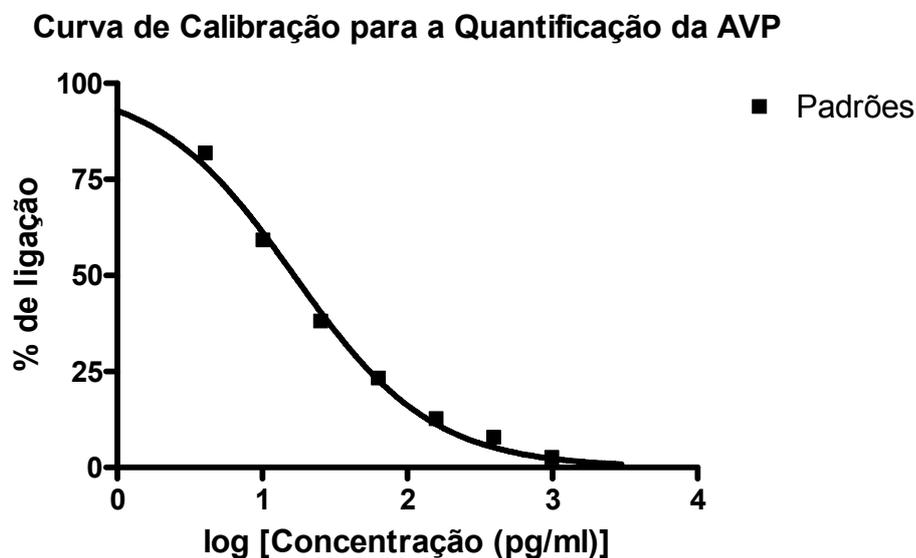
Os valores das concentrações das amostras foram calculados a partir da curva de calibração. A curva de calibração foi obtida através de uma curva logística de 4 parâmetros executada no programa GraphPad Prism 4 (GraphPad, Califórnia).

1. Os valores das DO a 405 nm foram corrigidos subtraindo-lhes os valores obtidos a 570 nm.
2. Foi calculada a percentagem de ligação da AVP-Fosfatase aos anticorpos anti-AVP de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de ligação} = \frac{DO \text{ corrigidas}}{DO \text{ do } B_0} \times 100$$

3. Os valores são calculados automaticamente em função da curva obtida (Figura 20).

Todas as amostras foram testadas em duplicado. Os valores de DO resultam da média de duas leituras. Para cada ensaio foi realizada uma curva de calibração.



**Figura 20** - Curva de calibração para a quantificação da AVP.

#### **5.2.4. Quantificação da MDMA e dos metabolitos MDA, HMA e HMMA**

A MDMA e os metabolitos MDA, HMA e HMMA foram quantificados no plasma e na urina recorrendo ao método de GC-MS/MS validado e descrito anteriormente no Capítulo IV.

#### **5.2.5. Análise estatística**

Os resultados apresentam-se sob a forma de média  $\pm$  erro padrão, para o número de animais testados em cada experiência.

A análise estatística das concentrações de AVP foi realizada recorrendo ao teste de *t-Student* para amostras não emparelhadas. As diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$ .

As correlações entre as concentrações de AVP e as concentrações de MDMA, MDA, HMA e HMMA foram estabelecidas através do coeficiente de correlação de Pearson. As correlações foram consideradas estatisticamente significativas para  $P \leq 0,05$ .

### 5.3. Resultados

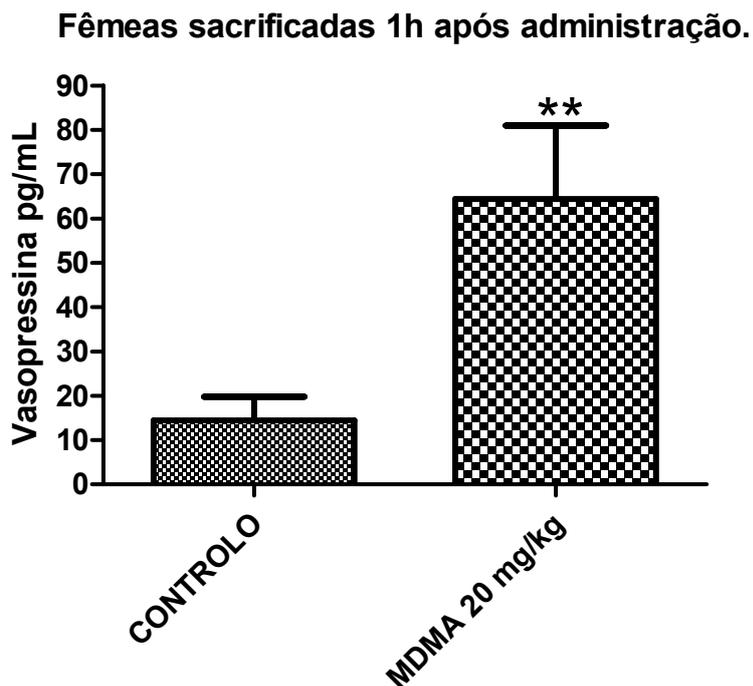
#### 5.3.1. Efeitos da MDMA sobre os níveis plasmáticos de AVP em fêmeas 1h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%

A concentração plasmática média de AVP foi de  $14,44 \pm 5,34$  pg/mL para os animais controlo, injectados com NaCl 0,9%. Nos animais injectados com MDMA (20 mg/kg) foi obtida a concentração média de  $64,39 \pm 16,60$  pg/mL (Tabela 14).

A comparação das médias mostrou que existem diferenças significativas nos níveis plasmáticos de AVP dos animais tratados em relação aos controlos ( $P < 0,01$ ) (Figura 21).

**Tabela 14** - Concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%.

Animais ♀T1h	Concentração plasmática de Vasopressina (pg/mL)	
	CONTROLO	MDMA 20 mg/kg
1	0,77	45,86
2	0,88	160,04
3	1,59	5,16
4	0,89	4,73
5	0,61	48,02
6	57,77	27,66
7	9,90	141,34
8	48,13	81,85
9	23,95	24,05
10	4,42	15,12
11	4,55	38,87
12	27,32	182,22
13	6,89	62,19
n=13	Média=14,44 ± 5,34 (Média ± Erro Padrão)	Média=64,39 ± 16,60



**Figura 21** - Efeito da MDMA sobre concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (\*\*P≤0,01 vs controlo).

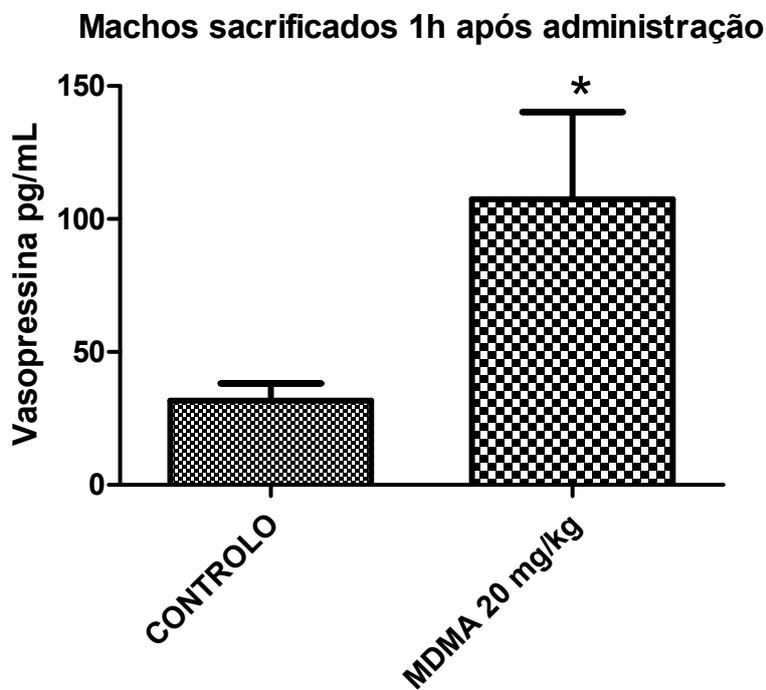
### 5.3.2. Efeitos da MDMA sobre os níveis plasmáticos de AVP em machos 1h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%

A concentração plasmática média de AVP foi de  $31,72 \pm 6,51$  pg/mL para os animais controlo, injectados com NaCl 0,9%. Nos animais injectados com MDMA (20 mg/kg) foi obtida a concentração média de  $107,4 \pm 32,69$  pg/mL (Tabela 15).

A comparação das médias mostrou que existem diferenças significativas nos níveis plasmáticos de AVP dos animais tratados em relação aos controlos ( $P < 0,05$ ) (Figura 22).

**Tabela 15** - Concentração plasmática de AVP em machos Wistar sacrificados 1h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%.

Animais ♂T1h	Concentração plasmática de Vasopressina (pg/mL)	
	CONTROLO	MDMA 20 mg/kg
1	2,29	16,11
2	35,53	144,80
3	4,03	13,59
4	13,05	11,68
5	71,03	17,23
6	48,21	258,44
7	18,80	21,99
8	55,66	190,08
9	39,26	98,57
10	35,09	144,89
11	25,94	21,06
12		350,96
	Média=31,72 ± 6,51 n=11	Média=107,4 ± 32,69 n=12
	(Média ± Erro Padrão)	



**Figura 22** - Efeito da MDMA sobre concentração plasmática de AVP em machos Wistar sacrificados 1h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (\*P≤0,05 vs controlo).

