

Maria Inês Simões da Silva Travassos Pimentel

MDMA e seus metabolitos: efeito vascular e toxicidade

DISSERTAÇÃO

Âmbito	Mestrado em Farmacologia Aplicada
Instituição	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
Orientador	Professora Doutora Maria Dulce Cotrim

Janeiro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

À Senhora Professora Doutora M^a Dulce Cotrim por ter permitido a realização deste trabalho, com toda a componente de investigação laboratorial inerente, dando-me assim a conhecer outra dimensão do farmacêutico e *abrindo portas* para novas realidades, mas também por todo o incentivo e apoio sempre demonstrados, a par da sua partilha de conhecimento e orientação, enquanto Docente e orientadora de Dissertação do Mestrado em Farmacologia Aplicada.

A todos os elementos do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da U.C./C.E.F por também terem tornado possível esta experiência académica enriquecedora e me terem acolhido desde logo.

Aos colegas Filipa Guerra e Diogo Fonseca que mais de perto trabalharam comigo neste projecto, partilhando os momentos bons e os menos bons, mas que acima de tudo foram incansáveis na interajuda, disponibilidade e partilha de documentação de apoio e dados bibliográficos. Com uma consideração especial pelo Diogo Fonseca, pelo grande apoio, particularmente nos últimos meses.

Aos meus amigos, por aquilo que para mim é a amizade, por compreenderem quando não estive presente, pelas vivências partilhadas de perto ou à distância.

Aos meus pais, avós e tios pelo apoio inesgotável expresso em todos os momentos, pela enorme motivação, pela confiança transmitida, pela compreensão por nem sempre estar disponível e preocupação com o meu bem-estar sempre demonstrados.

À minha irmã pelo incentivo, positivismo e boa disposição que transmite.

E um agradecimento especial ao Nuno, pela paciência de partilhar comigo muitos momentos ao longo deste trabalho, compreensão pela distância ou indisponibilidade em alguma altura e pelo suporte emocional que sempre me dá.

A Coimbra por me ter visto nascer, crescer e evoluir, assim espero, na sua secular Universidade!

Maria Inês Pimentel

Resumo

A 3,4 – Metilenodioximetanfetamina (MDMA), comumente designada por ecstasy, é uma droga sintética, ilegal e de elevado potencial de abuso. O seu consumo está particularmente associado a ambientes nocturnos, festas e conceitos musicais específicos, como a música eletrónica ou a cultura *dance*, numa população essencialmente jovem, com o intuito de aumentar a energia, performance física e anímica, e portanto o prazer.

A sensação de bem-estar, a felicidade, a euforia, a desinibição, a alteração da percepção sensorial são alguns dos efeitos psicológicos do ecstasy. No entanto, com o seu uso estão relacionados diversos mecanismos de toxicidade: eventos cardiovasculares, nomeadamente, aumento da pressão arterial, taquicardia, arritmia, vasoconstrição ou mesmo enfarte agudo do miocárdio ou morte súbita; a hipertermia, rabdomiólise e hepatotoxicidade; a neurotoxicidade, por acção da serotonina, a noradrenalina ou a dopamina; perturbações psicológicas são efeitos comuns que podem surgir a longo prazo, tais como alucinações, delírios, ataques de pânico, alterações comportamentais e cognitivas, depressão ou mesmo o suicídio.

Uma particularidade do MDMA reside no facto de os seus produtos da metabolização hepática serem mais tóxicos do que a própria molécula. A sua metabolização envolve um primeiro passo de N-demetilação, originando a 3,4 – Metilenodioxianfetamina (MDA). A MDMA e este produto, por sua vez sofrem O-demetilação, formando-se respetivamente N-Metil- α -Metildopamina (N-Me- α -MeDA) e α -Metildopamina (α -MeDA). Estes dois produtos podem sofrer reação de oxidação, formando-se quinonas, que na presença de glutatona (GSH) dão origem a conjugados glutationil o 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e 5-(GSH)- α -MeDA, que já demonstraram toxicidade superior ao próprio MDMA.

Assim, o objectivo deste estudo é avaliar contratilidade vascular ao MDMA e seus metabolitos a 37°C, tendo como base o mecanismo fisiológico de contracção vascular à serotonina (5-HT). Para a realização deste estudo *ex vivo* seleccionámos a artéria mamária interna humana (AMIH), como modelo vascular, artéria amplamente utilizada, actualmente, como enxerto em cirurgia de *bypass* coronário.

Os resultados mostraram haver resposta contráctil da AMIH tanto ao MDMA, como aos metabolitos α -MeDA e N-Me- α -MeDA. Estes dois metabolitos provocaram alteração da curva concentração-resposta (controlo), produzindo um desvio da curva da 5-HT para a direita, indicando tratar-se de agonismo parcial. Os metabolitos 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e

5-(GSH)- α -MeDA não provocaram contracção arterial, no entanto o comportamento de ambas sugere tratar-se de substâncias antagonistas.

Palavras-chave:

MADMA; α -MeDA; N-Me- α -MeDA; 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA; 5-(GSH)- α -MeDA; 5-HT; Artéria Mamária Interna Humana; Contracção Vascular; Toxicidade.

Abstract

3,4 – Methylendioxyamphetamine (MDMA), generally known as ecstasy, is an illegal synthetic drug, with a high level of abuse. Its consumption is particularly related with night parties and night clubs with a specific musical concept, such as electronic and *dance* music, mostly among youngsters, as a way to enhance their energy, physical performance and state of mind, therefore, enhancing pleasure.

Senses of well-being, happiness, euphoria, disinhibition, sensorial perception alteration, are just a few of the psychological effects of ecstasy. However, several toxicity mechanisms can be associated with its use: cardiovascular events, namely, blood pressure rise, tachycardia, arrhythmia, vasoconstriction or even acute myocardial infarction or sudden death; hypothermia, rhabdomyolysis and hepatotoxicity; neurotoxicity, by action of serotonin, noradrenaline or dopamine; psychological disorders are common effects that may arise with long term exposure, such as hallucinations, delusions, panic attacks, behavioural and cognitive changes, depression or even suicide.

One of MDMA's particularities resides on the fact that its hepatic metabolic products are more toxic than the molecule itself. Its metabolism involves N-demethylation to 3,4 – Methylendioxyamphetamine. On the other hand, MDMA and this product will undergo O-demethylation resulting in N-Methyl- α -Methyldopamine (N-Me- α -MeDA) and α -Methyldopamine (α -MeDA), respectively. These two products may suffer oxidation, forming quinones, which in presence of glutathione (GSH) forms glutathionyl adducts 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA and 5-(GSH)- α -MeDA, which in turn have been proven more toxic than MDMA itself.

Therefore, the purpose of this study is to evaluate the vascular contractility to MDMA and its metabolites at 37°C, based on the vascular contraction physiological mechanism to serotonin. For the realization of an *in vivo* study, human internal mammary artery (HIMA) was selected as a vascular model, due to its recently widespread use as an artery graft in coronary bypass surgery.

Results showed that there is a contractile response of the HIMA to MDMA and its metabolites α -MeDA and N-Me- α -MeDA. These two metabolites caused an alteration of the control concentration-response curve, producing a right side deviation of the 5-HT curve, indicating that it is a partial agonism. 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e 5-(GSH)- α -MeDA did not

produce any arterial contraction, however, their behaviour suggests that they are antagonistic substances.

Keywords:

MADMA; α -MeDA; N-Me- α -MeDA; 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA; 5-(GSH)- α -MeDA; 5-HT; Human Internal Mammary Artery; Vascular Contraction; Toxicity.

Índice

Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice.....	VII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de tabelas.....	XI
Abreviaturas e Siglas.....	XII
I. INTRODUÇÃO.....	I
1.1. 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA).....	I
1.1.1. MDMA: Contexto Histórico, Dados Epidemiológicos e Suas Características.....	I
1.1.2. A Química da MDMA e sua Estrutura.....	4
1.1.3. Farmacologia da MDMA: Farmacocinética e Farmacodinâmica.....	5
1.1.4. Efeitos da MDMA.....	10
1.1.5. A MDMA e o Sistema Cardiovascular.....	13
1.1.6. Estudos realizados com MDMA e seus metabolitos.....	14
1.2. Serotonina (5-HT).....	16
1.2.1. Funções e efeitos da Serotonina.....	17
1.2.2. Receptores da Serotonina.....	18
1.2.3. Receptores da Serotonina no Sistema Cardiovascular Humano.....	20
1.3. A Artéria Mamária Interna Humana (AMIH).....	24
1.4. A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e a Serotonina (5-HT).....	25
2. OBJECTIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Fármacos e Reagentes.....	29
3.2. Colheita das Artérias Mamárias Internas Humanas.....	29
3.3. Protocolo Experimental.....	30
3.4. Análise de Resultados.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Resposta contráctil da AMIH à MDMA e metabolitos a 37°C.....	34
4.1.1. Resposta contráctil da AMIH à MDMA.....	34
4.1.2. Resposta contráctil da AMIH à α -MeDA.....	35
4.1.3. Resposta contráctil da AMIH à N-Me- α -MeDA.....	36
4.1.4. Resposta contráctil da AMIH à 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA.....	37

4.1.5. Resposta contráctil da AMIH à 5-(GSH)- α -MeDA 37°C	38
4.2. Efeito da MDMA e metabolitos na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C....	38
4.2.1. Efeito da MDMA (400 μ M, 800 μ M e 1600 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C.....	39
4.2.2. Efeito da α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C.....	40
4.2.3. Efeito da N-Me- α -MeDA (80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C	41
4.2.4. Efeito da 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C.....	42
4.2.5. Efeito da 5-(GSH)- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C.....	43
5. DISCUSÃO	45
6. CONCLUSÕES.....	51
<i>Este documento foi escrito segundo o Antigo Acordo Ortográfico.....</i>	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Índice de Figuras

- Figura 1 – Comprimidos ou Pastilhas de “Ecstasy” com diferentes formas e cores, contendo numa das faces desenhos alusivos ao nome pelo qual são conhecidos e na outra face uma ranhura de quebra para divisão de doses. _____ 3
- Figura 2 – Estrutura química de aminas, anfetaminas e alguns derivados. Adaptado de K.J Broadley, 2010; Green et al., 2003. _____ 5
- Figura 3 – Possível via para o metabolismo do MDMA. Adaptado de Capela et al., 2006. ___ 7
- Figura 4 – Mecanismo de acção mediado por receptores serotoninérgicos: na ausência de MDMA, durante e após a interacção com MDMA. Fonte: “National Institute on Drug Abuse”. _____ 10
- Figura 5 – Biossíntese da 5-HT. Fonte: Nature Reviews – Drug Discovery. _____ 17
- Figura 6 – Localização dos receptores 5-HT no coração humano. Retirado de Kauman et al., 2006. _____ 20
- Figura 7 – Localização da artéria mamária interna humana no Sistema Circulatório Humano. _____ 24
- Figura 8 – Preparação dos anéis vasculares em ansas de platina . _____ 30
- Figura 9 – Anéis vasculares suspensos em banho de órgãos. _____ 31
- Figura 10 – Resposta contráctil da AMIH à MDMA (10-800 μ M) a 37°C. Os resultados da curva concentração-resposta ao MDMA foram expressos em valores médios \pm S.E.M. de 4 experiências (n) para MDMA. As barras verticais representam o S.E.M. _____ 34
- Figura 11 – Resposta contráctil da AMIH à α -MeDA (1-600 μ M) a 37°C. Os resultados da curva concentração-resposta à α -MeDA foram expressos em valores médios \pm S.E.M. de 4 experiências (n) para a α -MeDA. As barras verticais representam o S.E.M. _____ 35

Figura 12 – Resposta contráctil da AMIH à N-Me- α -MeDA (0,1-60 μ M) a 37°C. Os resultados da curva concentração-resposta à N-Me- α -MeDA foram expressos em valores médios \pm S.E.M. de 4 experiências (n) para a N-Me- α -MeDA. As barras verticais representam o S.E.M. _____ 36

Figura 13 – Resposta contráctil da AMIH ao KCl (60mM) e da 5-(GSH)-N-Me- α - MeDA (0,1 μ M-60 μ M) a 37°C. A primeira curva representa a experiência que testa a contractilidade da artéria, registando-se resposta contráctil do vaso ao KCl. A adição de concentrações crescentes de 5-GSH-N-Me- α -MeDA, representada na 2ª curva, não provoca resposta contráctil no mesmo anel da AMIH. _____ 37

Figura 14 – Resposta contráctil da AMIH à 5-(GSH)- α -MeDA (0,1 μ M-60 μ M) a 37°C. A adição de concentrações crescentes de 5-(GSH)- α -MeDA, representada na curva, não provoca resposta contráctil significativa no mesmo anel da AMIH. _____ 38

Figura 15 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com MDMA (400 μ M, 800 μ M e 1600 μ M) na AIMH, a 37°C. ____ 39

Figura 16 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C. _____ 40

Figura 17 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C.____ 41

Figura 18 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C. _____ 42

Figura 19 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com 5-(GSH)- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C. _____ 43

Índice de tabelas

Tabela 1 – Efeitos da activação dos diferentes subtipos de receptores da 5-HT no Sistema Caridovascular. Adaptado de Kaumann & Levy, 2006; Rang et al, 2003.....	22
Tabela 2 – Comparação da resposta contráctil da AMIH à MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA.....	37
Tabela 3 – % de redução do E_{max} relativamente ao controlo e pEC_{50} para o MDMA e metabolitos.....	44

Abreviaturas e Siglas

5-(GSH)-α-MeDA	5-glutationil- α -metildopamina
5-(GSH)-N-Me-α-MeDA	5-glutationil-N-metil- α -metildopamina
5-HT	5-hidroxitriptamina/serotonina
5-HT₁	receptor da serotonina do subtipo 1
5-HT_{1A}	receptor da serotonina do subtipo 1A
5-HT_{1B}	receptor da serotonina do subtipo 1B
5-HT_{1D}	receptor da serotonina do subtipo 1D
5-HT_{1E}	receptor da serotonina do subtipo 1E
5-HT_{1F}	receptor da serotonina do subtipo 1F
5-HT₂	receptor da serotonina do subtipo 2
5-HT_{2A}	receptor da serotonina do subtipo 2A
5-HT_{2B}	receptor da serotonina do subtipo 2B
5-HT_{2C}	receptor da serotonina do subtipo 2C
5-HT₃	receptor da serotonina do subtipo 3
5-HT₄	receptor da serotonina do subtipo 4
5-HT₅	receptor da serotonina do subtipo 5
5-HT₆	receptor da serotonina do subtipo 6
5-ht₇	receptor da serotonina do subtipo 7
α-MeDA	α -metildopamina
ANOVA	Análise de variância
AMIH	Artéria Mamária Interna Humana
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CYP450	Citocromo P450
CYP2D6	Debrisoquina 4-hidroxilase
DA	Dopamina

DNA	Ácido desoxirribonucleico
GSH	Glutationa
FDA	Food and Drug Administration
MAO	Monoamina oxidase
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxi-N-etilamfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetamfetamina
NA	Noradrenalina
N-Me-α-MeDA	N-metil- α -metildopamina
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogénio
SERT	Transportador da Serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
NaCl	cloreto de sódio
KCl	cloreto de potássio
CaCl₂	cloreto de cálcio
KH₂PO₄	diidrogenofosfato de potássio
MgSO₄	sulfato de magnésio
NaHCO₃	hidrogenocarbonato de sódio
mN	miliNewton
mM	miliMolar
ng	nanograma
μM	microMolar
°C	Graus Centígrados
E_{max}	Efeito Máximo
pEC₅₀	logaritmo negativo da concentração molar de agonista capaz de

	induzir metade da resposta máxima
SEM	Standard Error of the Mean
n	Número de experiências
p	Valor de p indicador do intervalo de confiança
%	Porcentagem

I. INTRODUÇÃO

I.1. 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)

I.1.1. MDMA: Contexto Histórico, Dados Epidemiológicos e Suas Características

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), “Ecstasy”, tornou-se numa das drogas recreativas mais populares e de elevado potencial de abuso, a partir do final do século XX, sendo o seu consumo um problema de saúde pública nas sociedades actuais. A partir dos anos 80, o uso desta droga ilícita começou a estar associado a ambientes recreativos, consumido em festas nocturnas, discotecas, *rave-party's*, concertos de música “*techno* e *trance*”.