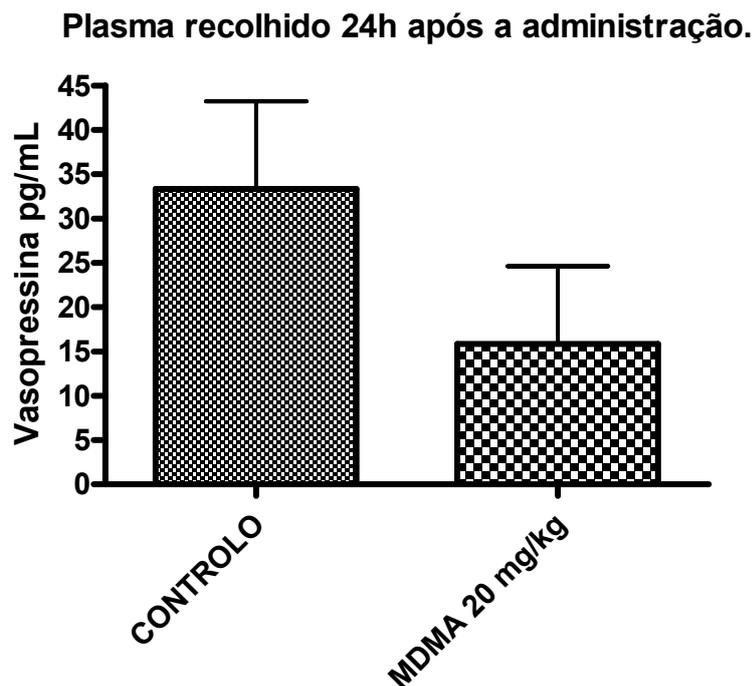
**5.3.3. Efeitos da MDMA sobre os níveis plasmáticos de AVP em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%**

A concentração plasmática média de AVP foi de  $33,32 \pm 9,90$  pg/mL para os animais controlo, injectados com NaCl 0,9%. Nos animais injectados com MDMA (20 mg/kg) foi obtida a concentração média de  $15,84 \pm 8,75$  pg/mL (Tabela 16).

A comparação das médias mostrou que não existem diferenças significativas nos níveis plasmáticos de AVP dos animais tratados em relação aos controlos ( $P < 0,05$ ) (Figura 23).

**Tabela 16** - Concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%.

Animais ♀T24h	Concentração plasmática de Vasopressina (pg/mL)	
	CONTROLO	MDMA 20 mg/kg
1	56,45	23,88
2	52,50	1,58
3	39,73	1,16
4	45,45	36,75
5	3,39	
6	2,43	
	Média= $33,32 \pm 9,90$ n=6	Média= $15,84 \pm 8,75$ n=4
	(Média ± Erro Padrão)	



**Figura 23** - Efeito da MDMA sobre concentração plasmática de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão.

#### 5.3.4. Efeitos da MDMA na concentração urinária de AVP em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0.9%

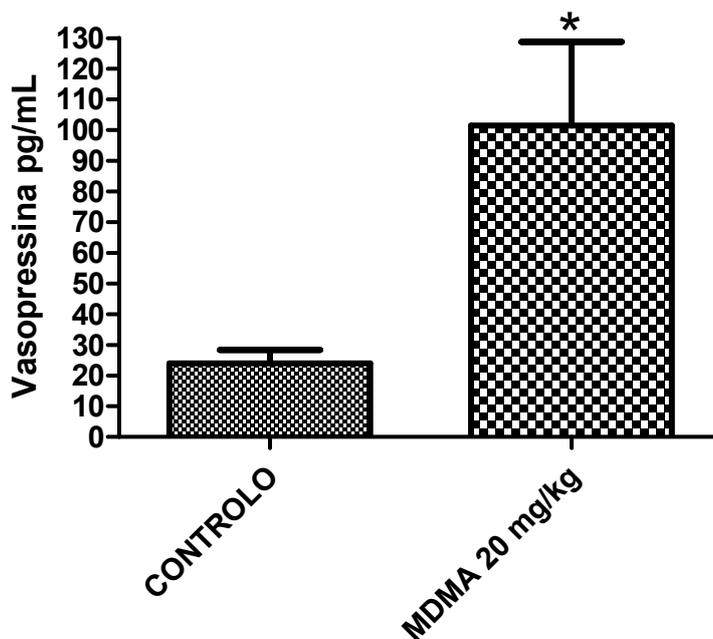
A concentração urinária média de AVP foi de  $23,96 \pm 4,42$  pg/mL para os animais controlo, injectados com NaCl 0,9%. Nos animais injectados com MDMA (20 mg/kg) foi obtida a concentração média de  $101,50 \pm 27,29$  pg/mL (Tabela 17).

A comparação das médias mostrou que existem diferenças significativas na concentração urinária de AVP dos animais tratados em relação aos controlos ( $P < 0,05$ ) (Figura 24).

**Tabela 17** – Concentração urinária de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%.

Animais ♀T24h	Concentração urinária de Vasopressina (pg/mL)	
	CONTROLO	MDMA 20 mg/kg
1	17,25	137,76
2	22,24	128,31
3	34,69	203,95
4	33,42	26,26
5	12,22	51,05
6		61,53
	Média=23,96 ± 4,42 n=5	Média=101,50 ± 27,29 n=6
	(Média ± Erro Padrão)	

**Concentração de AVP na urina recolhida durante 24h**



**Figura 24** - Efeito da MDMA sobre a concentração urinária de AVP em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (\*P≤0,05 vs controlo).

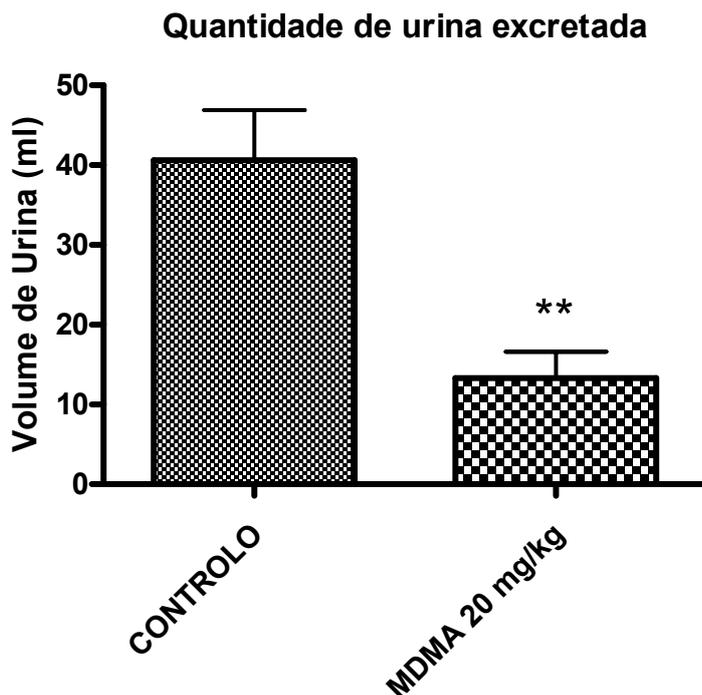
**5.3.5. Efeitos da MDMA na excreção de urina em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%**

O volume médio de urina excretada durante 24 horas foi de  $41 \pm 6$  mL para os animais controlo, injectados com NaCl 0,9%. Nos animais injectados com MDMA (20 mg/kg) o volume médio de urina excretada foi de  $13 \pm 3$  mL (Tabela 18).

A comparação das médias mostrou que existem diferenças significativas na excreção urinária dos animais tratados em relação aos controlos ( $P < 0,01$ ) (Figura 25).

**Tabela 18** – Volume de urina excretada em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%.

Animais ♀T24h	Volume de urina excretada (mL)	
	CONTROLO	MDMA 20 mg/kg
1	54	12
2	36	8
3	26	6
4	30	26
5	57	20
6		8
	Média= $41 \pm 6$ n=5	Média= $13 \pm 3$ n=6
	(Média ± Erro Padrão)	



**Figura 25** - Efeito da MDMA sobre a excreção de urina em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados sob a forma de média±erro padrão (\*\* $P \leq 0,01$  vs controlo).

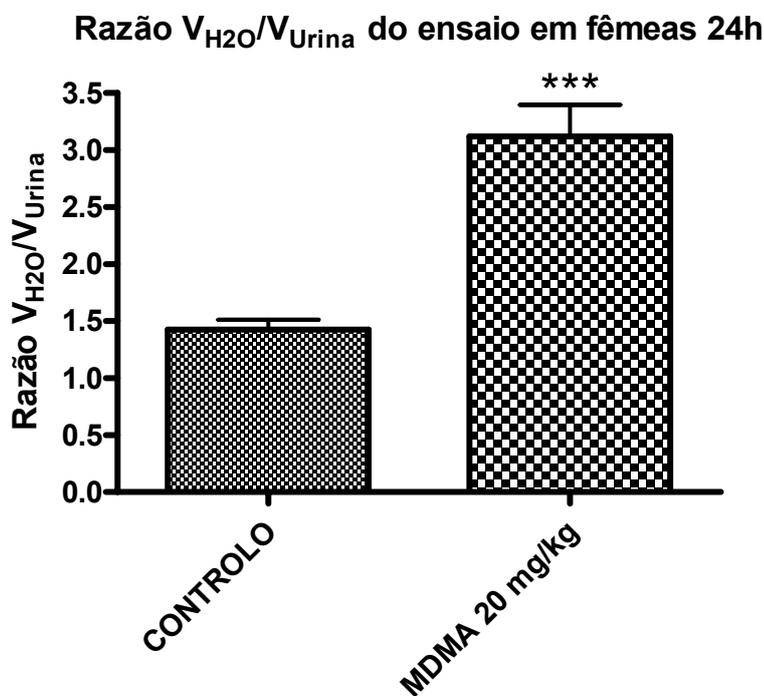
### 5.3.6. Efeitos da MDMA na razão entre o volume de água ingerida e o volume de urina excretada em fêmeas 24h após a administração de MDMA (20 mg/kg) ou NaCl 0,9%

A média das razões entre o volume de água ingerida e o volume de urina excretada para os animais controlo foi de  $1,43 \pm 0,09$ . Nos animais injectados com MDMA (20 mg/kg) a média das razões foi de  $3,12 \pm 0,28$  (Tabela 19).

A comparação das médias mostrou que existem diferenças significativas na razão entre o volume de água ingerida e o volume de urina excretada dos animais tratados em relação aos controlos ( $P < 0,001$ ) (Figura 26).

**Tabela 19** – Razão entre o volume de água ingerida e o volume de urina excretada em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração de MDMA ou NaCl 0,9%.

Animais ♀T24h	Razão $V_{H_2O}$ ingerida/ $V_{Urina}$	
	CONTROLO	MDMA 20 mg/kg
1	1,39	3,33
2	1,39	3,75
3	1,54	3,33
4	1,67	2,31
5	1,14	2,25
6		3,75
	Média=1,43 ± 0,09 n=5	Média=3,12 ± 0,28 n=6
	(Média ± Erro Padrão)	



**Figura 26** - Efeito da MDMA sobre a excreção de urina em fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração. Os valores são apresentados como a razão entre o volume de água ingerido e o volume de urina excretada, sob a forma de média±erro padrão (\*\*\*) $P \leq 0,001$  vs controlo).

**5.3.7. Estudo das correlações entre concentrações de AVP e as concentrações de MDMA, MDA, HMA e HMMA**

**5.3.7.1. Correlações entre as concentrações plasmáticas de AVP e as concentrações plasmáticas de MDMA, MDA, HMA e HMMA quantificadas 1h após a administração da MDMA (20 mg/kg) em fêmeas.**

Não foram estabelecidas correlações estatisticamente significativas entre as concentrações de MDMA e dos metabolitos e a concentração plasmática de AVP, 1 hora após a administração de MDMA (20 mg/kg) a fêmeas (Tabela 20).

**Tabela 20-** Correlação entre as concentrações plasmáticas de AVP e as concentrações plasmáticas da MDMA, MDA, HMA e HMMA para as fêmeas Wistar sacrificadas 1h após a administração da MDMA (20 mg/kg).

♀T1h	AVP (pg/mL)	MDMA (ng/mL)	MDA (ng/mL)	HMA (ng/mL)	HMMA (ng/mL)
1	45,86	3282,98	276,83	26,60	920,92
2	160,04	3170,71	275,90	29,39	703,07
3	5,16	2477,67	615,24	32,40	498,90
4	4,73	1510,75	217,81	22,06	257,51
5	48,02	3419,99	284,34	33,41	928,55
6	27,66	1847,51	268,08	25,80	371,46
7	141,34	3351,03	157,26	22,66	613,63
8	81,85	2757,07	202,28	24,41	781,27
9	24,05	2071,03	466,15	25,79	515,09
10	15,13	2530,91	401,77	33,35	767,81
11	38,87	1996,26	277,43	26,14	547,87
12	182,22	2485,98	369,55	32,04	727,46
13	62,19	2511,13	322,16	27,89	778,49
n=13	<b>64,39 ± 16,60</b>	<b>2570±169,5</b>	<b>647,1±56,14</b>	<b>27,84±1,095</b>	<b>318,1±33,78</b>
	<b>(Média ± Erro Padrão)</b>				
Coeficiente de Pearson r	<b>0,4918</b>	<b>0,3347</b>	<b>0,04273</b>	<b>-0,3418</b>	
Valor de P vs AVP	<b>0,0878</b>	<b>0,2636</b>	<b>0,8898</b>	<b>0,2530</b>	
Intervalo de Confiança de 95%	<b>-0,081 a 0,82</b>	<b>-0,75 a 0,26</b>	<b>-0,52 a 0,58</b>	<b>-0,27 a 0,75</b>	

**5.3.7.2. Correlações entre as concentrações urinárias de AVP e as concentrações urinárias de MDMA, MDA, HMA e HMMA para as fêmeas sacrificadas 24h após a administração da MDMA (20 mg/kg).**

Foram estabelecidas correlações estatisticamente significativas entre as concentrações da MDMA e dos metabolitos e a concentração urinária de AVP, 24 horas após a administração de MDMA (20 mg/kg) a fêmeas. Entre a AVP e a MDMA, MDA, HMA foram estabelecidas correlações positivas ( $P < 0,05$ ). Para o metabolito HMMA também foi estabelecida correlação positiva com significado estatístico ( $P < 0,01$ ). O coeficiente de Pearson mais elevado foi obtido para o metabolito HMMA (Tabela 21).

**Tabela 21** - Correlação entre as concentrações urinárias de AVP e as concentrações urinárias da MDMA, MDA, HMA e HMMA para as fêmeas Wistar sacrificadas 24h após a administração da MDMA (20 mg/kg).

♀T24h	AVP (pg/mL)	MDMA (ng/mL)	MDA (ng/mL)	HMA (ng/mL)	HMMA (ng/mL)
1	137,77	141237,00	60590,26	10539,30	62092,34
2	128,31	316378,20	125569,10	21836,14	113701,90
3	203,95	304764,60	105909,50	18551,36	133655,40
4	26,26	45876,82	15941,66	1945,83	11763,83
5	51,05	55801,29	17257,21	2923,06	12555,45
6	61,53	70883,91	24471,61	3660,45	13117,69
n=6	<b>101,5 ± 27,29</b>	<b>155824±50820</b>	<b>58290±19511</b>	<b>9909±3505</b>	<b>57814±22406</b>
<b>(Média ± Erro Padrão)</b>					
Coefficiente de Pearson r		<b>0,86</b>	<b>0,84</b>	<b>0,85</b>	<b>0,92</b>
Valor de P vs AVP		<b>0,028 (*)</b>	<b>0,038 (*)</b>	<b>0,033 (*)</b>	<b>0,0083 (**)</b>
Intervalo de Confiança de 95%		<b>0,16 a 0,98</b>	<b>0,080 a 0,98</b>	<b>0,11 a 0,98</b>	<b>0,45 a 0,99</b>

(\*\*)  $P \leq 0,01$  vs AVP

(\*)  $P \leq 0,05$  vs AVP

## 5.4. Discussão

### 5.4.1. Efeito da MDMA na concentração plasmática da AVP (1h após a administração)

Com a execução deste trabalho foi possível verificar que a administração de MDMA a ratos desencadeia um aumento da secreção da AVP. Tal observação foi feita quer para animais machos, quer para animais fêmeas. Em ambos os géneros foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis plasmáticos de AVP nos animais controlo e nos animais administrados com MDMA (20 mg/kg). Tais diferenças foram detectadas uma hora após a administração da MDMA.

Estes resultados estão de acordo com as expectativas existentes em relação à acção da MDMA na secreção de AVP. Por um lado, havia já sido descrito na literatura aumentos dos níveis séricos da AVP em humanos do sexo masculino (Henry et al. 1998), por outro, estão também descritos na literatura ensaios *in vitro* em que se demonstrou a acção directa da MDMA e de alguns dos seus metabolitos sobre o hipotálamo isolado de rato desencadeando secreção de AVP (Forsling et al. 2002).

À semelhança dos resultados experimentais descritos na literatura, em que o aumento da AVP foi detectado em seres humanos do sexo masculino (Forsling et al. 2001), também neste trabalho foi detectado um aumento da secreção da AVP em ratos do sexo masculino. De facto, estas evidências experimentais demonstram que a secreção de AVP induzida pela MDMA é independente do género. No entanto, a modulação da secreção de AVP para a manutenção do equilíbrio hidro-electrolítico é influenciada pelas hormonas sexuais femininas e este facto pode contribuir para a maior incidência da hiponatrémia nas utilizadoras recreativas da ecstasy (Somponpun 2007).

Os fenómenos de hiponatrémia em mulheres poderão estar associados a diferenças de género na susceptibilidade à acção da AVP. Além disso, também existem comportamentos típicos dos utilizadores da MDMA que poderão facilitar a hiponatrémia, nomeadamente a ingestão exagerada de água e o exercício físico intenso. Estes comportamentos potenciam a hipertermia e a perda de sódio no suor (Verbalis et al. 2007).

No género feminino existe também o factor hormonal que, provavelmente, potencia as perdas de sódio e aumenta a ingestão de água. Por exemplo, durante a fase da

ovulação a temperatura corporal da mulher aumenta, podendo, na presença da MDMA, estar agravado o mecanismo de perda de sódio pelo suor e levar a uma ingestão excessiva de água.

Com este trabalho foi pela primeira vez demonstrado um aumento *in vivo* da secreção de AVP em animais de experiência sujeitos a tratamento com MDMA. O modelo experimental descrito poderá ser utilizado para compreender melhor a maior susceptibilidade à hiponatrémia do género feminino. A influência das hormonas femininas e a fase do ciclo reprodutivo na secreção da AVP e no controlo do equilíbrio hidro-electrolítico são apenas dois exemplos de estudos a fazer que permitirão compreender melhor a hiponatrémia desencadeada pela MDMA.

#### **5.4.2. Efeito da MDMA na concentração plasmática da AVP (24h após a administração)**

O efeito na secreção da AVP 24h após a administração da MDMA foi avaliado apenas em ratos fêmeas.