De acordo com várias entidades como o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) ou mesmo dados da Organização das Nações Unidas, a MDMA é a segunda droga mais consumida nos países da União Europeia, sendo a primeira o *cannabis*. O seu público alvo é essencialmente jovem, entre os 15 e os 34 anos, existindo indicadores de que o consumo se inicia cada vez mais precocemente, havendo dados de estudos realizados no Reino Unido que apontam para que uma percentagem significativa de jovens com menos de 16 anos já esteve exposto à MDMA. Apesar de mais antigas, investigações realizadas em 2000, pelo Centro Europeu de Monitorização da Droga, avançavam que um terço dos jovens e adultos, em Inglaterra e País de Gales, com idades compreendidas entre os 16 e os 59 anos, já tinha consumido, pelo menos uma vez durante a sua vida drogas ilícitas. Relatórios actuais, referentes a 2013, do OEDT, confirmam que um quarto da população adulta europeia já consumiu, pelo menos uma vez, drogas ilícitas, 11,4 milhões de europeus (idades entre os 15 e 64 anos) já experimentou MDMA e 2 milhões referiu ter consumido esta droga no último ano. Ainda assim, estes últimos dados revelam uma ligeira diminuição da oferta de MDMA no mercado das drogas ilegais, comparativamente com dados do início dos anos 2000, assistindo-se, porém, a um crescimento vertiginoso do consumo de outras novas drogas sintéticas psicoestimulantes, que trazem elevados riscos para a saúde pública. Na Europa, actualmente, os países com maior consumo MDMA são a República Checa, Eslováquia, Alemanha e Grécia.

Em Portugal, o consumo da MDMA atingiu os níveis mais elevados entre 2001 e 2007, tendo vindo a ser defendido que esta diminuição de popularidade reflecte o decréscimo da qualidade e o baixo teor de MDMA nos comprimidos vendidos como “ecstasy”. No entanto a recuperação do interesse nesta droga parece ser uma tendência novamente (IDT, 2011).

A MDMA, composto derivado da anfetamina, foi sintetizada em 1912, tendo sido patenteada como inibidor do apetite em 1914 pelos laboratórios Merck Pharmaceuticals, na Alemanha, nunca chegando a ser comercializada como tal.

As primeiras referências ao MDMA remontam à década de 1950, em que o Exército Norte-Americano inicia a utilização de MDMA para fins experimentais no programa de guerra e também em interrogatórios. Na década de 1980, surgem as primeiras descrições desta substância como sendo psicoactiva (Green et al., 2003), começando a ser utilizada em psicoterapia, uma vez que, presumivelmente, aumentava a autoestima, a empatia, facilitava as relações interpessoais e a confiança no terapeuta, estimulando o processo de autoanálise e de introspeção. Dependendo da dose administrada oralmente (75 – 175 mg), esta droga poderia produzir efeitos simpaticomiméticos, como um aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial e ansiedade transitória (Greer & Strassman, 1985; Grinspoon & Bakalar, 1986).

Em 1985, dada a indefinição e falta de clarificação relativamente à sua aplicação terapêutica e também devido ao seu potencial de abuso, a FDA (Food and Drug Administration) integra a MDMA no conjunto de substâncias controladas de categoria I, caracterizadas pelo elevado potencial de abuso, sem benefício terapêutico e aplicação clínica justificada, cuja segurança da sua utilização não é garantida, ainda que sob supervisão médica (Riedlinger J., 1985).

No entanto, esta classificação e o facto de se ter, assim, tornado numa substância ilegal, não impediu que se transformasse numa das drogas recreativas mais populares a partir de 1985 (Valentine, 2002), primeiro nos E.U.A. e depois na Europa, consumida em “raves”, festas e concertos de música “*techno*”, em discotecas ou clubes nocturnos, dando ao consumidor a sensação de energia e bem-estar, permitindo dançar durante um período de tempo muito prolongado.

Nesta altura surgem os primeiros trabalhos que tentam evidenciar os perigos e os efeitos prejudiciais do consumo desta substância: a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA),

composto “próximo” da MDMA e metabolito resultante da sua degradação, induz degeneração de terminais nervosos serotoninérgicos, em estudos realizados em cérebro de rato (Ricaurte et al., 1985).

A MDMA, coloquialmente também conhecida por “Ecstasy”, “Speed”, “X”, “Crystal”, apresenta-se como comprimidos ou pastilhas de várias cores e diversas formas, com diferentes logotipos e *designs*, conforme mostra a Figura 1. Pode também estar disponível sob a forma de cápsulas ou pó, podendo ser consumida por via oral, fumada ou injectada por via intravenosa ou subcutânea (Ropero-Miller & Goldberger, 1998), sendo a forma oral a mais usual (Cole & Sumnall, 2003).



Figura 1 – Comprimidos ou Pastilhas de “Ecstasy” com diferentes formas e cores, contendo numa das faces desenhos alusivos ao nome pelo qual são conhecidos e na outra face uma ranhura de quebra para divisão de doses.

A quantidade e pureza de MDMA existente nos comprimidos são muito variáveis (Ziporyn, 1986; Bell et al., 2000; Cole et al., 2002), havendo uma larga percentagem destes comprimidos que não contém MDMA, e outros que têm na sua composição outras substâncias como anfetaminas, outras metanfetaminas, efedrina, cafeína, etc (Airmany et al., 1998; Baggott et al., 2000). Este aspecto é crucial para determinar se os efeitos clínicos que se observam se devem ou não à MDMA, sendo também importante ter em conta que, muitas vezes o uso destas drogas é feito concomitantemente com outras como o álcool, *cannabis*, outros estimulantes alucinogénicos, anfetaminas (Scholey et al., 2004), ou por exemplo com benzodiazepinas ou heroína, substância depressoras, utilizadas muitas vezes depois dos eventos e das festas nocturnas (Boys et al., 1997; Forsyth, 1996). Assim, os

efeitos prejudiciais, ou mesmo letais, podem advir do consumo de várias substâncias em simultâneo.

Apesar desta variabilidade ser uma realidade, um comprimido de “ecstasy” tem tipicamente 50 a 150 mg de MDMA (Kirsch, 1986), ou 80 a 150 mg, em revisões de outros autores (Schifano, 1991; Henry, 1992), sendo comum que o consumo ascenda no mínimo aos 2 comprimidos durante o evento ou a ocasião, havendo evidência de casos em que os 10 comprimidos são ultrapassados (Weinmann et al., 1998). Após ingestão, o início dos efeitos ocorre entre 20 a 60 minutos, tendo um máximo entre os 60 e os 90 minutos, após a administração da droga, podendo durar por um período de 3 a 5 horas. Estes efeitos imediatos traduzem-se em sensações de relaxamento, euforia e energia, aumento da autoconfiança, empatia e desinibição (Peroutka et al., 1988), aumento da sensação de prazer e diversão por exacerbação de todos os sentidos, nomeadamente através da intensificação das cores e sons (Davison & Parrott, 1997).

Assim, acompanhando este tipo de alterações fisiológicas, surgem os efeitos adversos e prejudiciais da MDMA. De tal modo, que, desde 1980 o número de reações adversas reportadas tem vindo a aumentar, sendo algumas delas fatais (Milroy, Clark, & Forrest, 1996).

1.1.2. A Química da MDMA e sua Estrutura

A MDMA é um derivado anfetamínico, sendo uma metanfetamina com o anel benzénico aromático substituído por um grupo *metilenodioxo* - O-CH₂-O - na posição 3 e 4 do anel. Esta estrutura assemelha-se à estrutura química da mescalina, substância alucinogénica, mas também à estrutura da anfetamina, amina simpaticomimética com propriedades anoréxicas e estimulantes do SNC. Com efeito, a MDMA funde estes efeitos, apresentando tanto uma acção alucinogénica como psicoestimulante.

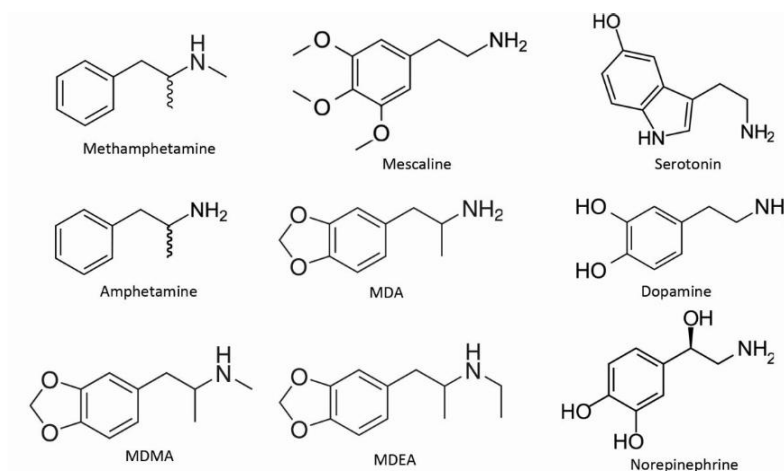


Figura 2 – Estrutura química de amins, anfetaminas e alguns derivados. Adaptado de K.J Broadley, 2010; Green et al., 2003.

Particularidade interessante da estrutura química desta droga é a acção do grupo *metil* presente na molécula, relativamente à amina primária. Tal como noutras substâncias alucinogénicas, a metilação do Azoto, na estrutura da Anfetamina, neste caso, provoca uma alteração das propriedades alucinogénicas da droga, diminuindo também o seu intervalo de duração de acção. Evidência da diminuição do potencial alucinogénico com a metilação da amina primária é a comparação entre a MDA e a MDMA. A primeira amina é extremamente potente, actuando durante um intervalo de tempo superior relativamente à segunda, apesar desta manter as suas características alucinogénicas, sendo um facto relevante o contraste entre estas dois compostos relacionados.

I.1.3. Farmacologia da MDMA: Farmacocinética e Farmacodinâmica

I.1.3.1. Farmacocinética

Em humanos, a MDMA é rapidamente absorvida pelo tracto intestinal e o seu máximo de concentrações plasmáticas é atingido cerca de 90 minutos a 2 horas, após a administração oral, embora os primeiros efeitos possam ser detectáveis a partir dos 20 minutos, após a ingestão da MDMA, conforme já referido (de la Torre et al, 2000; Mas et al,

1999). Dados de um estudo realizado em humanos mostram que doses de MDMA de 50 mg, 75 mg e 125 mg produzem níveis plasmáticos de 106 ng/mL, 131 ng/mL e 236 ng/mL, respectivamente (Kalant H., 2001). Os seus efeitos prolongam-se pelo período de 3 a 6 horas, em média, apresentando um tempo de semi-vida plasmática de aproximadamente 8 horas, sendo grande parte excretada na urina (Mas et al, 1999). Através da análise urinária, verificou-se que da MDMA e dos seus principais metabolitos que aproximadamente 50% da MDMA é recuperada em 24 horas, independentemente da dose.

Há dados que reportam aumentos de 50 mg para 150 mg na dose de MDMA ingerida, fazem com que a AUC (área sob a curva) da concentração plasmática versus tempo aumente 10 vezes, ou seja, para pequenos aumentos na dose verificam-se elevadas concentrações plasmáticas, podendo mesmo haver risco aumentado de *overdose*, o que sugere que a MDMA segue uma cinética não-linear (de la Torre et al, 2000; Mas et al, 1999).

Os efeitos farmacológicos após uma segunda administração são ligeiramente superiores aos efeitos atingidos após a primeira, no entanto mais baixos do que o expectável, considerando a concentração de MDMA alcançada após a administração da segunda dose (Farré et al, 2003).

A farmacocinética de uma única dose de MDMA (50, 75, 100, 125 e 150 mg) foi também estudada. Verificou-se que, a nível plasmático, N-Me- α -MeDA, metabolito da MDMA, foi o produto principal após ingestão das doses de 50, 75 e 100 mg, enquanto que o produto major para doses de 125 e 150 mg foi a MDMA, o que corrobora a não linearidade cinética da MDMA. Explicações avançadas para esta desproporcionalidade entre doses administradas e concentrações plasmáticas referem tratar-se de um fenómeno de saturação a nível do metabolismo da MDMA para elevadas doses, parecendo que auto inibe o seu próprio metabolismo por interacção dos seus metabolitos com o citocromo P450 2D6 (CYP2D6), responsável pela *clearance* desta substância. Há, portanto um aumento da biodisponibilidade da MDMA, com o aumento da dose ingerida (de la Torre et al, 2000).

Na realidade, muitos indivíduos consumidores referem tomar cerca de 10 a 25 pastilhas/doses por ocasião (Parrott A., 2004), o que pode conduzir facilmente à toxicidade. A média varia entre 1 e 2,8 pastilhas por sessão, no entanto, mais de 44% dos consumidores afirmam tomar mais que uma pastilha e 25% tomam 4 ou mais pastilhas por ocasião (Winstock et al.,2001).

Assim, existem diversos perfis de consumo, havendo indivíduos que tomam uma pastilha inicialmente e depois repetem a administração em intervalos diferentes para alcançarem os efeitos desejados, e outros que tomam várias pastilhas ao mesmo tempo (Hammersley et al., 1999).

Dados bibliográficos referem que injeções cerebrais de MDMA em ratos não produzem danos, não provocando neurodegeneração (Paris & Cunningham, 1992), no entanto revelam que administrações sistêmicas de MDMA resultam em toxicidade para os terminais serotoninérgicos (Monks et al., 2004), sendo assim posta em causa a neurotoxicidade por injeção directa intracraniana. Sabe-se também que o metabolismo hepático é um pré-requisito para a toxicidade renal do MDMA e MDA, em ratos (Carvalho et al., 2002), bem como para a neurotoxicidade testada também em ratos (de la Torres & Ferré, 2004; Jones et al., 2005). Portanto, várias são as investigações que postulam a necessidade de ter de ocorrer um processo de metabolização sistémica da droga para que se produza toxicidade.

Assim, diversas vias metabólicas poderão estar envolvidas no metabolismo da MDMA.

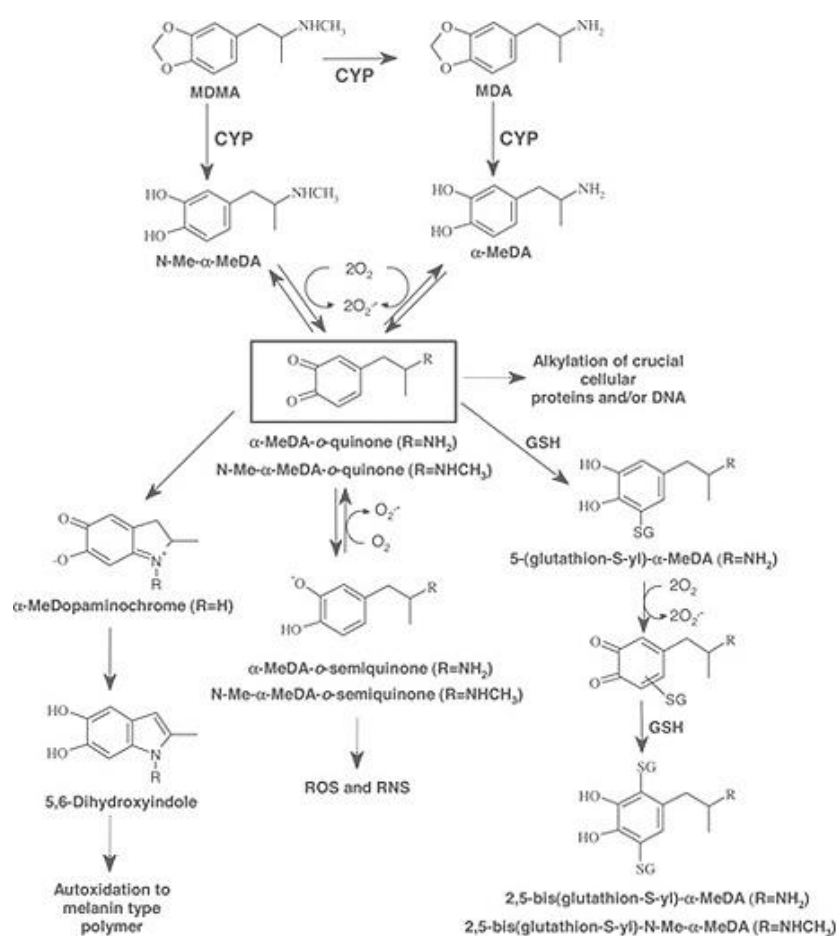


Figura 3 – Possível via para o metabolismo do MDMA. Adaptado de Capela et al., 2006.

O metabolismo da MDMA envolve, inicialmente, a N-demetilação desta em MDA, outra droga de abuso, por acção do Citocromo P450 1A2 (CYP1A2). Tanto a MDMA como a MDA sofrem O-demetilação, via P450 2D6 (CYP2D6), dando origem aos metabolitos N-metil- α -metildopamina (N-Me- α -MeDA) e α -metildopamina (α -MeDA), respectivamente (Lim & Foltz, 1988; Pizarro et al., 2004). Estes catecóis podem sofrer oxidação passando às correspondentes quinonas, compostos altamente reactivos, que podem originar radicais semiquinona, levando à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) (Bolton et al., 2000; Remião et al., 2002) ou por outra via, podem ainda formar ligações com o DNA e com proteínas ou conjugar com a glutatona, formando aductos glutationil: 5-(GSH)- α -MeDA e 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA, (Hiramatsu, et al., 1990). Estes conjugados mantêm a sua reatividade, podendo ser oxidados às correspondentes quinonas, seguido de adição de uma segunda molécula de GSH formando conjugados 2,5-bis-glutationil (Miller et al., 1997). Portanto, da metabolização resultam compostos intermediários reactivos, ROS, RON e produtos resultantes da oxidação, que em conjunto contribuem para a toxicidade da MDMA (Carvalho et al., 2004).

A conjugação da glutatona com compostos electrofílicos, normalmente, resulta em desintoxicação, com eliminação via ácido mercaptúrico. No entanto, em diferentes estudos, a conjugação de quinonas com a glutatona não elimina acção tóxica (Dekant, 2001; Monks & Lau, 1997; Van Bladeren, 2000).

A metabolização da MDMA, tanto em humanos como em ratos, ocorre principalmente a nível hepático, através do conjunto de isoenzimas que compõe o citocromo P450 (CYP1A2, CYP2D6). Polimorfismos genéticos destas isoenzimas podem estar associados a alterações no metabolismo, ou seja, independentemente da dose de MDMA a que os indivíduos estão expostos, mesmo que esta seja a mesma, a metabolização é variável de indivíduo para indivíduo, concluindo-se, ainda, que uma metabolização lenta aumenta o risco de toxicidade aguda (Carmo et al., 2006; de la Torre, 2005).

MDA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA são os compostos major resultantes de metabolização do MDMA, a nível hepático (Monks et al., 2004). Em humanos N-Me- α -MeDA é o principal metabolito plasmático, enquanto em ratos é α -MeDA (de La Torre & Farré, 2004; Easton & Marsden, 2006).

In vitro, as concentrações de N-Me- α -MeDA e α -MeDA vão decrescendo ao longo do tempo (Carvalho et al., 2004) devido à sua oxidação e conjugação com GSH, verificando-se

que a depleção desta constitui um evento tóxico observado em células cardíacas de rato expostas N-Me- α -MeDA e α -MeDA.

De referir que α -MeDA e a N-Me- α -MeDA (catecóis) são mais tóxicas para os neurónios corticais que o próprio MDMA (Capela, et al., 2006) e que os conjugados com a glutatona são mais neurotóxicos que os correspondentes catecóis (Capela, et al., 2007).

1.1.3.2. Farmacodinâmica

Estudos em animais demonstram que após administração de MDMA o efeito agudo característico é uma rápida libertação de 5-HT das vesículas pré-sinápticas e inibição da recaptação da 5-HT, seguido de um acentuado decréscimo dos níveis de 5-HT no cérebro dos animais, de 5-HIAA, produto da metabolização da 5-HT e uma diminuição da actividade da triptofano hidroxilase, enzima catalizadora da síntese de 5-HT (Crespi et al, 1997; Stone et al, 1989; Iravani et al, 2000). Alguns estudos sugerem que a inibição da recaptação da 5-HT é mais importante que a sua libertação direta no aumento da concentração de 5-HT (Iravani et al., 2000).

A MDMA actua sobre o SNC aumentando a libertação não só de 5-HT, mas de outros neurotransmissores do grupo das monoaminas como a Dopamina e a Noradrenalina: é responsável pela inibição da Monoaminoxidase (MAO), enzima responsável pela metabolização da serotonina e dopamina no terminal nervoso, contribuindo para um aumento destes neurotransmissores (Leonardi & Azmitia, 1994).

A MDMA tem alta afinidade para o transportador da serotonina (SERT), comportando-se como substrato deste e promovendo a libertação do neurotransmissor (Huether et al., 1997; Levi & Raiteri, 1993). Ou seja, a MDMA inibe a recaptação da 5-HT por interacção, a nível sináptico, com o transportador membranar da 5-HT, o SERT. Assiste-se, portanto a um aumento da concentração intra-sináptica destes neurotransmissores, principalmente da 5-HT, seguido por um período de depleção do neurotransmissor, conforme se mostra na Figura 4.



Figura 4 – Mecanismo de acção mediado por receptores serotoninérgicos: na ausência de MDMA, durante e após a interacção com MDMA. Fonte: “National Institute on Drug Abuse”.

A MDMA é considerada, assim, uma neurotoxina serotoninérgica.

Tem também sido referida a atuação da MDMA na libertação de acetilcolina (Fischer et al., 2000). MDMA induz o aumento da libertação de cortisol e prolactina (Mas, et al., 1999), hormona adrenocorticotrófica (ACTH) (Grob et al., 1996) e hormona antidiurética (ADH).

Tratando-se de uma droga, e pelos mecanismos apresentados, existem potenciais interacções com outras drogas ou fármacos. Inibidores da recaptação da 5-HT, como a fluoxetina ou a paroxetina, a cocaína (Ramamoorthy et al., 1997) e derivados anfetamínicos, são substâncias que inibem o CYP2D6, aumentando as concentrações plasmáticas de MDMA. Toda a administração concomitante de substâncias pró-serotoninérgicas pode potenciar os efeitos tóxicos provocados pelo aumento da 5-HT. O Síndrome da 5-HT é uma condição que ocorre por excessiva estimulação dos receptores serotoninérgicos, e que pode ser desencadeada por anfetaminas, antidepressivos ou pela cocaína, caracterizando-se por hiperactividade, confusão mental, diarreia, tremores, rigidez muscular, hipertensão, podendo levar à morte.

1.1.4. Efeitos da MDMA

Diversos efeitos fisiológicos ocorrem após a administração de MDMA e incluem aumento da pressão sanguínea, do ritmo cardíaco e das concentrações plasmáticas de cortisol e prolactina (Mas et al., 1999). Náuseas, dor abdominal, tremores, palpitações, sensação de frio/calor, aumento da temperatura e sudorese, bruxismo, intensificação de

reflexos, visão turva, tensão muscular, boca seca, agitação, ansiedade e insónia (Peroutka et al., 1988; McCann et al., 1996) são outros efeitos agudos comprovados.

De realçar que Liechti & Vollenweider, em 2000, estudaram os efeitos fisiológicos da MDMA, recorrendo a um pré-tratamento com citalopram, inibidor da recaptção da 5-HT, e concluíram que os sintomas cardiovasculares foram atenuados, não se verificando o mesmo para o fenómeno de hipertermia.

Os efeitos relatados e estudados em grupos de voluntários, e que são, portanto os efeitos pretendidos por quem consome esta anfetamina incluem estados de euforia, excitação, aumento da energia, sentimentos de felicidade e abandono de pensamentos negativos, relaxamento, sociabilidade, aumento da auto-estima e confiança, aumento da sensibilidade auditiva, visual e táctil, alucinações visuais. Também depressão, ataques de pânico e ilusões paranoicas (Brown et al., 1987; McCann et al., 1996; Davison et al., 1997) estão descritos na sequência do consumo desta droga. Após o “pico” do efeito da MDMA passar, são referidas sensações de letargia, humor negativo, irritabilidade e paranoia.

Também o pré-tratamento com uma dose única de citalopram inibe a maioria dos efeitos psicológicos referidos, no entanto não afecta a excitabilidade emocional.

O pré-tratamento com o antagonista do subtipo de receptores 5-HT_{2A}, a cetanserina, reduz a excitabilidade emocional, não produzindo, no entanto, efeito significativo na sensação de bem-estar e humor positivo (Liechti et al., 2000). Recorrendo ao pré-tratamento com haloperidol, um antagonista do subtipo de receptores D₂ da dopamina, verificou-se a redução da sensação de euforia e de bom humor, o que indica que o neurotransmissor dopamina também está envolvida nos efeitos psicológicos induzidos pela MDMA.

A exposição à MDMA também causa efeitos prejudiciais a longo prazo como erosão dentária, dor facial secundária ao bruxismo, hepatotoxicidade (Brown et al., 1987; Henry et al., 1992; McCann et al., 1992), sendo os contaminantes muitas vezes existentes nas pastilhas, factor preponderante e agravante deste efeito. A neurotoxicidade, não só a nível dos neurónios serotoninérgicos com alteração marcada da sensibilidade dos receptores da 5-HT, como todo o sistema neuronal é afectado, podendo ocorrer também lesões isquémicas. A toxicidade cardiovascular é também um efeito decorrente da utilização da MDMA (risco cardiovascular aumentado com elevação da pressão arterial, alterações da circulação sanguínea cerebral). O uso regular pode conduzir a psicose crónica (Creighton et al., 1991;

McGuire & Fahy, 1991), sendo o suicídio, também uma fatalidade que pode decorrer do uso da MDMA, pelos efeitos apresentados.

Esta droga contribui ainda para o agravamento de condições fisiopatológicas já existentes como a asma, aterosclerose ou cardiomiopatias.

Assim, concluímos que muitos serão os efeitos adversos provocados pelo uso da MDMA, apesar dos efeitos desejáveis que fazem desta, uma das drogas recreativas mais populares. Uma das maiores reacções adversas da ingestão de MDMA é a hipertermia (Freedman et al., 2005). A maior causa de morte relatada de toxicidade da MDMA é a hipertermia, atingindo temperaturas corporais acima de 43°C (Henry et al., 1992).

Os neurotransmissores envolvidos na regulação da temperatura corporal são a 5-HT e a DA. Assim, e conforme exposto ao longo deste capítulo, a MDMA aumenta a libertação destas duas substâncias, o que explica os efeitos da droga sobre o centro da temperatura no hipotálamo, que se traduzem na temperatura corporal.

Portanto a hipertermia é mediada pela 5-HT (Shankaran & Gudelsky, 1999) e também pela DA (Bronstein & Hong, 1995). Um estudo (Mechan et al., 2002) realizado com antagonistas dos de receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} não comprovou o bloqueio da indução da hipertermia pelo MDMA, o que indica que o envolvimento de outros receptores e de outro neurotransmissor no efeito da temperatura. A administração de fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção de 5-HT, bloqueou significativamente o aumento extracelular de serotonina, mas não teve qualquer efeito na hipertermia.

No entanto, importa ainda realçar que o uso de MDMA reporta a condições de temperatura ambiente elevada, desidratação e intensa atividade física, ambiente habitual em “raves”, o que também contribui para um aumento da temperatura corporal (Green et al., 2003), apesar de nos humanos, este fenómeno já ter sido comprovado tanto em condições ambientais frias (18°C), como quentes (30°C), por aumento da taxa metabólica (Tancer et al., 2003).

A hipertermia pode desencadear arritmias cardíacas, falha renal aguda, rabdomiólise e coagulação vascular (Lyles & Cadet, 2003; Screatton, et al., 1992). Falência de órgãos, efeitos a nível motor, musculares, vasoconstrição e taquicardia (Lyles & Cadet, 2003) também são consequência desta reacção adversa grave.

A Hipertermia leva ao aumento da formação de radicais livres (Cadete et al., 1994; Gudelsky & Nash, 1996; Halliwell, 1992) que induz toxicidade. Tendo em conta que os metabolitos da MDMA são compostos que podem produzir ROS/RNS e provocam diminuição da GSH, a hipertermia ao causar stress oxidativo potencia a toxicidade. Está demonstrado que a MDMA causa hipertermia aguda e que esta pode ser fatal (Green et al., 2003; Henry et al., 1992), necessitando de intervenção médica urgente.

A estratégia terapêutica e de tratamento da intoxicação aguda por MDMA e os seus efeitos adversos estão, de certa forma, limitados ao controlo sintomático, nomeadamente dos efeitos simpaticomiméticos, recorrendo-se, na prática clínica, à classe de fármacos α e β -adrenérgicos. A vasoconstrição, em determinados casos, pode ser revertida pela acção da clozapina ou da olanzapina, por interacção provável com os receptores da 5-HT.