Neste estudo não foram detectadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de AVP entre os animais tratados e os controlos. De facto os estudos em humanos mostram que a elevação dos níveis plasmáticos da AVP após a administração da MDMA, atingem o seu máximo 1 a 2 horas após a administração (Henry et al. 1998). O resultado obtido neste ensaio está de acordo com estas observações pois, embora possam existir diferenças na secreção de AVP entre o rato e o humano, seria improvável detectar, no rato, o aumento da secreção da AVP induzida pela MDMA 24 horas após a administração.

A comparação entre as concentrações plasmáticas de AVP obtidas mostra que os animais tratados com MDMA apresentam uma tendência para terem concentrações plasmáticas de AVP inferiores 24 horas após a administração. Este fenómeno pode estar relacionado com os efeitos da MDMA, podendo ter ocorrido depleção das reservas de AVP e ou supressão da sua síntese.

Verificou-se também que os dois grupos de animais apresentavam concentrações plasmáticas de AVP tendencialmente mais elevadas do que o observado nos controlos do mesmo género sacrificados 1 hora após a administração. De facto, sabe-se que as

gaiolas metabólicas são um factor de stress para os animais, podendo ter sido esse o motivo para concentrações plasmáticas de AVP tendencialmente mais elevadas.

Neste trabalho foi também avaliado o efeito da MDMA na quantidade de AVP excretada na urina no final das 24 horas. A quantificação da AVP nas amostras de urina mostrou que os animais injectados com MDMA apresentam concentrações superiores de AVP do que os controlos. Este resultado mostra que embora não seja possível detectar aumentos plasmáticos de AVP 24 horas após o tratamento com MDMA, é possível detectar o aumento da excreção de AVP induzida pela MDMA.

#### **5.4.3. Efeito da MDMA na excreção de urina (24h após a administração)**

Os resultados deste estudo mostram que os animais tratados com MDMA excretam menos urina do que os controlos. Ao comparar a razão entre a água ingerida e a urina excretada, verifica-se que existe menor quantidade de urina excretada relativamente à água ingerida pelos ratos tratados com MDMA.

Estes resultados demonstram claramente uma acção antidiurética e esta acção provavelmente estará relacionada com os aumentos na secreção de AVP anteriormente detectados.

A retenção de água aqui detectada poderá ser a causa da hiponatrémia descrita nos humanos (Ajalo et al. 1998; Matthai et al. 1996; Maxwell et al. 1994). A acção da MDMA leva aos sintomas que caracterizam a SIADH. A acompanhar as alterações da secreção da AVP temos, tal como já foi referido, comportamentos que facilitam a hiponatrémia (Verbalis et al. 2007).

#### **5.4.4. Correlações entre as concentrações de AVP e as concentrações de MDMA, MDA, HMA e HMMA em fêmeas**

Com este trabalho foi feita a avaliação das correlações entre as concentrações plasmáticas de AVP e dos metabolitos em estudo uma hora depois da administração da MDMA a fêmeas. Ao contrário do que seria de esperar, não se obtiveram correlações estatisticamente significativas entre as concentrações de AVP e de MDMA ou de qualquer outro metabolito. De facto, em humanos, já havia sido descrito na literatura a

existência de correlações inversas entre a concentração de MDMA e a concentração de AVP. Nesse estudo, Forsling e colaboradores demonstraram que, uma hora após a administração da MDMA, quanto maiores eram as concentrações plasmáticas de AVP, menores eram as concentrações de MDMA detectadas no plasma (Forsling et al. 2001). Estes autores consideraram que, provavelmente, o efeito farmacológico da MDMA sobre a secreção da AVP poderia ter sido exercido por um metabolito. Esta suposição foi, em certa medida, apoiada através de ensaios em hipotálamo isolado de rato onde se verificou a capacidade dos metabolitos MDA, HMMA, HMA, HHMA e HHA para desencadear a libertação de AVP (Forsling et al. 2002).

No que diz respeito aos resultados que estabelecem correlações entre a concentração de AVP e as concentrações de MDMA no plasma em humanos, estes não estão em concordância com os resultados obtidos para os ratos. No entanto, é importante considerar as diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre as duas espécies. Para esclarecer melhor a influência dos metabolitos na secreção da AVP *in vivo*, deveriam ser realizadas experiências com tempos de sacrifício anteriores e posteriores a 1 hora. Dessa forma, seria possível perceber qual o momento em que, nos animais, se atinge a concentração máxima de AVP e quantificar nesse momento as concentrações de MDMA, MDA, HMA e HMMA por forma a estabelecer novas correlações.

Por outro lado, na avaliação das correlações entre as concentrações urinárias de AVP e da MDMA, MDA, HMA e HMMA, foram observadas correlações estatisticamente significativas. Estas correlações mostraram que para concentrações superiores de AVP ocorrem também concentrações superiores de MDMA, MDA e HMA ( $P < 0.05$ ). Para o metabolito HMMA foi estabelecida uma correlação positiva mais forte ( $P < 0.01$ ), mostrando que maiores concentrações urinárias deste metabolito são acompanhadas com maiores aumentos das concentrações de AVP. Este resultado foi de encontro ao esperado, pois o metabolito HMMA foi identificado como sendo o que tem maior capacidade para induzir a secreção de AVP em hipotálamo isolado de rato (Forsling et al. 2002). Além disso, dos coeficientes de Pearson obtidos para cada metabolito o coeficiente mais elevado foi o correspondente ao metabolito HMMA, mostrando que, comparativamente à MDMA, MDA e HMA, este metabolito é o que mais facilmente consegue elevar as concentrações de AVP.

A obtenção de correlação positiva para a MDMA não foi de acordo com o esperado pois na literatura foi identificada correlação negativa entre as concentrações plasmáticas da MDMA e os níveis de AVP (Forsling et al. 2001). A explicação para esta

discordância poderá estar relacionada com o facto das concentrações urinárias da MDMA ao final de 24 horas não reflectirem as concentrações plasmáticas no momento em que ocorrem as variações na secreção de AVP após a administração da MDMA.



# Capítulo VI

## Conclusões Gerais



## 6. CAPÍTULO VI – Conclusões Gerais

Os estudos realizados no âmbito da presente dissertação de mestrado permitiram tirar as seguintes conclusões:

Validação do método de GC-MS/MS.

- É possível quantificar em simultâneo a MDMA, MDA, HMA e HMMA por GC-MS/MS recorrendo a um só padrão interno, numa ampla gama de linearidade e com baixos limites de quantificação e detecção.

Ensaio *in vivo*.

- A administração de MDMA (20 mg/kg) a ratos desencadeia o aumento da secreção da AVP em animais machos e fêmeas.
- O aumento da concentração plasmática da AVP em ratos fêmeas não é detectado 24 horas após a administração. No entanto o aumento de AVP detectado na urina confirma a acção da MDMA sobre a secreção dessa hormona.
- A administração de MDMA (20 mg/kg) a ratos fêmea desencadeia o aumento da concentração urinária de AVP na urina recolhida durante 24 horas a partir do momento da administração.
- A administração de MDMA (20 mg/kg) a ratos fêmea desencadeia menor excreção de urina com a consequente retenção de água, este efeito antidiurético da MDMA está de acordo com o aumento da AVP induzido pela droga.
- As concentrações urinárias de AVP têm correlação positiva com as concentrações urinárias de MDMA, MDA, HMA e HMMA. A correlação mais significativa foi estabelecida com o metabolito HMMA.
- A secreção de AVP induzida pela MDMA está relacionada com o respectivo metabolismo.

- Os efeitos da MDMA e dos seus metabolitos MDA, HMA e HMMA sobre a secreção da AVP contribuem para o efeito hiponatrémico.

# Capítulo VII

## Bibliografía



## 7. CAPÍTULO VII – Bibliografía

- Adroge, H. J. & N. E. Madias: Hyponatremia. *N Engl J Med* 2000, **342**, 1581-9.
- Ajaelo, I., K. Koenig & E. Snoey: Severe hyponatremia and inappropriate antidiuretic hormone secretion following ecstasy use. *Acad Emerg Med* 1998, **5**, 839-840.
- Andreu, V., A. Mas, M. Bruguera, J. M. Salmeron, V. Moreno, S. Nogue & J. Rodes: Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. *J Hepatol* 1998, **29**, 394-397.
- Arundine, M. & M. Tymianski: Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003, **34**, 325-337.
- Badon, L. A., A. Hicks, K. Lord, B. A. Ogden, S. Meleg-Smith & K. J. Varner: Changes in cardiovascular responsiveness and cardiotoxicity elicited during binge administration of Ecstasy. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **302**, 898-907.
- Bai, F., S. S. Lau & T. J. Monks: Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of alpha-methyldopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 1999, **12**, 1150-1157.
- Bateman, A., A. Singh, T. Kral & S. Solomon: The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev* 1989, **10**, 92-112.
- Bertilsson, L., M.-L. Dahl, P. Dalén & A. Al-Shurbaji: Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2002, **53**, 111-122.
- Bindoli, A., M. P. Rigobello & D. J. Deeb: Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med* 1992, **13**, 391-405.
- Bindoli, A., M. P. Rigobello & L. Galzigna: Toxicity of aminochromes. *Toxicol Lett* 1989, **48**, 3-20.
- Bingham, C., M. Beaman, A. J. Nicholls & P. P. Anthony: Necrotizing renal vasculopathy resulting in chronic renal failure after ingestion of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Nephrol Dial Transplant* 1998, **13**, 2654-2655.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst & T. J. Monks: Role of quinones in toxicology. *American Chemical Society* 2000, **13**, 136-159.
- Burns, N., H. J. Olverman, P. A. Kelly & B. C. Williams: Effects of ecstasy on aldosterone secretion in the rat in vivo and in vitro. *Endocr Res* 1996, **22**, 601-606.
- Burrows, K. B., G. Gudelsky & B. K. Yamamoto: Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration. *European Journal of Pharmacology* 2000, **398**, 11-18.
- Bushfield, M., A. McNicol & D. E. MacIntyre: Possible mechanisms of the potentiation of blood-platelet activation by adrenaline. *Biochem J* 1987, **3**, 671-676.
- Cadeta, J. L. & C. Brannock: Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry International* 1998, 117-131.
- Capela, J. P., C. Macedo, P. S. Branco, L. M. Ferreira, A. M. Lobo, E. Fernandes, F. Remião, M. L. Bastos, U. Dirnagl, A. Meisel & F. Carvalho: Neurotoxicity

- mechanisms of thioether ecstasy metabolites. *Neuroscience* 2007, **146**, 1743-1757.
- Capela, J. P., A. Meisel, A. R. Abreu, P. S. Branco, L. M. Ferreira, A. M. Lobo, F. Remião, M. L. Bastos & F. Carvalho: Neurotoxicity of Ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **316**, 53-61.
- Carmo, H.: Estudo da Influência do Metabolismo na Toxicidade de Derivados Anfetamínicos: 4-MTA, 2C-B e MDMA (tese de doutoramento). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto. 2007.
- Carvalho, F., J. A. Duarte, M. J. Neuparth, H. Carmo, E. Fernandes, F. Remiao & M. L. Bastos: Hydrogen peroxide production in mouse tissues after acute d-amphetamine administration. Influence of monoamine oxidase inhibition. *Arch Toxicol* 2001a, **75**, 465-9.
- Carvalho, F., F. Remiao, M. E. Soares, R. Catarino, G. Queiroz & M. L. Bastos: d-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 1997, **71**, 429-436.
- Carvalho, M., F. Carvalho & M. L. Bastos: Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. *Arch Toxicol* 2001b, **74**, 789-793.
- Carvalho, M., F. Carvalho, F. Remiao, M. d. L. Pereira, R. Pires-das-Neves & M. d. L. Bastos: Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch Toxicol* 2002a, **76**, 166-172.
- Carvalho, M., G. Hawksworth, N. Milhazes, F. Borges, T. J. Monks, E. Fernandes, F. Carvalho & M. L. Bastos: Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol* 2002b, **76**, 581-588.
- Carvalho, M., N. Milhazes, F. Remiao, F. Borges, E. Fernandes, F. Amado, T. J. Monks, F. Carvalho & M. L. Bastos: Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch Toxicol* 2004a, **78**, 16-24.
- Carvalho, M., F. Remiao, N. Milhazes, F. Borges, E. Fernandes, F. Carvalho & M. L. Bastos: The toxicity of N-methyl-alpha-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. *Toxicology* 2004b, **200**, 193-203.
- Carvalho, M., F. Remiao, N. Milhazes, F. Borges, E. Fernandes, M. d. C. Monteiro, M. J. Goncalves, V. Seabra, F. Amado, F. Carvalho & M. L. Bastos: Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chem Res Toxicol* 2004c, **17**, 623-622.
- Chavdarian, C. G., D. Karashima, N. Castagnoli & H. K. Hundley: Oxidative and cardiovascular studies on natural and synthetic catecholamines. *J Med Chem* 1978, **21**, 548-554.
- Che, S., M. Johnson, G. R. Hanson & J. W. Gibb: Body temperature effect on methylenedioxymethamphetamine-induced acute decrease in tryptophan hydroxylase activity. *Eur J Pharmacol* 1995, **293**, 447-453.

- Claybaugh, J. R., A. K. Sato, L. K. Crosswhite & L. H. Hassell: Effects of time of day, gender, and menstrual cycle phase on the human response to a water load. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, **279**, R966-973.
- Colado, M. I. & A. R. Green: The spin trap reagent  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *European Journal of Pharmacology* 1995, 343-346.
- Colado, M. I., T. K. Murray & A. R. Green: 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br J Pharmacol* 1993, **108**, 583-589.
- Colado, M. I., E. O'Shea, R. Granados, B. Esteban, A. B. Martin & A. R. Green: Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') administration. *Br J Pharmacol* 1999, **126**, 911-924.
- Colado, M. I., E. O'Shea, R. Granados, T. K. Murray & A. R. Green: In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *British Journal of Pharmacology* 1997, 889-900.
- Colado, M. I., E. O'Shea & A. R. Green: Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacology (Berl)* 2004, **173**, 249-263.
- Cole, J. C. & H. R. Sumnall: Altered states: the clinical effects of Ecstasy. *Pharmacol Ther* 2003, **98**, 35-58.
- Connor, T. J.: Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'): a stressor on the immune system. *Immunology* 2004, **111**, 357-367.
- Connor, T. J. & J. P. Kelly: Fenfluramine-induced immunosuppression: an in vivo analysis. *Eur J Pharmacol* 2002, **455**, 175-185.
- Connor, T. J., J. P. Kelly & B. E. Leonard: An assessment of the acute effects of the serotonin releasers methylenedioxymethamphetamine, methylenedioxyamphetamine and fenfluramine on immunity in rats. *Immunopharmacology* 2000, **46**, 223.
- Connor, T. J., M. G. McNamara, D. Finn, A. Currid, M. O'Malley, A. M. Redmond, J. P. Kelly & B. E. Leonard: Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA) administration produces a rapid and sustained suppression of immune function in the rat. *Immunopharmacology* 1998, **38**, 253-260.
- Connor, T. J., D. O'Shaughnessy & J. P. Kelly: Methylenedioxymethamphetamine ('MDMA; Ecstasy') suppresses zymozan-induced oxidative burst in neutrophils. *Ir J Med Sci* 2004.
- Crespi, D., T. Mennini & M. Gobbi: Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *Br J Pharmacol* 1997, **121**, 1735-1743.
- Cunningham, M.: Ecstasy-induced rhabdomyolysis and its role in the development of acute renal failure. *Intensive Crit Care Nurs* 1997, **13**, 216-223.
- Dafters, R. I. & E. Lynch: Persistent loss of thermoregulation in the rat induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') but not fenfluramine. *Psychopharmacology* 1998, **138**, 207-212.

- Dar, K. J. & M. E. McBrien: MDMA induced hyperthermia: report of a fatality and review of current therapy. *Intensive Care Med* 1996, **22**, 995-996.
- Darvesh, A. S. & G. A. Gudelsky: Evidence for a role of energy dysregulation in the MDMA-induced depletion of brain 5-HT. *Brain Research* 2005, **1056**, 168-175.
- de la Torre, R., M. Farré, M. Navarro, R. Pacifici, P. Zuccaro & S. Pichini: Clinical Pharmacokinetics of Amfetamine and Related Substances. *Clin Pharmacokinet* 2004a, **43**, 157-185.
- de la Torre, R., M. Farré, J. Ortuño, M. Mas, R. Brenneisen, P. N. Roset, J. Segura & J. Camí: Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2000, 104-109.
- de la Torre, R., M. Farré, P. N. Roset, N. Pizarro, S. Abanades, M. Segura, J. Segura & J. Camí: Human Pharmacology of MDMA Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition. *Ther Drug Monit* 2004b, **26**, 137-144.
- Diringer, M. N.: Management of sodium abnormalities in patients with CNS disease. *Clin Neuropharmacol* 1992, **15**, 427-47.
- Easton, N., J. Fry, E. O'Shea, A. Watkins, S. Kingston & C. A. Marsden: Synthesis, in vitro formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy) *Brain Res* 2003, **987**, 144-154.
- Elenkov, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos & E. S. Vizi: The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000, **52**, 595-638.
- Ellis, A. J., J. A. Wendon, B. Portmann & R. Williams: Acute liver damage and ecstasy ingestion. *Gut* 1996, **38**, 454-458.
- Fahal, I., D. F. Sallomi, M. Yaqoob & G. M. Bell: Acute renal failure after ecstasy. *BMJ* 1992, **305**, 29.
- Fallon, J. K., A. T. Kicman, J. A. Henry, P. J. Milligan, D. A. Cowan & A. J. Hutt: Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) in humans. *Clin Chem* 1999, **45**, 1058-1069.
- Fallon, J. K., D. Shah, A. T. Kicman, A. J. Hutt, J. A. Henry, D. A. Cowan & M. Forsling: Action of MDMA (ecstasy) and its metabolites on arginine vasopressin release. *Ann N Y Acad Sci* 2002, **965**.
- Faraj, B. A., Z. L. Olkowski & R. T. Jackson: Active [3H]-dopamine uptake by human lymphocytes: correlates with serotonin transporter activity. *Pharmacology* 1994, **48**, 320-327.
- Farfel, G. M., G. L. Vosmer & L. S. Seiden: The N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801 protects against serotonin depletions induced by methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine. *Brain Res* 1992, **595**, 121-127.
- Farré, M., R. de la Torre, B. Ó. Mathúna, P. N. Roset, A. M. Peiró, M. Torrens, J. Ortuño, M. Pujadas & J. Camí: Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology* 2004, 364-375.
- Fidler, H., A. Dhillon, D. Gertner & A. Burroughs: Chronic ecstasy (3,4-methylenedioxymetamphetamine) abuse: a recurrent and unpredictable cause of severe acute hepatitis. *J Hepatol* 1996, **25**, 563-566.
- Filep, J. & B. Rosenkranz: Mechanism of vasopressin-induced platelet aggregation. *Thromb Res.* 1987, **45**, 7-15.