A administração de antagonistas do subtipo de receptores 5-HT_{2A}, como a cetanserina, juntamente com MDMA parece não provocar aumento da temperatura corporal tão acentuado como a MDMA sozinha, tornando possível a utilização de antagonistas do subtipo de receptores 5-HT_{2A} como arma terapêutica contra alguns efeitos tóxicos da droga de abuso (Capela et al., 2006).

1.1.5. A MDMA e o Sistema Cardiovascular

A MDMA actua sobre os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico, causando estimulação simpática. Há, assim, a nível cardiovascular um aumento das necessidades de oxigénio no miocárdio, com taquicardia, vasoconstrição, variações na pressão sanguínea e arritmias. Diversas são as fontes bibliográficas que referem a toxicidade cardiovascular e a vasoconstrição como efeito desta droga: taquicardia e arritmias em corações isolados de ratos (Fitzgerald & Reid, 1994) levaram os investigadores a concluir o efeito simpaticomimético da MDMA nos tecidos cardiovasculares.

Não só a MDMA, mas também outras aminas foram alvo de diferentes estudos que comprovam que a sua administração oral, em humanos, produz um aumento da pressão arterial (Broadley, 2010).

O uso de MDMA tem vindo a ser associado a colapso cardiovascular, morte súbita (Bedford et al., 1992; Dowling et al., 1996; Milroy et al., 1996), taquicardia ventricular e hipertensão (Lester, et al., 2000; Mas, et al., 1999). O vasoespasmo pode levar ao enfarte

agudo do miocárdio e a cardiomiopatias irreversíveis (Ghuran & Nolan, 2000), hipertrofia do miocárdio (Patel, et al., 2005) e efeito súbito hipertensivo (Henry, et al., 1992), foram fenómenos já estudados.

Hemorragias intracranianas e da retina como resultado da ruptura vascular têm sido reportadas.

O consumo prolongado de MDMA a médio/longo-prazo pode induzir alterações significativas a nível cardiovascular, por aumento de arritmias e problemas inflamatórios nos cardiomiócitos (Badon, et al., 2002).

1.1.6. Estudos realizados com MDMA e seus metabolitos

A MDMA, seus metabolitos e a mistura destes compostos, (Barbosa et al., 2013) caracterizam-se por estarem associados a diferentes mecanismos de toxicidade: neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade ou cardiotoxicidade.

Embora existam trabalhos dedicados a cada uma dessas vertentes, grande parte refere-se à neurotoxicidade. A MDMA revelou-se neurotóxica, provocando degeneração neuronal significativa em diferentes regiões do cérebro, como sejam o córtex, o tálamo e o estriato (Commins et al., 1987), havendo morte celular por apoptose das células neuronais. A MDMA tem afinidade para uma vasta gama de locais de reconhecimento dos neurotransmissores (Battaglia & De Sousa, 1989; Battaglia et al., 1988), tendo-se vindo a provar que a neurotoxicidade induzida pela MDMA é mediada pelos receptores 5-HT_{2A} (Battaglia, et al., 1988; Capela, et al., 2006), testando a acção antagonista sobre estes receptores, com cetanserina, verificando-se uma diminuição da neurotoxicidade. O agonista dos 5-HT_{2A} provocou morte celular (Capela et al, 2006). Os compostos 5-(GSH)- α -MeDA e 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA comportam-se como potentes neurotoxinas quando comparadas com os correspondentes catecóis e com o próprio MDMA. Neste estudo concluiu-se ainda que a neurotoxicidade, provoca stress oxidativo, sendo potenciada em condições de hipertermia (Capela et al, 2006; Capela et al, 2007).

Também existe investigação relativamente aos efeitos renais e nefrotoxicidade, sendo a falência renal aguda ou crónica um efeito grave decorrente do consumo de MDMA (Henry et al., 1992). Estudo realizado com cultura de células tubulares proximais humanas e de rato, avaliando a toxicidade provocada pela MDMA e metabolitos, revelou que a MDMA e o seu

metabolito major, MDA, não desencadearam resposta tóxica, para nenhuma das concentrações testadas, contrastando com os resultados obtidos para o metabolito α -MeDA, o qual provocou morte celular a cerca de metade das células dos dois grupos. O metabolito conjugado de glutationil, 5-(GSH)- α -MeDA, demonstrou ainda um potencial nefrotóxico superior, causando morte celular em cerca de 75% das células renais. Concluindo-se, assim, que também a nível da toxicidade renal, o metabolismo é pré-requisito para o aumento da toxicidade dos compostos estudados (Carvalho et al., 2002).

Relativamente aos efeitos adversos a nível vascular e cardíaco, sabe-se que a MDMA induz vasoconstrição (Fitzgerald and Reid, 1994), produzindo diversos efeitos cardiovasculares como a alteração do ritmo cardíaco, da pressão arterial e aumento do consumo de oxigénio pelo miocárdio em humanos e em animais, o que resulta em hipertensão, arritmia, isquémia ou enfarte agudo do miocárdio. Estudo *in vitro* concluiu que apenas uma única administração de ecstasy é suficiente para produzir cardiotoxicidade *in vitro* (Cerretani, et al., 2008). Foi realizado um estudo com cardiomiócitos isolados de rato, com o objectivo de testar o efeito da MDMA e dos metabolitos *major*, MDA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA na função cardiovascular. Em cardiomiócitos expostos a MDMA e MDA não houve toxicidade a nível destas células cardíacas, enquanto os metabolitos α -MeDA e N-Me- α -MeDA induziram toxicidade nos cardiomiócitos, nas mesmas condições experimentais. Tal como descrito anteriormente, também aqui os autores concluíram que o fenómeno de metabolização pode ser factor limitante da toxicidade, sendo necessário esse prévio mecanismo para que haja cardiotoxicidade *in vitro*.

A nível da toxicidade cardiovascular outros estudos têm sido feitos com estes compostos, recorrendo a aorta de rato ou a artéria mamária interna humana. Nestes estudos tem-se verificado que os receptores 5-HT₂ medeiam a toxicidade vascular induzida pela MDMA e alguns dos seus metabolitos.

Conforme a abordagem feita ao longo deste capítulo, a investigação em MDMA é uma temática que conta com bastantes estudos com o desígnio de caracterizar a droga de abuso, bem como os seus metabolitos, testando e reportando os seus efeitos e potencial de toxicidade. No entanto, por vezes, existem limitações nos estudos, não havendo uma verdadeira e exacta reprodução do ambiente *in vivo*. Os modelos de estudos *in vitro* preconizados para esta droga, até então, raramente tinham em linha de conta a co-exposição entre MDMA, compostos relacionados e os respectivos metabolitos, isto é, não contemplavam a mistura entre todos estes compostos, factor que parece crucial na avaliação

da toxicidade das substâncias no organismo, uma vez que só assim nos aproximamos das condições presentes *in vivo*, permitindo uma avaliação mais rigorosa. Neste sentido, começam a surgir os primeiros estudos que reflectem essa preocupação. Em 2013, foi levado a cabo um estudo com o objectivo de avaliar a neurotoxicidade da MDMA e seus metabolitos, isoladamente e em conjunto, em células humanas, não se tendo observado quaisquer efeitos tóxicos para nenhum dos compostos testados isoladamente, sendo, no entanto, comprovada a neurotoxicidade quando as células humanas foram expostas simultaneamente a todos os compostos: disfunção mitocondrial acompanhada de morte celular. Os resultados sugerem que a mistura de MDMA e dos seus metabolitos, em baixas concentrações conforme condições fisiológicas, induz toxicidade nas células humanas testadas (Barbosa et al., 2013).

1.2. Serotonina (5-HT)

Antes de ser identificada, designou-se por serotonina uma substância vasoconstrictora encontrada no soro, após coagulação do sangue e que se verificou ser libertada a partir do coágulo.

Em 1948 esta substância foi quimicamente identificada como 5-hidroxitriptamina (5-HT), demonstrando-se ser produzida a partir das plaquetas. Mais tarde foi encontrada no tracto intestinal, a nível das células enterocromafins, e no Sistema Nervoso Central (SNC), verificando tratar-se de uma substância neurotransmissora de elevada importância, mas também uma hormona local a nível gastrointestinal e no sistema vascular periférico (Rang et al., 2003).

A 5-HT é uma monoamina sintetizada, nos sistemas biológicos, a partir do aminoácido L-triptofano, proveniente da dieta, que é convertido, pela triptofano hidroxilase, em 5-hidroxitriptofano, que por sua vez sofre descarboxilação, passando a 5-hidroxitriptamina (5-HT). Após o processo de biossíntese, a 5-HT pode ser armazenada ou ser metabolizada através da monoaminoxidase (MAO), formando-se ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), eliminado na urina. O armazenamento da 5-HT é feito através de um mecanismo de captação de que as plaquetas e os neurónios dispõem – SERT – transportador activo de serotonina. A nível da circulação intestinal, onde a concentração de 5-HT é elevada, as plaquetas em circulação captam o neurotransmissor, ficando o neurotransmissor

concentrado em vesículas, podendo então ser libertado aquando da agregação plaquetar, em situações de lesão tecidual.

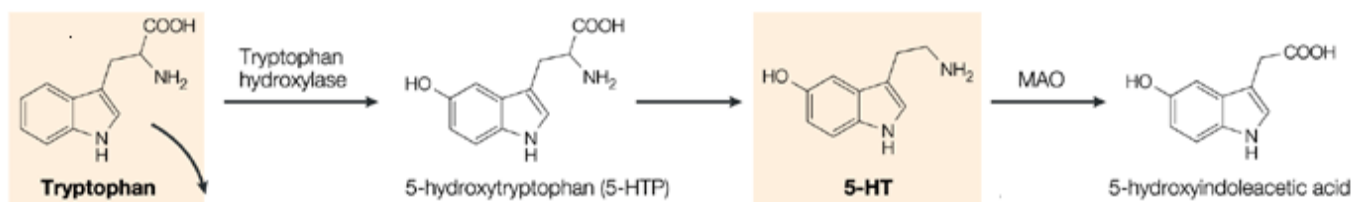


Figura 5 – Biossíntese da 5-HT. Fonte: Nature Reviews – Drug Discovery.

1.2.1. Funções e efeitos da Serotonina

A 5-HT exerce uma multiplicidade de efeitos fisiológicos complexos, dos quais se destacam o aumento da motilidade gastrointestinal, a constrição ou dilatação da musculatura e, portanto dos vasos sanguíneos, dependendo do tipo de vaso e dos receptores envolvidos, a agregação plaquetar, a estimulação das terminações nervosas nociceptivas, a acção excitatória ou inibitória de neurónios a nível do SNC, estando ainda associada a importantes centros de controlo do organismo, que regulam funções como o sono, o apetite, a aprendizagem ou a memória. Está ainda provado que tem um papel crucial na depressão, na doença bipolar e ansiedade, influenciando também a sexualidade.

1.2.1.1. Efeitos fisiopatológicos da Serotonina

A estimulação da agregação plaquetar, a partir da activação do subtipo de receptores 5-HT_{2A} (De Clerck et al., 1984), origina a acumulação de plaquetas no vaso e consequente aumento da libertação de 5-HT. Assim, caso não exista qualquer lesão tecidual, a 5-HT proveniente dessas plaquetas provoca vasodilatação, mantendo-se o normal fluxo sanguíneo; existindo lesão endotelial, a 5-HT causa vasoconstrição, comprometendo o fluxo sanguíneo.

A nível cardiovascular, os efeitos patogénicos da 5-HT estão relacionados com a libertação deste neurotransmissor a partir das células sanguíneas, as plaquetas, o que pode produzir trombos, espasmo vascular, mitogénese e proliferação das células do músculo liso vascular.

O endocárdio protege o miocárdio por prevenção da agregação plaquetar, mas quando o endocárdio é lesado, a secreção de serotonina é facilitada e pode exercer efeitos perigosos nas células do miocárdio (Shah et al., 1989).

Segundo a literatura, os níveis plasmáticos de serotonina libertados das células enterocromafins também parecem estar mais elevados em doentes com insuficiência cardíaca congestiva (Chandra et al., 1994).

Também mutações genéticas e polimorfismos estão descritos como estando na origem de algumas patologias. Alterações no polimorfismo do transportador da 5-HT (SERT) estão associadas a elevado risco de enfarte do miocárdio (Fumeron et al., 2002). Uma baixa expressão do transportador da 5-HT nas plaquetas, reduz a captação de serotonina e consequentemente, haverá menos 5-HT disponível para ser libertada, reduzindo o risco de agregação plaquetar, trombos e espasmo vascular. Antidepressivos inibidores da recaptação da serotonina diminuem a quantidade de 5-HT armazenada (Hergovich et al., 2000), reduzindo a incidência de enfarte do miocárdio. Estudos em doentes com insuficiência cardíaca congestiva que também tomam aspirina, mostraram que os inibidores seletivos da recaptação da serotonina também inibem a função plaquetar (Serebruany et al., 2003).

1.2.2. Receptores da Serotonina

As funções, propriedades e efeitos fisiológicos e farmacológicos da serotonina no organismo resultam da sua interacção com uma enorme diversidade de receptores (Hoyer et al., 1994).

A complexidade das respostas fisiológicas ou fisiopatológicas produzidas pela 5-HT têm vindo a ser explicadas pela capacidade desta monoamina interagir com diferentes receptores no SNC, em receptores pré-sinápticos ou nas terminações nervosas, no músculo liso vascular e endotélio, e no tecido cardíaco.

Actualmente estão descritos 7 tipos principais de receptores, dos quais alguns são ainda subdivididos em subtipos, reconhecendo-se um total de 15 subtipos de receptores da 5-HT, divididos com base na sequência molecular, propriedades farmacológicas, transdução celular e genes (Hoyer et al. 1994).

O receptor 5-HT₃ é o único tipo de receptor da 5-HT acoplado a canais iónicos da membrana, causando directamente excitação, sem presença de um segundo mensageiro. Os restantes tipos são receptores acoplados a proteínas G reguladoras.

O subtipo de receptores 5-HT₁ apresenta cinco diferentes subtipos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}. O subtipo 5-HT_{1A} localiza-se essencialmente a nível do SNC, estando associado à transmissão neuronal, efeitos comportamentais, sono e alimentação. Já os receptores 5-HT_{1B}, para além da sua localização no SNC, estão amplamente distribuídos pelo sistema cardiovascular, tendo sido encontrados, entre as células endoteliais e as células musculares lisas de diversos vasos sanguíneos (Ullmer et al., 1995), tal como nas artérias coronárias e nas artérias pulmonares, sendo um receptor largamente implicado na vasoconstrição (Kaumann et al., 1993). No entanto, este receptor também medeia a vasodilatação a nível das artérias cerebrais (Elhousseiny & Hamel, 2001). Assim, os receptores 5-HT_{1B}, mas também os receptores 5-HT_{1D}, que medeiam a vasoconstrição cerebral, são subtipos de receptores implicados no mecanismo da enxaqueca, sendo, por isso, os seus agonistas (sumatriptano e zolmitriptano) utilizados no tratamento desta patologia, revertendo a vasodilatação (Hamel et al., 1993). O subtipo 5-HT_{1E} está presente no cérebro, mas desconhece-se a sua função. 5-HT_{1F} é outro subtipo de receptor da 5-HT identificado no cérebro e no útero (Hoyer, 2010), e que tem vindo a ser demonstrado estar também envolvido no efeito anti-enxaqueca.