- Fischer, C., G. Hatzidimitriou, J. WIOS, J. Katz & G. A. Ricaurte: Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *The Journal of Neuroscience* 1995, **15**, 5478-5485.
- Fitzgerald, J. L. & J. J. Reid: Effects of methylenedioxymethamphetamine on the release of monoamines from rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 1990, **191**, 217-20.
- Fitzgerald, J. L. & J. J. Reid: Sympathomimetic actions of methylenedioxymethamphetamine in rat and rabbit isolated cardiovascular tissues. *J Pharm Pharmacol* 1994, **46**, 826-832.
- Forsling, M., J. K. Fallon, A. T. Kicman, A. J. Hutt, D. A. Cowan & J. A. Henry: Arginine vasopressin release in response to the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"): is metabolism a contributory factor? *J Pharm Pharmacol* 2001, **53**, 1357-1363.
- Forsling, M. L., J. K. Fallon, D. Shah, G. S. Tilbrook, D. A. Cowan, A. T. Kicman & A. J. Hutt: The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus. *British Journal of Pharmacology* 2002, **135**, 649-656.
- Forsling, M. L., H. Montgomery, D. Halpin, R. J. Windle & D. F. Treacher: Daily patterns of secretion of neurohypophysial hormones in man: effect of age. *Exp Physiol* 1998, **83**, 409-418.
- Forsling, M. L., Y. Zhou & R. J. Windle: The natriuretic actions of vasopressin in the female rat: variations during the 4 days of the oestrous cycle. *J Endocrinol* 1996, **148**, 457-464.
- Freudenmann, R. W., F. Öxler & S. Bernschneider-Reif: The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents\*. *Addiction* 2006, **101**, 1241-1245.
- Gillman, P. K.: Serotonin syndrome: history and risk. *Fundam Clin Pharmacol* 1998, **12**, 482-491.
- Gillman, P. K.: The serotonin syndrome and its treatment. *J Psychopharmacol* 1999, **13**, 100-109.
- Glennon, R. A.: Arylalkylamine Drugs of Abuse: An Overview of Drug Discrimination Studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1999, **64**, 251-256.
- Goodman, L. S., A. Gilman, L. L. Brunton, J. S. Lazo & K. L. Parker: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York, 2006.
- Gordon, C. J., W. P. Watkinson, J. P. O'Callaghan & D. B. Miller: Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1991, **38**, 339-344.
- Gordon, J. & N. M. Barnes: Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? *Trends Immunol* 2003, **24**, 438-443.
- Gouzoulis-Mayfrank, E., J. Daumann, F. Tuchtenhagen, S. Pelz, S. Becker, H. J. Kunert, B. Fimm & H. Sass: Impaired cognitive performance in drug free users of recreational ecstasy (MDMA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000, **6**, 719-725.
- Graham, D. G.: Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 1978, **14**, 633-643.
- Grahame-Smith, D. G.: Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. *J Neurochem* 1971, **18**, 1053-1066.

- Green, A. R., A. O. Mehan, J. M. Elliott, E. O'Shea & M. I. Colado: The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacol Rev* 2003, 463–508.
- Greer, G. & R. Tolbert: Subjective reports of the effects of MDMA in a clinical setting. *J Psychoactive Drugs* 1986, **18**, 319-27.
- Gudelsky, G. A.: Effect of ascorbate and cysteine on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of brain serotonin. *J Neural Transm* 1996, **103**, 1397-1404.
- Gudelsky, G. A. & J. F. Nash: Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin–dopamine interactions. *J. Neurochem* 1996, **66**, 243-249.
- Han, D. D. & H. H. Gu: Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol* 2006, 1-6.
- Hatzidimitriou, G., U. D. McCann & G. A. Ricaurte: Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery. *The Journal of Neuroscience* 1999, **19**, 5096-5107.
- Hegadoren, K. M., G. B. Baker & M. Bourin: 3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans. *Neurosci Biobehav Rev* 1999, **23**, 539-553.
- Henry, J. A., J. K. Fallon, A. T. Kicman, A. J. Hutt, D. A. Cowan & M. Forsling: Low-dose MDMA ('ecstasy') induces vasopressin secretion. *Lancet* 1998, **351**, 1784.
- Henry, J. A. & I. R. Hill: Fatal interaction between ritonavir and MDMA. *The Lancet* 1998, **352**, 1751-1752.
- Henry, J. A., K. J. Jeffreys & S. Dawling: Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). *Lancet* 1992, **340**, 384-387.
- Hesse, L. M., L. L. V. Moltke, R. I. Shader & D. J. Grennblatt: Ritonavir, Efavirenz, and Nelfinavir Inhibit CYP2B6 Activity in Vitro: Potential Drug Interactions with Bupropion. *Drug Metabolism And Disposition* 2001, **29**, 100-102.
- Hiramatsu, M., Y. Kumagai, S. E. Unger & A. K. Cho: Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, **254**, 521-527.
- Holden, R. & M. A. Jackson: Near-fatal hyponatraemic coma due to vasopressin over-secretion after "ecstasy" (3,4-MDMA). *Lancet* 1996, **347**, 1052.
- House, R. V., P. T. Thomas & H. N. Bhargava: Selective modulation of immune function resulting from in vitro exposure to methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *Toxicology* 1995, **96**, 59-69.
- James, R. C., S. M. Roberts & R. D. Harbison: The perturbation of hepatic glutathione by alpha 2-adrenergic agonists. *Fundam Appl Toxicol* 1983, **3**, 303-8.
- Johnson, M., G. R. Hanson & J. W. Gibb: Effect of MK-801 on the decrease in tryptophan hydroxylase induced by methamphetamine and its methylenedioxy analog. *Eur J Pharmacol* 1989, **165**, 315-318.
- Jørgensen, H., A. Kjær, U. Knigge, M. Møller & J. Warberg: Serotonin Stimulates Hypothalamic mRNA Expression and Local Release of Neurohypophysial Peptides. *Journal of Neuroendocrinology* 2003a, **15**, 564-571.

- Jørgensen, H., M. Riis, U. Knigge, A. Kjær & J. Warberg: Serotonin Receptors Involved in Vasopressin and Oxytocin Secretion. *Journal of Neuroendocrinology* 2003b, **15**, 242-249.
- Kalant, H.: The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ* 2001, **165**, 917-928.
- Karlsen, S. N., O. Spigset & L. Slørdal: The Dark Side of Ecstasy: Neuropsychiatric Symptoms after Exposure to 3,4-Methylenedioxymethamphetamine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007, **Epub ahead of print**.
- Kim, J. Y., K. S. Jung, M. K. Kim, J. I. Lee & M. K. In: Simultaneous determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007, **21**, 1705-20.
- Kiyatkin, E. A.: Brain hyperthermia as physiological and pathological phenomena. *Brain Research Reviews* 2005, **50**, 27-56.
- Koch, S. & M. P. Galloway: MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. *J Neural Transm* 1997, **104**, 135-146.
- Kolbrich, E. A., R. H. Lowe & M. A. Huestis: Two-dimensional gas chromatography/electron-impact mass spectrometry with cryofocusing for simultaneous quantification of MDMA, MDA, HMMA, HMA, and MDEA in human plasma. *Clin Chem* 2008, **54**, 379-87.
- Kramer, H. K., J. C. Poblete & E. C. Azmitia: Characterization of the translocation of protein kinase C (PKC) by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA/ecstasy) in synaptosomes: evidence for a presynaptic localization involving the serotonin transporter (SERT). *Neuropsychopharmacology* 1998, **16**, 265-277.
- Lane, R. & M. Phillips: Rhabdomyolysis. Has many causes, including statins, and may be fatal. *BMJ* 2003, **327**, 115-116.
- Leonardi, E. T. & E. C. Azmitia: MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 1994, **10**, 231-238.
- Liechti, M. E. & F. X. Vollenweider: The serotonin uptake inhibitor citalopram reduces acute cardiovascular and vegetative effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') in healthy volunteers. *J Psychopharmacol* 2000, **14**, 269-274.
- Liechti, M. E. & F. X. Vollenweider: Which neuroreceptors mediate the subjective effects of MDMA in humans? A summary of mechanistic studies. *Hum Psychopharmacol* 2001, **16**, 589-598.
- Lim, H. K. & R. L. Foltz: In vivo formation of aromatic hydroxylated metabolites of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification by ion trap tandem mass spectrometric (MS/MS and MS/MS/MS) techniques *Biol Mass Spectrom* 1991, **20**, 677-686.
- Lin, L. Y., E. W. D. Stefano, D. A. Schmitz, L. Hsu, S. W. Ellis, M. S. Lennard, G. T. Tucker & A. K. Cho: Oxidation of Methamphetamine and Methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION* 1997, **25**, 1059-1064.
- Losser, M. R. & D. Payen: Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis* 1996, **16**, 357-367.
- Lyles, J. & J. L. Cadet: Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Research Reviews* 2003, **42**, 155-168.

- Malberg, J. E., K. E. Sabol & L. S. Seiden: Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, **278**, 258-267.
- Malberg, J. E. & L. S. Seiden: Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci* 1998, **18**, 5086-5094.
- Männistö, P. T. & S. Kaakkola: Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS* 1999, **51**, 593-628.
- Matthai, S. M., D. C. Davidson, J. A. Sills & D. Alexandrou: Cerebral oedema after ingestion of MDMA ('ecstasy') and unrestricted intake of water. *BMJ* 1996, **312**, 1359.
- Maurer, H. H., J. Bickeboeller-Friedrich, T. Kraemer & F. T. Peters: Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'). *Toxicology Letters* 2000, **112-113**, 133-142.
- Maxwell, D. L., M. I. Polkey & J. A. Henry: Hyponatraemia and catatonic stupor after taking "ecstasy". *BMJ* 1994, **308**, 414.
- McCann, U. D., V. Eligulashvili & G. A. Ricaurte: (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies. *Neuropsychobiology* 2000, **42**, 11-16.
- McCann, U. D., A. Ridenour, Y. Shaham & G. A. Ricaurte: Serotonin neurotoxicity after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "Ecstasy"): a controlled study in humans. *Neuropsychopharmacology* 1994, **10**, 129-138.
- McCann, U. D., Z. Szabo, U. Scheffel, R. F. Dannals & G. A. Ricaurte: Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *The Lancet* 1998, **352**, 1433-1437.
- Mechan, A. O., B. Esteban, E. O'Shea, J. M. Elliott, M. I. Colado & A. R. Green: The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. *Br J Pharmacol* 2002, **135**, 170-180.
- Mills, E. M., M. L. Banks, J. E. Sprague & T. Finkel: Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. *Nature* 2003, **426**, 403-404.
- Milroy, C. M., J. C. Clark & A. R. Forrest: Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *J Clin Pathol* 1996, **49**, 149-153.
- Moltke, L. L. v., A. L. B. Durol, S. X. Duan & D. J. Greenblatt: Potent mechanism-based inhibition of human CYP3A in vitro by amprenavir and ritonavir: comparison with ketoconazole. *Eur J Clin Pharmacol* 2000, **56**, 259-261.
- Moltke, L. L. V., D. J. Greenblatt, S. X. Duan, J. P. Daily, J. S. Harmatz & R. I. Shader: Inhibition of Desipramine Hydroxylation (Cytochrome P450-2D6) in Vitro by Quinidine and by Viral Protease Inhibitors: Relation to Drug Interactions in Vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998, **87**, 1184-1189.
- Montiel-Duarte, C., E. Ansorena, M. J. Lopez-Zabalza, E. Cenarruzabeitia & M. J. Iraburu: Role of reactive oxygen species, glutathione and NF-kappaB in apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") on hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2004, **67**, 1025-1033.
- Montiel-Duarte, C., M. Varela-Rey, J. A. Osés-Prieto, M. J. Lopez-Zabalza, G. Beitia, E. Cenarruzabeitia & M. J. Iraburu: 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 2002, **1588**, 26-32.

- Morgan, M. J.: Recreational use of "ecstasy" (MDMA) is associated with elevated impulsivity. *Neuropsychopharmacology* 1998, **19**, 252-264.
- Morgan, M. J.: Memory deficits associated with recreational use of "ecstasy" (MDMA). *Psychopharmacology* 1999, **141**, 30-36.
- Morton, J.: Ecstasy: pharmacology and neurotoxicity. *Current Opinion in Pharmacology* 2005, 79-86.
- Mossner, R. & K. P. Lesch: Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun* 1998, **12**, 249-271.
- Moyano, S., D. Frechilla & J. D. Rio: NMDA receptor subunit and CaMKII changes in rat hippocampus induced by acute MDMA treatment: a mechanism for learning impairment. *Psychopharmacology* 2004, **173**, 337-345.
- Nakagawa, Y. & P. Moldeus: Cytotoxic effects of phenyl-hydroquinone and some hydroquinones on isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1992, **44**, 1059-1065.
- Nash, J. F.: Ketanserin pretreatment attenuates MDMA-induced dopamine release in the striatum as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci* 1990, **47**, 2401-2408.
- Nash, J. F. & J. Brodtkin: Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1991, **259**, 820-825.
- Nash, J. J. F., H. Y. Meltzer & G. A. Gudelsky: Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1988, **245**, 873-879.
- Nathan, B. R.: Cerebral correlates of hyponatremia. *Neurocrit Care* 2007, **6**, 72-8.
- Nichols, D. E.: Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs* 1986, **18**, 305-313.
- Nichols, D. E. & R. Oberlender: Structure-activity relationships of MDMA-like substances. *NIDA Res Monogr* 1989, 1-29.
- Nichols, D. E. & R. Oberlender: Structure-activity relationships of MDMA and related compounds: a new class of psychoactive drugs? *Ann N Y Acad Sci* 1990, **600**, 612-623.
- Nixdorf, W. L., K. B. Burrows, G. A. Gudelsky & B. K. Yamamoto: Enhancement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity by the energy inhibitor malonate. *Journal of Neurochemistry* 2001, 647-654.
- O'Cain, P. A., S. B. Hletko, B. A. Ogden & K. J. Varner: Cardiovascular and sympathetic responses and reflex changes elicited by MDMA. *Physiol Behav* 2000, **70**, 141-148.
- Obrocki, J., R. Buchert, O. Vaterlein, R. Thomasius, W. Beyer & T. Schiemann: Ecstasy--long-term effects on the human central nervous system revealed by positron emission tomography. *Br J Psychiatry* 1999, **175**, 186-188.
- Oesterheld, J. R., S. C. Armstrong & K. L. Cozza: Ecstasy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Interactions. *Psychosomatics* 2004, 84-87.
- Ortuño, J., N. Pizarro, M. Farre, M. Mas, J. Segura, J. Cami, R. Brenneisen & R. de la Torre: Quantification of 3,4-methylenedioxymetamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 1999, **723**, 221-232.
- Pacifici, R., S. Pichini, P. Zuccaro, M. Farre, M. Segura, J. Ortuño, S. D. Carlo, A. Bacosi, P. N. Roset, J. Segura & R. de la Torre: Paroxetine inhibits acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on the immune system in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **309**, 285-292.

- Parr, M. J., H. M. Low & P. Botterill: Hyponatraemia and death after 'ecstasy' ingestion. *Med J Aust* 1997, **166**, 136-137.
- Parrott, A. C.: Human research on MDMA (3,4-methylene- dioxymethamphetamine) neurotoxicity: cognitive and behavioural indices of change. *Neuropsychobiology* 2000, **42**, 17-24.
- Parrott, A. C.: Human psychopharmacology of Ecstasy (MDMA): a review of 15 years of empirical research. *Hum Psychopharmacol* 2001, **16**, 557-577.
- Parrott, A. C.: Recreational Ecstasy/MDMA, the serotonin syndrome, and serotonergic neurotoxicity *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2002, **71**, 837-844.
- Parrott, A. C.: Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. *Psychopharmacology* 2004, **173**, 234-241.
- Parrott, A. C., T. Buchanan, A. B. Scholey, T. Heffernan, J. Ling & J. Rodgers: Ecstasy/MDMA attributed problems reported by novice, moderate and heavy recreational users. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2002, **17**, 309-312.
- Parrott, A. C. & J. Lasky: Ecstasy (MDMA) effects upon mood and cognition: before, during and after a Saturday night dance. *Psychopharmacology* 1998, **139**, 261-268.
- Parrott, A. C., A. Lees, N. J. Garnham, M. Jones & K. Wesnes: Cognitive performance in recreational users of MDMA of 'ecstasy': evidence for memory deficits. *J Psychopharmacol* 1998, **12**, 79-83.
- Parrott, A. C., R. M., R. Parmar & J. D. Turner: Recreational ecstasy/MDMA and other drug users from the UK and Italy: psychiatric symptoms and psychobiological problems. *Psychopharmacology* 2001, **159**, 77-82.
- Parrott, A. C., E. Sisk & J. J. Turner: Psychobiological problems in heavy 'ecstasy' (MDMA) polydrug users. *Drug Alcohol Depend* 2000, **60**, 105-110.
- Pedersen, N. P. & W. W. Blessing: Cutaneous vasoconstriction contributes to hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in conscious rabbits. *J Neurosci* 2001, **21**, 8648-8654.
- Pifl, C., G. Nagy, S. Berényi, A. Kattinger, H. Reither & S. Antus: Pharmacological Characterization of Ecstasy Synthesis Byproducts with Recombinant Human Monoamine Transporters. *JPET* 2005, **314**, 346-354.
- Pirnay, S. O., T. T. Abraham & M. A. Huestis: Sensitive gas chromatography-mass spectrometry method for simultaneous measurement of MDEA, MDMA, and metabolites HMA, MDA, and HMMA in human urine. *Clin Chem* 2006, **52**, 1728-1734.
- Pizarro, N., M. Farre, M. Pujadas, A. M. Peiro, P. N. Roset, J. Joglar & R. d. l. Torre: Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihydroxymethamphetamine). *Drug Metab Dispos* 2004, **32**, 1001-1007.
- Pizarro, N., J. Ortuño, M. Farre, C. Hernandez-Lopez, M. Pujadas, A. Llebaria, J. Joglar, P. N. Roset, M. Mas, J. Segura, J. Cami & R. de la Torre: Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J Anal Toxicol* 2002, **26**, 157-165.
- Quinton, M. S. & B. K. Yamamoto: Causes and Consequences of Methamphetamine and MDMA Toxicity. *The AAPS Journal* 2006 2006, **8**, 337-347.
- Rai, A., A. Whaley-Connell, S. McFarlane & J. R. Sowers: Hyponatremia, Arginine Vasopressin Dysregulation, and Vasopressin Receptor Antagonism. *Am J Nephrol* 2006, **26**, 579-589.