O grupo de receptores 5-HT₂ está subdividido em 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}. O primeiro está presente em larga escala a nível do sistema cardiovascular, mediando a vasoconstrição (Kaumann et al., 1993), estando não só presente em tecidos periféricos (músculo liso, vasos sanguíneos, plaquetas), mas também no SNC. O 5-HT_{2B} medeia o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela 5-HT, estando o seu RNAm expresso em vasos sanguíneos cerebrais (Schmuck et al., 1996). Este receptor tem sido associado também à hipertensão pulmonar. Relativamente ao subtipo 5-HT_{2C}, distribui-se exclusivamente pelo SNC e plexo coróide (Hoyer, 2010), estando a sua acção relacionada com a secreção de líquido cefalorraquidiano.

Os receptores 5-HT₃ encontram-se dispersos a nível do SNC e do SNP, estando presente nos neurónios autónomos e sensoriais. A nível do coração, este receptor localiza-se no nervo vago aferente, mediando fenómenos de bradicardia acompanhada de hipotensão (Harris et al., 1960; Mohr et al., 1987) e angina de peito/dor anginosa (Fu & Longhurst,

2002). Estão envolvidos na êmese, motilidade gástrica e secreção intestinal, sendo os seus antagonistas utilizados na terapêutica como antieméticos (ondansetrom).

O tipo de receptores 5-HT₄ ocorre tanto no SNC, como no SNP, estando presente no tracto gastrointestinal, bexiga e coração, modulando a motilidade gástrica, peristaltismo, a secreção da mucosa intestinal. Estes receptores, a nível cardiovascular estão presentes nas aurículas (Kaumann et al., 1994; Kaumann & Sanders, 1998) e nos ventrículos (Brattelid et al., 2004), estando associados a mecanismos de cardioestimulação, podendo ser o tipo de receptor activado em arritmias (Kaumann & Sander, 1998).

Relativamente aos receptores 5-HT_{5A} pouco ainda se conhece sobre os seus efeitos, sabe-se apenas que se localizam no SNC.

Os receptores 5-HT₆ encontram-se distribuídos pelo SNC, apresentando alta afinidade para fármacos antidepressivos, não estando envolvidos na resposta cardiovascular.

O receptor 5-HT₇ foi localizado nas artérias coronárias (Barde et al., 1993) e no músculo liso vascular, podendo estar envolvido no relaxamento vascular (Ulmer et al., 1995 e Schofferet et al., 1996).

1.2.3. Receptores da Serotonina no Sistema Cardiovascular Humano

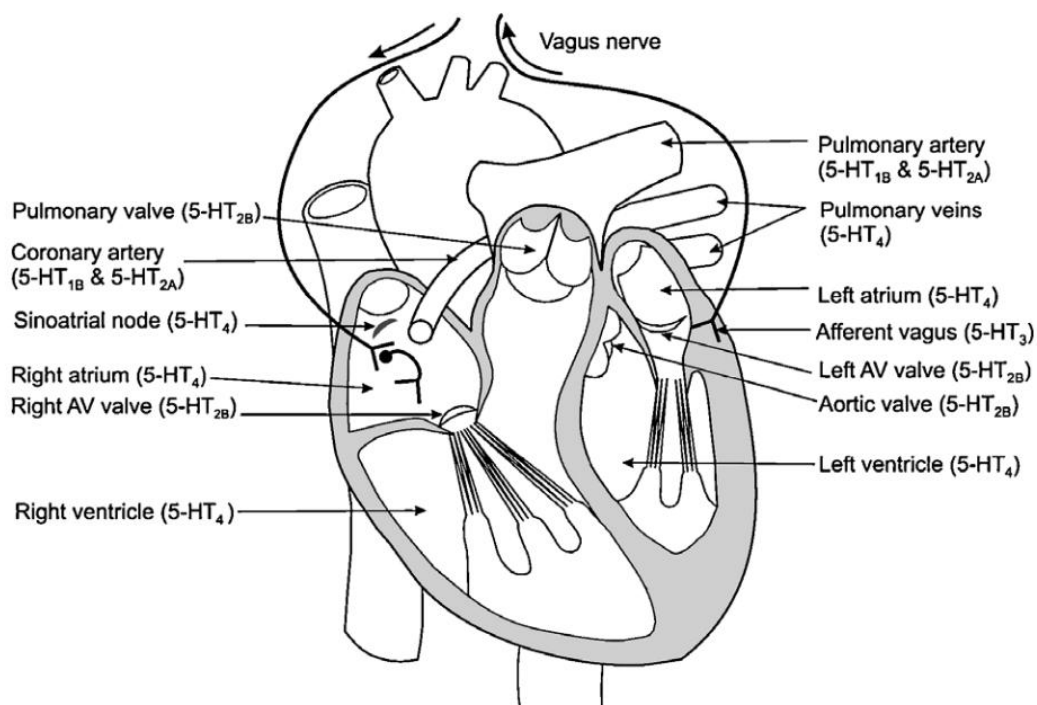


Figura 6 – Localização dos receptores 5-HT no coração humano. Retirado de Kauman et al., 2006.

O efeito fisiológico da 5-HT no Sistema Cardiovascular é conseguido através da sua acção sobre o SNC ou através da sua interacção directa com os diversos receptores, localizados nos diferentes tipos de tecidos que compõem o sistema, ou seja, a acção da 5-HT, com repercussão nos vasos sanguíneos ou nas diferentes partes do coração, depende dos receptores envolvidos e dos sinais intracelulares que estes desencadeiam (Kaumann & Levy, 2006). Assim, relativamente ao ritmo cardíaco, este tanto pode diminuir (Harris et al., 1960), como aumentar (Hollander et al., 1957; Le Mesurier et al., 1959; Parks et al., 1960), através da administração intravenosa de 5-HT.

A resposta cardiovascular vai desde a hipotensão ou hipertensão, vasodilatação ou vasoconstrição, bradicardia ou taquicardia dependendo do receptor ativado, conforme presente na Tabela I. A 5-HT é, portanto, um regulador cardiovascular (Nagatomo et al., 2004).

Receptor 5-HT	Efeito Cardiovascular	Referência
5-HT _{1A}	Hipotensão	Dreteler et al., 1990
5-HT _{1B}	Vasoconstrição; Vasodilatação arteriolar cerebral	Kaumann et al., 1993
5-HT _{2A}	Vasoconstrição Agregação Plaquetar	Kaumann et al., 1993 De Clerck et al, 1984; De Chaffoy de Courcelles et al., 1985
5-HT _{2B}	Vasodilatação Hipertensão Pulmonar	Glusa & Pertz, 2000 Launay et al., 2002
5-HT _{3A} /5-HT _{3B}	Bradicardia Reflexa/Hipotensão Dor/ Angina de Peito	Mohr et al., 1987 Fu & Longhurst, 2002

5-HT ₄	Cardioestimulação/Arritmias	Kaumann & Sanders, 1998
5-HT ₇	Relaxamento Vascular	Ullmer et al., 1995

Tabela 1 – Efeitos da activação dos diferentes subtipos de receptores da 5-HT no Sistema Caridovascular. Adaptado de Kaumann & Levy, 2006; Rang et al, 2003.

O sistema cardiovascular humano está continuamente exposto à 5-HT circulante que é libertada das plaquetas, sendo os receptores de maior relevância cardiovascular os 5-HT₁ e 5-HT₂.

Constata-se uma elevada expressão de RNAm tanto do receptor 5-HT_{1B}, como do receptor 5-HT_{2A}, em células do músculo liso da aorta humana e da artéria pulmonar (Ullmer et al., 1995). Assim, os estudos corroboram a premissa que sejam estes os receptores, de forma partilhada, que intervêm na vasoconstrição nas artérias coronárias (Kaumann & Sanders, 1993, 1994), pulmonares (Morecrft et al., 1999) nas artérias temporal e occipital (Verheggen et al., 1998; Verheggen et al., 2004). A 5-HT induz ainda contracção na artéria mesentérica humana (Kaumann & Sanders, 1993), na artéria mamária (Yildiz et al, 1996), na artéria uterina (Karlsson et al., 1997) e na artéria umbilical (Lovren et al., 1999). No entanto, a contracção arterial intracraniana é mediada apenas pelo subtipo 5-HT_{1B} (Hamel & Bouchard, 1991). No coração e no músculo esquelético, a 5-HT apresenta uma acção vasodilatadora.

A ativação do subtipo de receptores 5-HT_{2A} e também do subtipo 5-HT_{1B} nas artérias coronárias leva a contração vascular e espasmo, com produção de arritmias que podem ameaçar a vida (Kaumann & Sanders, 1993).

- **Os Receptores 5-HT_{2A}**

O subtipo de receptores 5-HT_{2A}, de elevado interesse no presente estudo, encontra-se distribuído tanto pelo SNC como na SNP. Este receptor foi detectado no córtex cerebral, hipocampo, tálamo e hipotálamo. Na periferia localiza-se nas plaquetas (De Chaffoy de Courcelles et al., 1985), no músculo liso vascular, músculo liso uterino, no músculo liso urinário e no intestino e brônquios (Hoyer, 2010).

Este receptor está associado a inúmeros processos, desde contração do músculo liso vascular (De Chaffoy de Courcelles, et al., 1985), contração do músculo liso extravascular, incluindo a contração uterina, agregação plaquetar, ansiedade e depressão. Está ainda envolvido formação de trombos, espasmo coronário arterial, aumento da permeabilidade vascular e proliferação vascular.

Dado o seu papel crucial no sistema cardiovascular e, portanto, nas patologias associadas, este subtipo de receptores tornou-se alvo de grande interesse clínico, na perspectiva do avanço farmacológico e desenvolvimento de novas terapêuticas.

Assim se explica a importância dos antagonistas dos receptores 5-HT_{2A}, como a cetanserina, já bastante estudada e clinicamente utilizada nalgumas patologias cardiovasculares. Por exemplo, em pacientes hipertensos, este antagonista dos receptores 5-HT_{2A} provoca diminuição da pressão arterial (Vanhoutte et al., 1988), tendo também sido estudado na doença vascular periférica, verificando-se que a vasoconstrição é atenuada por este antagonista (Golino et al., 1994). A nível das plaquetas, a cetanserina também bloqueia os receptores 5-HT_{2A}, antagonizando o mecanismo de agregação plaquetar, despoletado pela 5-HT.

1.3. A Artéria Mamária Interna Humana (AMIH)

A artéria mamária interna humana (AMIH) ou artéria torácica interna localiza-se no interior da parede torácica anterior e tem origem na artéria subclávia. Este vaso faz o aporte de sangue à região do peito e parede torácica anterior, ramificando-se noutros vasos de menor calibre que irrigam o diafragma e a parede abdominal. Ao longo do esterno origina as artérias intercostais anteriores, situadas entre as costelas, que vascularizam os músculos intercostais.



Figura 7 – Localização da artéria mamária interna humana no Sistema Circulatório Humano.

A AMIH ganhou relevo na comunidade médica e científica por se ter tornado no enxerto arterial de selecção na cirurgia de *bypass* coronário e revascularização do miocárdio, uma vez que a sua utilização, em detrimento de outros vasos, tem conduzido a melhores resultados clínicos a longo prazo (Lytle et al., 1985), melhorando a qualidade de vida dos pacientes, bem como aumentando a sua taxa de sobrevivência. Esta escolha está relacionada, não só mas também, com algumas características específicas desta artéria como: a baixa incidência de aterosclerose na AMIH (Sims, 1983), o que previne recidivas de complicações cardiovasculares pós cirurgia; a função endotelial da artéria é mantida após o procedimento cirúrgico; a elasticidade, que caracteriza a sua estrutura anatómica (tecido elástico abundante), retarda a obstrução a longo prazo (Van Son JAM et al., 1990) e explica a sua contractilidade. Outro aspecto importante deste conduto arterial é a sua reactividade farmacológica e contractilidade, uma vez que ela contrai em resposta a alguns agentes

vasoconstritores como a tromboxano A_2 , agonistas dos receptores adrenérgicos α , 5-HT, sendo também sensível a dilatadores específicos (antagonistas dos canais de cálcio) (He G-W et al., 1989). Assim, o enxerto recorrendo à veia safena para *bypass* de revascularização coronária tem vindo a ser substituído pelo enxerto arterial, embora esta escolha clínica tenha como base diversos factores, não apenas relacionados com o enxerto vascular. Na presente investigação a AMIH constitui o nosso conduto vascular, conforme descrito seguidamente no capítulo “Materiais e Métodos”.

Pela análise da literatura conclui-se que a 5-HT induz contracção na AMIH (Conti, et al., 1990; Godfraind, et al., 1992; Yildiz, et al., 1996). Esta resposta parece ser mediada tanto pelos receptores 5-HT_{1B}, como pelos 5-HT_{2A}, pois há dados que revelam que a AMIH é parcialmente bloqueada pela cetanserina, antagonista dos receptores 5-HT_{2A} (Conti et al., 1990), no entanto quando testada a sua capacidade contráctil com sumatriptano, agonista dos receptores 5-HT_{1B}, verifica-se que há resposta contráctil, apesar de haver alguma diminuição da contracção (Yildiz et al., 1996).

Estudos mais recentes, desenvolvidos com o objectivo de clarificar quais os subtipos de receptores da 5-HT responsáveis pela actividade contráctil da AMIH, também demonstraram que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} são os mediadores da reposta contráctil induzida pela 5-HT, na AMIH (Tanaka N et al, 2008), verificando ainda, que antagonistas destes receptores podem prevenir o espasmo vascular (Tanaka et al., 2009).

Há, portanto, dados que evidenciam e confirmam que a contracção induzida pela 5-HT na AMIH se deve à activação dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}.

1.4. A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e a Serotonina (5-HT)

A MDMA actua sobre o SNC, activando os neurónios monoaminérgicos, induzindo o aumento da libertação de serotonina (5-HT), e em menor escala, de dopamina (DA) e Noradrenalina (DA) das vesículas pré-sinápticas na fenda sináptica (Capela et al., 2009; Morgan, 2000). É, portanto um potente agonista monoaminérgico dos receptores da serotonina (Battaglia et al., 1988).

A acção desta droga sobre os Sistema Nervoso Autónomo (Sistema Nervoso Simpático e Parassimpático) é determinante nos seus efeitos cardiovasculares, sendo estes

sintomas atenuados pelo pré-tratamento com citalopram (Liechti et al., 2000), um inibidor da recaptção da serotonina, o que parece indicar o envolvimento da serotonina.

Estudos em animais demonstraram que a administração de MDMA leva a uma rápida libertação de serotonina, sendo considerada uma neurotoxina serotoninérgica (Cole & Sumnall, 2003), pode actuar em ambos os subtipos de receptores da serotonina, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (Nash et., 1994). Este agonismo para os receptores 5-HT₂ parece estar associado com os seus efeitos alucinogénios (Egan et al., 1998).