- Ratray, M.: Ecstasy: towards an understanding of the biochemical basis of the actions of MDMA. *Essays Biochem* 1991, **26**, 77-87.
- Remiao, F., H. Carmo, F. D. Carvalho & M. L. Bastos: Inhibition of Glutathione Reductase by Isoproterenol Oxidation Products. *J Enzyme Inhib* 1999, **15**, 47-61.
- Remiao, F., M. Carvalho, H. Carmo, F. Carvalho & M. L. Bastos: Cu<sup>2+</sup>-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol* 2002, **15**, 861-869.
- Reneman, L., J. Booij, B. Schmand, W. v. d. Brink & B. Gunning: Memory disturbances in "Ecstasy" users are correlated with an altered brain serotonin neurotransmission. *Psychopharmacology* 2000, **148**, 322-324.
- Reneman, L., E. Endert, K. d. Bruin, J. Lavalaye, M. G. Feenstra, F. A. d. Wolff & J. Booij: The acute and chronic effects of MDMA ("ecstasy") on cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology* 2002, **26**, 387-396.
- Ricaurte, G. A.: Studies of MDMA-induced neurotoxicity in neurononhuman primates: a basis for evaluating long-term effects in methylenedioxyamphetamines. *NIDA Res. Monogr.* 1989, **94**, 306-322.
- Ricaurte, G. A., L. E. DeLanney, I. Irwin & J. W. Langston: Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration. *Brain Research* 1988a, **446**, 165-168.
- Ricaurte, G. A., K. T. Finnegan, I. Irwin & J. W. Langston: Aminergic metabolites in cerebrospinal fluid of humans previously exposed to MDMA: preliminary observations. *Ann. NY Acad. Sci.* 1990, **600**, 699-708.
- Ricaurte, G. A. & U. D. McCann: Neurotoxic amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. *Ann NY Acad Sci* 1992, **648**, 371-382.
- Ricaurte, G. A., L. S.Forno, M. A. Wilson, L. E. DeLanney, I. Irwin, M. E. Molliver & J. W. Langston: (±)3,4-Methylenedioxyamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *Journal of the American Medical Association* 1988b, **260**, 51-55.
- Rothman, R. B. & M. H. Baumann: Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 2003, 23-40.
- Rudnick, G. & S. C. Wall: The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA)]: Serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Biochemistry* 1992, **89**, 1817-1821.
- Rusyniak, D. E., S. L. Tandy, S. K. Hekmatyar, E. Mills, D. J. Smith, N. Bansal, D. MacLellan, M. E. Harper & J. E. Sprague: The role of mitochondrial uncoupling in 3,4-methylenedioxyamphetamine-mediated skeletal muscle hyperthermia and rhabdomyolysis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, **313**, 629-639.
- Sabol, K. E. & L. S. Seiden: Reserpine attenuates D-amphetamine and MDMA-induced transmitter release in vivo: a consideration of dose, core temperature and dopamine synthesis. *Brain Res* 1998, **806**, 69-78.
- Santos-Marques, M. J., F. Carvalho, C. Sousa, F. Remiao, R. Vitorino, F. Amado, R. Ferreira, J. A. Duarte & M. Bastos: Cytotoxicity and cell signalling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes. *Toxicology* 2006, **224**, 210.
- Sattler, R. & M. Tymianski: Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 2000, **78**, 3-13.
- Schifano, F.: Potential human neurotoxicity of MDMA ('Ecstasy'): subjective self-reports, evidence from an Italian drug addiction centre and clinical case studies. *Neuropsychobiology* 2000, **42**, 25-33.

- Schifano, F.: A bitter pill. Overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities. *Psychopharmacology* 2004, 242-248.
- Schifano, F., L. D. Furia, G. Forza, N. Minicuci & R. Bricolo: MDMA ('ecstasy') consumption in the context of polydrug abuse: a report on 150 patients. *Drug Alcohol Depend.* 1998 Sep 1;52(1):85-90. 1998, **52**, 85-90.
- Schmidt, C. J.: Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987, **240**, 1-7.
- Schmidt, C. J., G. M. Abbate, C. K. Black & V. L. Taylor: Selective 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, **255**, 478-483.
- Schmidt, C. J., J. A. Levin & W. Lovenberg: In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol* 1987, **36**, 747-755.
- Schmidt, C. J. & V. L. Taylor: Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochem. Pharmacol.* 1987, **36**, 4095-4102.
- Segura, M., M. Farré, S. Pichini, A. M. Peiró, P. N. Roset, A. Ramírez, J. Ortuño, R. Pacifici, P. Zuccaro, J. Segura & R. d. I. Torre: Contribution of Cytochrome P450 2D6 to 3,4-Methylenedioxymethamphetamine Disposition in Humans Use of Paroxetine as a Metabolic Inhibitor Probe. *Clin Pharmacokinet* 2005, **44**, 649-660.
- Shankaran, M. & G. A. Gudelsky: A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacology* 1999, **147**, 66-72.
- Shulgin, A. T.: The background and chemistry of MDMA. *J. Psychoactive Drugs* 1986, 291-304.
- Shulgin, A. T. & D. E. Nichols: Characterization of three new psychotomimetics. *The Psychopharmacology of Hallucinogens* 1978.
- Sies, H. & P. Graf: Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. *Biochem J* 1985, **226**, 545-9.
- Simantov, R.: Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). *Life Sci* 2004, **74**, 803-814.
- Simantov, R. & M. Tauber: The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *FASEB* 1997, **11**, 141-146.
- Somponpun, S. J.: Neuroendocrine regulation of fluid and electrolyte balance by ovarian steroids: contributions from central oestrogen receptors. *J Neuroendocrinol* 2007, **19**, 809-18.
- Souza, E. B. D., G. Battaglia & T. R. Insel: Neurotoxic effect of MDMA on brain serotonin neurons: evidence from neurochemical and radioligand binding studies. *Ann. NY Acad. Sci.* 1990, **600**, 682-697.
- Sprague, J. E., M. L. Banks, V. J. Cook & E. M. Mills: Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and sympathetic nervous system involvement in hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *J Pharmacol Exp Ther* 2003, **305**, 159-166.
- Sprague, J. E., S. L. Everman & D. E. Nichols: An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology* 1998, **19**.
- Sprague, J. E., X. Huang, A. Kanthasamy & D. E. Nichols: Attenuation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity with the

- serotonin precursors tryptophan and 5-hydroxytryptophan. *Life Sci* 1994, **55**, 1193-1198.
- Stone, D. M., M. Johnson, G. R. Hanson & J. W. Gibb: Acute inactivation of tryptophan hydroxylase by amphetamine analogs involves the oxidation of sulfhydryl sites. *Eur J Pharmacol* 1989, **172**, 93-97.
- Taraska, T. & K. T. Finnegan: Nitric oxide and the neurotoxic effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *JPET* 1997, **280**, 941-947.
- Taylor, W. M., P. H. Reinhart & F. L. Bygrave: Stimulation by alpha-adrenergic agonists of Ca<sup>2+</sup> fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem J* 1983, **212**, 555-65.
- Terada, Y., S. Shinohara, N. Matui & T. Ida: Amphetamine-induced myoglobinuric acute renal failure. *Jpn J Med* 1988, **27**, 305-308.
- Topp, L., J. Hando, P. Dillon, A. Roche & N. Solowij: Ecstasy use in Australia: patterns of use and associated harm. *Drug Alcohol Depend* 1999, **55**, 105-115.
- Verbalis, J. G., S. R. Goldsmith, A. Greenberg, R. W. Schrier & R. H. Sterns: Hyponatremia treatment guidelines 2007: expert panel recommendations. *Am J Med* 2007, **120**, S1-21.
- Verkes, R. J., H. J. Gijssman, M. S. M. Pieters, R. C. Schoemaker, S. d. Visser, M. Kuijpers, E. J. M. Pennings, D. d. Bruin, G. V. d. Wijngaart, J. M. A. V. Gerven & A. F. Cohen: Cognitive performance and serotonergic function in users of ecstasy. *Psychopharmacology* (2001) 153:196-202 2001, **153**, 196-202.
- Verrico, C. D., G. M. Miller & B. K. Madras: MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology* 2005, **189**, 489-503.
- Vollenweider, F. X., A. Gamma, M. Liechti & T. Huber: Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naive healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 1998, **19**, 241-251.
- Vuori, E., J. A. Henry, I. Ojanperä, R. Nieminen, T. Savolainen, P. Wahlsten & M. Jääntti: Death following ingestion of MDMA (ecstasy) and mocllobemide. *Addiction* 2003, **98**, 365-368.
- Walubo, A. & D. Seger: Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, 'ecstasy': case report and review of the literature. *Hum Exp Toxicol* 1999, **18**, 119-125.
- Yamamoto, B. K., J. F. Nash & G. A. Gudelsky: Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J Pharmacol Exp Ther* 1995, **273**, 1063-1070.
- Yamamoto, B. K. & L. J. Spanos: The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur J Pharmacol* 1988, **148**, 195-203.
- Zhao, Z. Y., N. C. Jr, G. A. Ricaurte, T. Steele & M. Martello: Synthesis and neurotoxicological evaluation of putative metabolites of the serotonergic neurotoxin 2-(methylamino)-1-[3,4-(methylenedioxy)phenyl] propane [(methylenedioxy)methamphetamine]. *Chem Res Toxicol* 1992, **5**, 89-94.
- Zhu, B. T.: Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Mediated Methylation Metabolism of Endogenous Bioactive Catechols and Modulation by Endobiotics and Xenobiotics: Importance in Pathophysiology and Pathogenesis. *Current Drug Metabolism* 2002, **3**, 321-349.

Zilberberg, M. D., A. Exuzides, J. Spalding, A. Foreman, A. G. Jones, C. Colby & A. F. Shorr: Epidemiology, clinical and economic outcomes of admission hyponatremia among hospitalized patients. *Curr Med Res Opin* 2008.