Também diversos estudos comprovam, recorrendo a antagonistas específicos, o envolvimento dos receptores 5-HT₂, nomeadamente os receptores 5-HT_{2A}, nos sintomas cardiovasculares que advém do uso da MDMA e dos seus metabolitos (Silva et al., 2008).

2. OBJECTIVOS

A MDMA (3,4 – metilendioxi-metanfetamina) transformou-se numa das drogas recreativas com maior popularidade e com largo consumo entre os jovens, nomeadamente nos adolescentes mas também em jovens adultos.

Desde os anos 80, os casos reportados de efeitos e reacções adversas a esta droga têm vindo a aumentar, estando a sua utilização associada a diversos tipos de complicações, nomeadamente cardiovasculares como arritmia, taquicardia, hipertensão, hemorragias cerebrais, falência cardíaca ou morte súbita. Há já evidência científica que demonstra que estes efeitos adversos não advêm apenas da toxicidade induzida pela molécula de MDMA, mas que poderão ser potenciados pelo efeito dos metabolitos resultantes da degradação da substância original, uma vez que estes são metabolitos activos (Carvalho et al., 2002; Carvalho et al., 2004).

Os estudos a nível da actividade e toxicidade cardiovascular da MDMA, em humanos são escassos, assim, e considerando esta temática um problema de saúde pública grave, tornou-se pretinente testar algumas hipóteses já estudadas, contribuindo também com novos dados que permitam a consolidação de conhecimentos nesta área.

O estudo do comportamento da MDMA, bem como dos seus metabolitos a nível vascular, em particular na artéria mamária interna humana, a sua via de metabolização e a sua cinética de ligação relativamente aos receptores do vaso, permitem compreender melhor os fenómenos de toxicidade destas substâncias. Assim, contribuir para o esclarecimento do mecanismo de acção subjacente e, portanto, para uma abordagem do possível processo através do qual se poderá reverter o efeito da MDMA e metabolitos, base da estratégia terapêutica contra os efeitos tóxicos da droga, será a finalidade dos trabalhos desenvolvidos.

Assim, neste contexto, estabeleceram-se os seguintes objectivos para o estudo:

- Investigar a vasoactividade da MDMA e dos metabolitos α -MeDA, N-Me- α -MeDA, 5-(GSH)- α -MeDA e 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA, sobre o sistema serotoninérgico vascular, comparando os seus efeitos na contractilidade vascular;
- Avaliar a resposta contráctil da artéria mamária interna humana à serotonina, na presença e na ausência de MDMA, a diferentes concentrações;

- Avaliar a resposta contráctil da artéria mamária interna humana à serotonina, na presença e na ausência dos metabolitos α -MeDA, N-Me- α -MeDA, 5-(GSH)- α -MeDA e 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA, a diferentes concentrações;
- Avaliar e identificar o comportamento dos metabolitos relativamente ao seu perfil de ligação aos receptores presentes na artéria mamária interna.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fármacos e Reagentes

Os fármacos utilizados no estudo foram MDMA, sintetizado pelo REQUIMTE – Departamento de Química da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e os metabolitos α -MeDA, N-Me- α -MeDA, 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e 5-(GSH)- α -MeDA, sintetizados pelo REQUIMTE - Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Todos os outros reagentes e produtos químicos usados foram adquiridos à *Reagente* 5.

3.2. Colheita das Artérias Mamárias Internas Humanas

As artérias mamárias internas humanas, cedidas pelo Centro de Cirurgia Cardioráquia do CHUC, foram colhidas a partir de pacientes sujeitos a cirurgia de *bypass* coronário, tendo a comissão de ética local aprovado o seu uso com o nº PC-388/08.

A doença coronária, principal doença cardíaca do adulto, constitui uma das maiores causas de morte nos países desenvolvidos, como Portugal. Assim, a cirurgia de *bypass* coronário ou revascularização coronária ainda é a principal intervenção cirúrgica realizada pelos centros de cirurgia cardíaca, a nível mundial.

Na doença coronária há obstrução de uma ou mais artérias coronárias, por acumulação de colesterol e outras gorduras (aterosclerose) no lúmen destes vasos, levando à diminuição do aporte de sangue ao músculo cardíaco. Assim, o procedimento cirúrgico vai permitir que o sangue contorne a área obstruída, ou seja, cria um pequeno circuito que restaura o fluxo sanguíneo da secção obstruída – anastomose (Antunes P., 2009).

- Metodologia Cirúrgica:

A exposição dos vasos para a colheita é feita através de um afastador de esterno clássico, com abertura ampla da pleura. A A.M.I. ou as A.M.I. humanas, no caso de revascularização coronária com dupla AMIH são dissecadas, juntamente com veias satélite e tecido perivascular, desde a sua origem até à bifurcação nas artérias epigástricas superior e

musculo-frénica, utilizando electrocoagulação com corrente de baixa intensidade e laqueação dos ramos, obtendo-se, assim, os condutos arteriais para utilizar como enxerto. Até à sua implantação, as artérias são submetidas a irrigação intravascular/tópica com cloridrato de papaverina – fármaco vasodilatador não específico, que actua relaxando o músculo vascular liso, diminuindo a contractilidade da artéria. Na maioria dos casos as cirurgias realizaram-se sob circulação extracorpórea e hipotermia moderada ($\approx 30^{\circ}\text{C}$), com esvaziamento do ventrículo esquerdo (Antunes et al, 1993).

Das artérias mamárias internas isoladas, as porções não necessárias na construção das anastomoses e rejeitadas no procedimento cirúrgico constituem as peças utilizadas no estudo experimental.

3.3. Protocolo Experimental

As artérias colhidas a partir de doentes com idades compreendidas entre os 38 e os 80 anos foram mantidas em solução fisiológica Krebs-Henseleit - NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl_2 , 2.5; KH_2PO_4 , 1.2; MgSO_4 , 1.2; glucose, 10; NaHCO_3 , 25mM - fria e transportadas para o laboratório num recipiente isotérmico com gelo moído para serem utilizadas no estudo. Em laboratório, foi removido das peças cirúrgicas o tecido conjuntivo envolvente, seguindo-se a segmentação dos vasos em anéis com cerca 2 a 3mm (Figura 8).

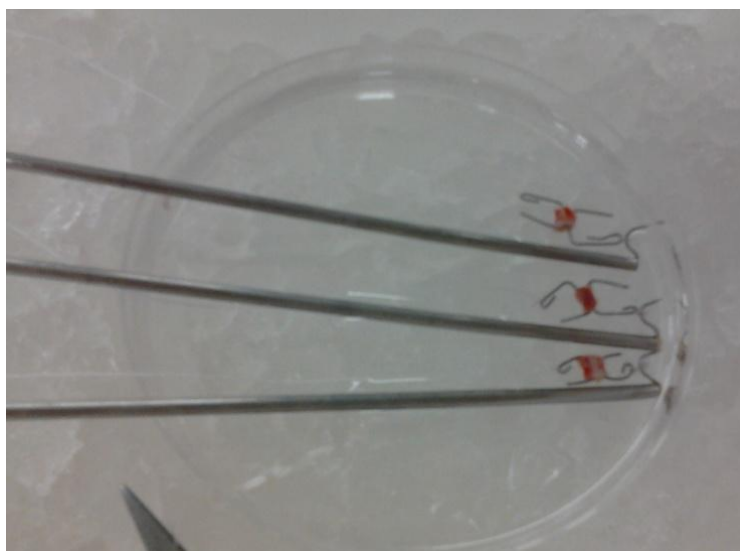


Figura 8 – Preparação dos anéis vasculares em ansas de platina.

Os anéis vasculares, suspensos entre duas ansas de platina, foram montados num banho de órgãos constituído por 10mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit, de pH 7,4, arejada com carbogénio (mistura de 95% de Oxigénio e 5% de anidrido carbónico), a uma temperatura de 37°C, controlada por termostato.

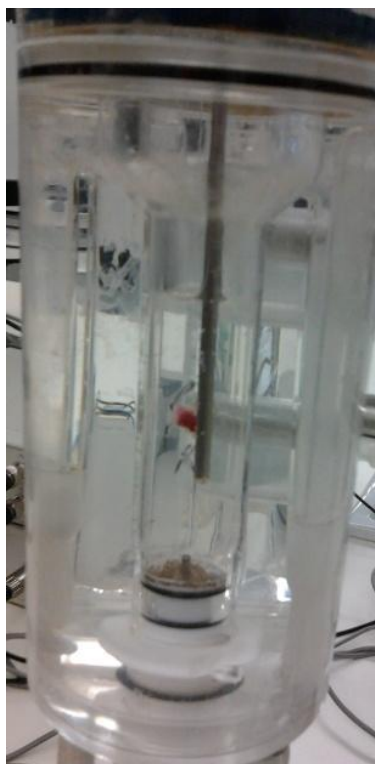


Figura 9 – Anéis vasculares suspensos em banho de órgãos.

Após um período de estabilização de 2 horas dos anéis, a uma tensão basal de 19,6 mN e de lavagens periódicas, com a finalidade de neutralizar a ação de alguns fármacos, foram medidas variações de tensão através do sistema de monitorização e registo ligado ao computador e do programa PowerLab®, possibilitando a análise e leitura dos dados.

Para testar a contratilidade das artérias e validar a experiência, após o período de estabilização, antes do início de cada experiência e no final, adicionou-se a cada banho de órgãos solução de cloreto de potássio com concentração de 60mM, registando-se essa curva.

Para avaliar a resposta contráctil da AMIH a cada um dos metabolitos e ao MDMA, foram traçadas curvas Concentração-Resposta para cada uma destas substâncias obtidas por

adições cumulativas, sendo que cada adição foi feita quando a concentração anterior atingiu o seu *plateau* (saturação dos receptores).

A influência da MDMA e dos seus metabolitos sobre a 5-HT, na AMIH foi estudado, registando curvas cumulativas concentração-resposta à 5-HT (0,1 μ M – 30 μ M), havendo em todas as experiências preparações de anéis controlo, em que apenas foi adicionada 5-HT.

Assim, após a curva ao cloreto de potássio, iniciou-se cada experiência, traçando a curva à 5-HT com concentrações crescentes, em que cada volume foi adicionado quando a concentração anterior atingiu o seu *plateau*. Seguidamente procedeu-se a lavagens sucessivas com a solução fisiológica utilizada, estabilização da tensão e incubação, durante 30 minutos, da MDMA ou de cada um dos metabolitos, (α -MeDA, N-Me- α -MeDA, 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e 5-(GSH)- α -MeDA) nas concentrações de 400, 800 e 1600 μ M e 20, 40 e 80 μ M, respectivamente, dependendo da experiência. Após incubação foram traçadas novas curvas à 5-HT.

3.4. Análise de Resultados

A tensão isométrica traduz a contractilidade provocada pela MDMA e pelos seus metabolitos sobre os vasos, sendo expressa em miliNewton (mN).

A resposta contráctil obtida pelas segundas curvas à 5-HT dos anéis arteriais incubados com os compostos estudados, bem como dos anéis controlo, foram avaliados em percentagem da contração máxima obtida na 1ª curva de concentração-resposta, do respectivo anel. Os resultados finais foram expressos relativamente à percentagem de resposta obtida para os anéis controlo.

A contração máxima registada - E_{max} - isto é, o efeito máximo, representa a actividade intrínseca de cada composto testado e pEC_{50} - logaritmo negativo da concentração molar de agonista capaz de induzir metade da resposta máxima - representa a potência que cada composto tem ao produzir uma resposta, ou seja, ao induzir contração vascular. Estes valores de pEC_{50} foram obtidos por interpolação de cada curva cumulativa concentração-resposta em escala semi-logarítmica (% da contração máxima versus logaritmo da concentração em μ M), usando o programa de computador *GraphPad Prisma 6.0*.

Através de um conjunto de testes de comparação e da análise de variância (ANOVA) avaliaram-se as diferenças estatisticamente significativas entre as respostas contrácteis induzidas por cada dose da curva concentração-resposta da substância em análise relativamente ao controlo, bem como as diferenças entre os valores de pEC_{50} determinados para cada composto. A significância estatística das diferenças entre os grupos de valores foi calculada pelo teste t de Student. Como valor indicador do intervalo de confiança (p), ou seja, como indicadores de diferenças estatisticamente significativas foram considerados valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

Todos os resultados estão apresentados como médias +/- erro padrão da média do número de experiências (n) indicado (Standard Error of the Mean - \pm S.E.M.).

4. RESULTADOS

A recolha e registo dos dados experimentais obtidos no presente estudo, parametrizados através da resposta contráctil da artéria mamária interna humana, foram monitorizados recorrendo ao Sistema/Programa PowerLab®, acoplado ao computador, permitindo depois a análise de resultados.

Conforme referido no item “Análise de Resultados”, no capítulo “Materiais e Métodos”, os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média (S.E.M.) do número de experiências (n) indicado nas figuras e/ou nas legendas. Consideraram-se os valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) como representativos de diferenças estatisticamente significativas.

4.1. Resposta contráctil da AMIH à MDMA e metabolitos a 37°C

4.1.1. Resposta contráctil da AMIH à MDMA

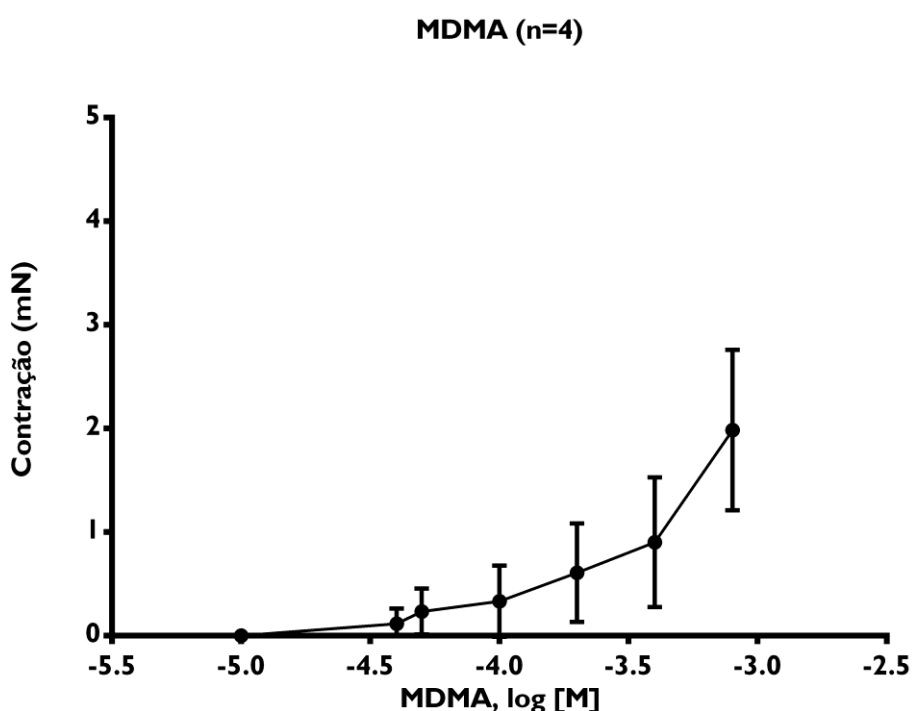


Figura 10 – Resposta contráctil da AMIH à MDMA (10-800 μ M) a 37°C. Os resultados da curva concentração-resposta ao MDMA foram expressos em valores médios \pm S.E.M. de 4 experiências (n) para MDMA. As barras verticais representam o S.E.M.

4.1.2. Resposta contráctil da AMIH à α -MeDA

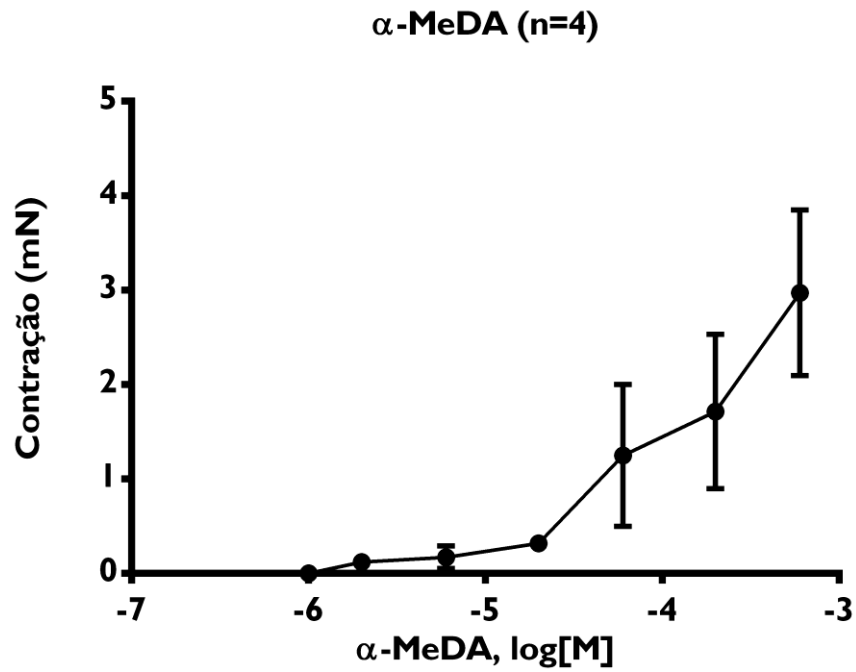


Figura 11 – Resposta contráctil da AMIH à α -MeDA (1-600 μ M) a 37°C. Os resultados da curva concentração-resposta à α -MeDA foram expressos em valores médios \pm S.E.M. de 4 experiências (n) para a α -MeDA. As barras verticais representam o S.E.M.

4.1.3. Resposta contráctil da AMIH à N-Me- α -MeDA

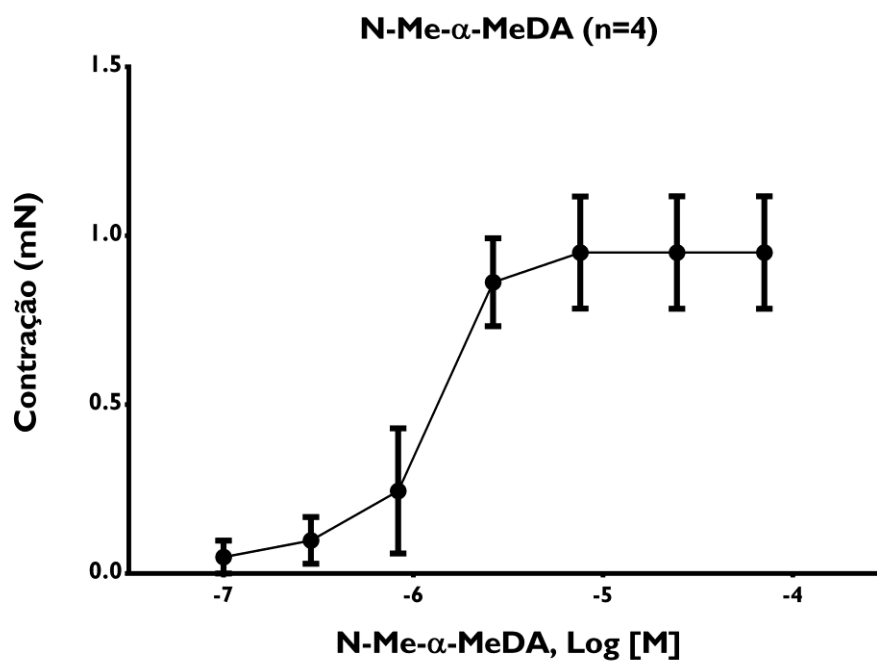


Figura 12 – Resposta contráctil da AMIH à N-Me- α -MeDA (0,1-60 μ M) a 37°C. Os resultados da curva concentração-resposta à N-Me- α -MeDA foram expressos em valores médios \pm S.E.M. de 4 experiências (n) para a N-Me- α -MeDA. As barras verticais representam o S.E.M.

- **Comparação entre Curvas Concentração-Resposta**

A tabela seguinte traduz a resposta contráctil da AIMH às substâncias estudadas: MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA, comparando os valores E_{max} e de pEC_{50} da MDMA e dos metabolitos. E_{max} representa a contracção máxima em mN de tensão e pEC_{50} representa o logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da contracção máxima. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.

Substância	E_{max} (mN)	pEC_{50}	N
MDMA	1,98 \pm 0,77	3,40 \pm 0,03	4
α -MeDA	2,97 \pm 0,87	3,72 \pm 0,43	4
N-Me- α -MeDA	0,95 \pm 0,17	5,97 \pm 0,24	4

Tabela 2 – Comparação da resposta contráctil da AMIH à MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA.

4.1.4. Resposta contráctil da AMIH à 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA

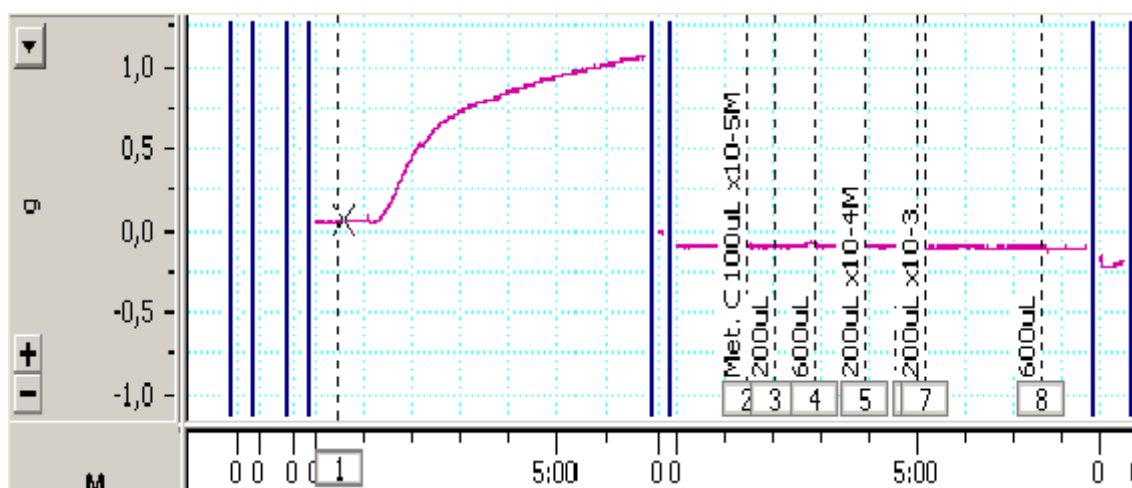


Figura 13 – Resposta contráctil da AMIH ao KCl (60mM) e da 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (0,1 μ M-60 μ M) a 37°C. A primeira curva representa a experiência que testa a contractilidade da artéria, registando-se resposta contráctil do vaso ao KCl. A adição de concentrações crescentes de 5-GSH-N-Me- α -MeDA, representada na 2ª curva, não provoca resposta contráctil no mesmo anel da AMIH.

4.1.5. Resposta contráctil da AMIH à 5-(GSH)- α -MeDA 37°C

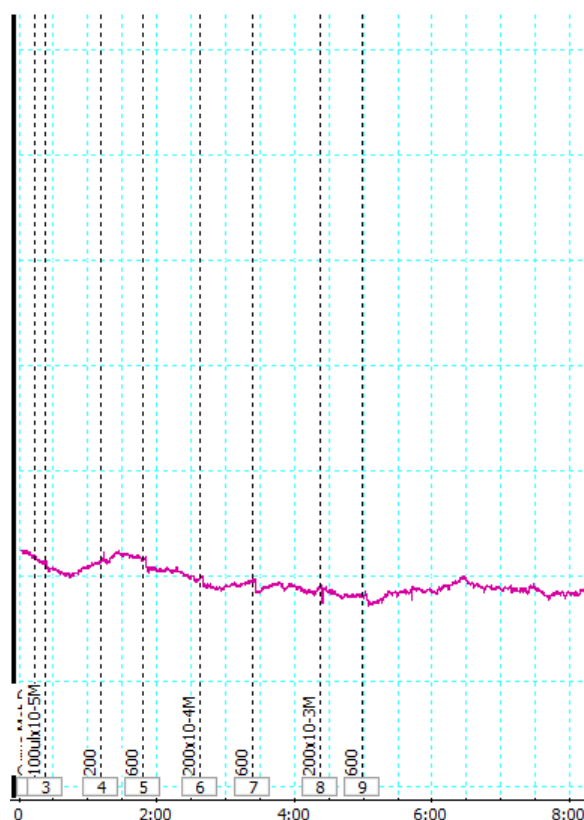


Figura 14 – Resposta contráctil da AMIH à 5-(GSH)- α -MeDA (0,1 μ M-60 μ M) a 37°C. A adição de concentrações crescentes de 5-(GSH)- α -MeDA, representada na curva, não provoca resposta contráctil significativa no mesmo anel da AMIH.

4.2. Efeito da MDMA e metabolitos na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C

Os gráficos e figuras que se seguem documentam o estudo do efeito das substâncias estudados (MDMA e metabolitos), a diferentes concentrações, sobre a curva concentração-resposta da 5-HT (controlo), na AMIH, a 37°C.

4.2.1. Efeito da MDMA (400µM, 800µM e 1600µM) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C

Os resultados são expressos em valores médios \pm S.E.M. de 26 experiências (n) para a 5-HT, de 5 (n) para MDMA 400µM, de 7 (n) para MDMA 800µM e 7 (n) para MDMA 1600µM. As barras verticais representam o S.E.M.

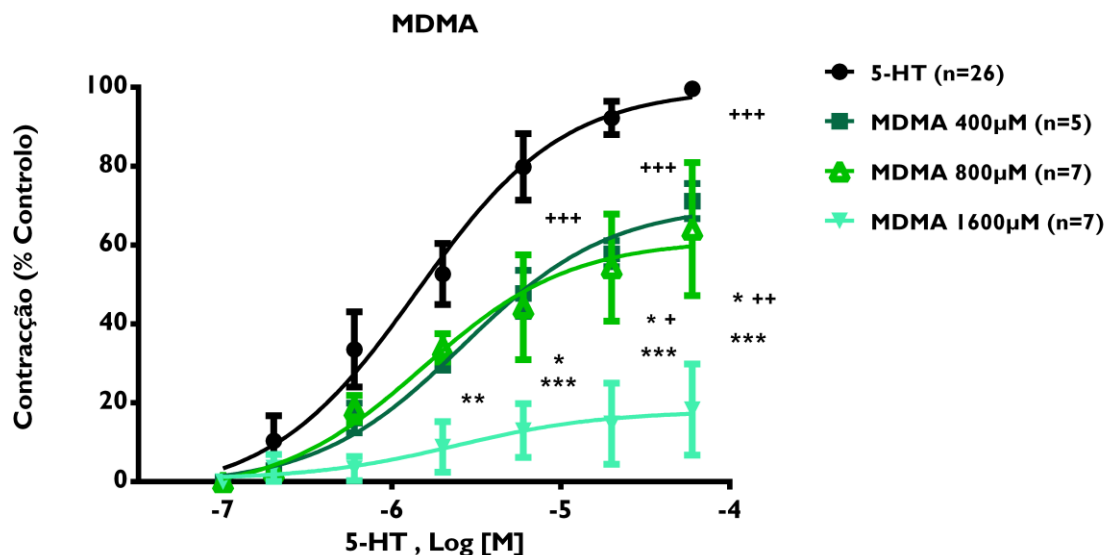


Figura 15 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com MDMA (400µM, 800µM e 1600µM) na AIMH, a 37°C.

*p <0,05 MDMA 800µM versus controlo

**p <0,01 MDMA 1600µM versus controlo

***p <0,001 MDMA 1600µM versus controlo

+p <0.05 MDMA 800µM versus MDMA 1600µM

++p <0.01 MDMA 800µM versus MDMA 1600µM

4.2.2. Efeito da α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AIMH a 37°C

Os resultados são expressos em valores médios \pm S.E.M. de 13 experiências (n) para a 5-HT, de 4 (n) para α -MeDA 20 μ M, de 4 (n) para α -MeDA 40 μ M e 5 (n) para α -MeDA 80 μ M. As barras verticais representam o S.E.M.

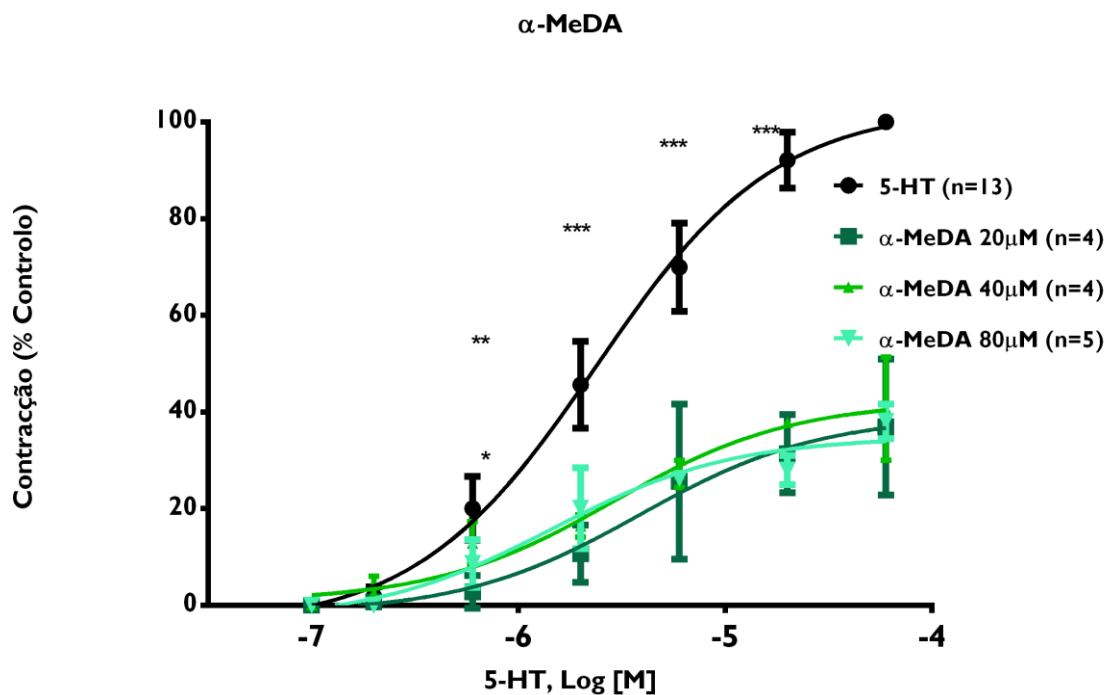


Figura 16 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C.

*** $p < 0,001$ α -MeDA 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M versus controlo

** $p < 0,01$ α -MeDA 20 μ M versus controlo

* $p < 0,05$ α -MeDA 40 μ M versus controlo

4.2.3. Efeito da N-Me- α -MeDA (80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C

Os resultados são expressos em valores médios \pm S.E.M. de 8 experiências (n) para a 5-HT, 2 (n) para N-Me- α -MeDA 20 μ M, 3 (n) N-Me- α -MeDA para 40 μ M e 3 (n) para N-Me- α -MeDA 80 μ M. As barras verticais representam o S.E.M.

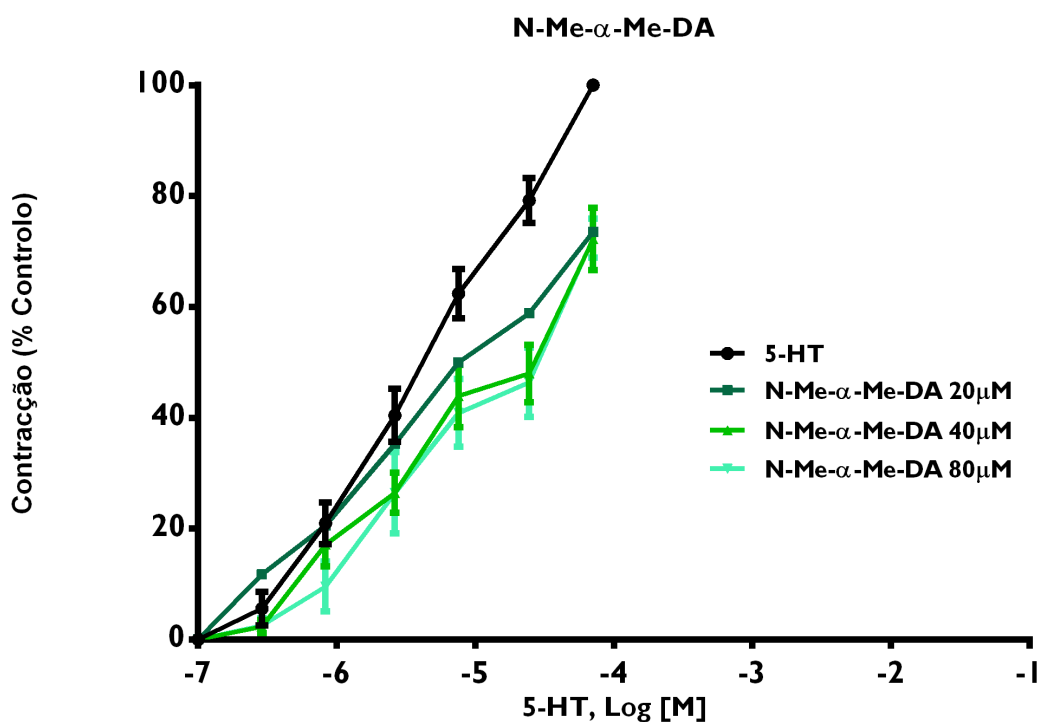


Figura 17 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C.

$p < 0,05$ N-Me- α -MeDA versus controlo

4.2.4. Efeito da 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C

Os resultados são expressos em valores médios \pm S.E.M. de 14 experiências (n) para a 5-HT, de 4 (n) para 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA 20 μ M, de 4 (n) para 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA 40 μ M e 5 (n) para 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA 80 μ M. As barras verticais representam o S.E.M.

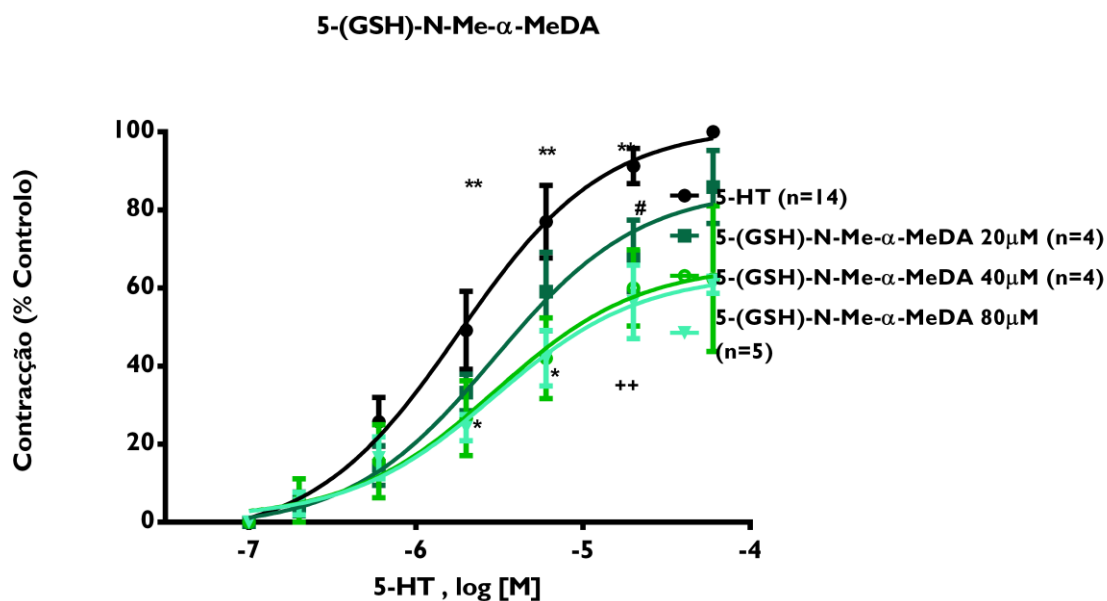


Figura 18 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C.

**p <0,01 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA 80 μ M versus controlo

*p <0,05 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA 40 μ M versus controlo

**p <0,01 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA versus controlo

#p <0,05 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA 20 μ M versus 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA 80 μ M

4.2.5. Efeito da 5-(GSH)- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na curva concentração-resposta da 5-HT na AMIH a 37°C

Os resultados são expressos em valores médios \pm S.E.M. de 10 experiências (n) para a 5-HT, de 3 (n) para 5-(GSH)- α -MeDA 20 μ M, de 3 (n) para 5-(GSH)- α -MeDA 40 μ M e 4 (n) para 5-(GSH)- α -MeDA 80 μ M. As barras verticais representam o S.E.M.

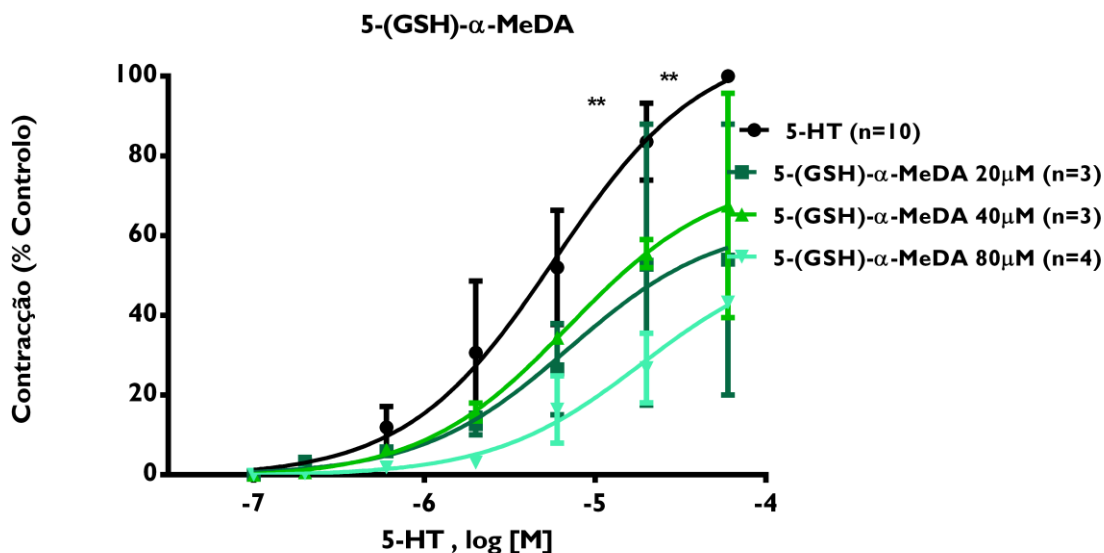


Figura 19 – Resposta contráctil à 5-HT (controlo) e efeito na curva concentração-resposta da 5-HT após incubação com 5-(GSH)- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) na AIMH, a 37°C.

**p < 0,01 5-(GSH)- α -MeDA 80 μ M versus controlo

- **Comparação de curvas concentração-resposta da 5-HT**

Na tabela seguinte comparou-se a percentagem de redução do efeito máximo obtido relativamente à curva controlo (5-HT) e pEC₅₀ (logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da contração máxima) para o MDMA, α -MeDA, N-Me- α -MeDA, 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA e 5-(GSH)- α -MeDA, nas diferentes concentrações estudadas.

Substância	Concentração (μM)	% Redução E_{max} versus controlo	$p\text{EC}_{50}$
MDMA	400	28,46%	5,57 \pm 0,10
	800	35,57%	5,81 \pm 0,12
	1600	81,35%	5,61 \pm 0,17
α -MeDA	20	63,10%	5,41 \pm 0,08
	40	59,32%	5,54 \pm 0,15
	80	61,93%	5,83 \pm 0,18
N-Me- α -MeDA	20	26,47%	5,54 \pm 0,09
	40	27,79%	5,36 \pm 0,14
	80	27,56%	5,31 \pm 0,13
5-(GSH)-N-Me- α -MeDA	20	14,10%	5,53 \pm 0,09
	40	37,60%	5,53 \pm 0,09
	80	39,20%	5,53 \pm 0,10
5-(GSH)- α -MeDA	20	46,03%	5,15 \pm 0,13
	40	32,46%	5,15 \pm 0,02
	80	56,78%	4,73 \pm 0,12

Tabela 3 – % de redução do E_{max} relativamente ao controlo e $p\text{EC}_{50}$ para o MDMA e metabolitos.

5. DISCUSSÃO

Partindo do pressuposto que um dos principais e mais importantes mecanismos de toxicidade da MDMA no organismo é a nível cardiovascular, e tendo como base o objectivo deste trabalho, o presente estudo baseou-se na avaliação e análise do efeito da MDMA e dos seus metabolitos no sistema serotoninérgico vascular, na artéria mamária interna humana.

Observando a Figura 10, verificou-se que a MDMA, de 10 μ M a 800 μ M, induziu contracções concentração-dependentes, atingindo uma contracção máxima, isto é, uma actividade intrínseca de 1,98 \pm 0,77 mN (E_{max}) de tensão. Relativamente à potência da MDMA, pEC_{50} , o valor obtido foi de 3,40 \pm 0,03.

Da análise da Figura 11, observa-se que o metabolito α -MeDA, de 1 μ M a 600 μ M, provocou contracções dependentes da concentração, obtendo-se uma actividade intrínseca de 2,97 \pm 0,87 mN (E_{max}) de tensão. O valor de pEC_{50} , ou seja, a potência do metabolito foi de 3,72 \pm 0,43, valor ligeiramente superior do que para o MDMA, ainda que a diferença seja pouco significativa.

Relativamente ao metabolito N-Me- α -MeDA (Figura 12), de 0,1 μ M a 60 μ M, produziu efeito contráctil sobre a AMIH, apresentando actividade intrínseca de 0,95 \pm 0,17 mN (E_{max}). Quanto à sua potência, pEC_{50} , o valor foi de 5,97 \pm 0,24.

Assim, fazendo uma análise comparativa, através da Tabela 2, verificou-se que há resposta contráctil, às condições do estudo, sendo que a actividade intrínseca (E_{max}), do metabolito α -MeDA é superior. Já relativamente à potência de cada uma das substâncias, (pEC_{50}), a MDMA comportou-se como o menos potente relativamente aos dois metabolitos, apesar de ter apresentado uma diferença pouco significativa em relação a α -MeDA, sugerindo-se o N-Me- α -MeDA como o metabolito com maior potência.

No entanto, há que realçar que as concentrações das soluções de MDMA e dos metabolitos estudados não foram as mesmas. Para a curva à MDMA (10 μ M-800 μ M), foram testadas doses superiores comparativamente às utilizadas quer para o metabolito α -MeDA (1 μ M-600 μ M), quer para o metabolito N-Me- α -MeDA (0,1 μ M -60 μ M), ainda assim, registaram-se valores de actividade intrínseca da α -MeDA e valores de potência dos dois metabolitos superiores, relativamente à MDMA.

Serão, então, necessárias mais experiências utilizando estas mas também concentrações iguais nas diferentes substâncias, para que seja possível interpretar com maior segurança os resultados obtidos.

Relativamente aos metabolitos 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (0,1 μ M-60 μ M) e 5-(GSH)- α -MeDA (0,1 μ M-60 μ M), os resultados mostraram ausência de resposta contráctil da artéria, ou seja, estas duas substâncias resultantes da metabolização da MDMA por conjugação com a glutatona (GSH), não apresentaram actividade intrínseca sobre os receptores presentes na AMIH (Figuras 13 e 14). Para um número muito pouco significativo de curvas, verificou-se contracção vascular mínima em algumas adições, para o metabolito 5-(GSH)- α -MeDA (Figura 14), dados estes que necessitam de confirmação com estudos posteriores.

Para avaliar, na AMIH, o efeito das substâncias estudadas e estabelecer o paralelo com o agonista total, a 5-HT, procedemos às incubações de MDMA e metabolitos a diferentes concentrações.

Assim, após as incubações de MDMA (400 μ M, 800 μ M e 1600 μ M), na AMIH, traçando a curva cumulativa à 5-HT, verificou-se um deslocamento da curva controlo da 5-HT para a direita. Realça-se, no entanto, que, para a dose mais baixa de MDMA estudada, a diminuição do efeito máximo não foi significativa, relativamente ao E_{max} do controlo, quando comparada com as doses mais elevadas de 800 μ M e 1600 μ M MDMA, cuja redução foi de 35,57% e de 81,35%, respectivamente, sendo que este valor se destaca largamente relativamente aos outros (Tabela 2).

Estes resultados indicam que em presença do agonista total, a 5-HT, a MDMA antagoniza o efeito contráctil daquele, parecendo actuar como um agonista parcial, com efeito dependente da concentração.

De acordo com os dados evidenciados na literatura, já abordado no capítulo “Introdução”, este tipo de resposta contráctil será mediada, possivelmente, pelos receptores 5-HT_{2A}: na artéria mamária interna humana, a vasoconstrição será mediada pelos receptores 5-HT₂ (Conti et al., 1990). Outros estudos experimentais demonstraram que a MDMA parece actuar no subtipo de receptores 5-HT_{2A} (Reneman et al., 2002), nomeadamente mediando o efeito contráctil, a nível da artéria mamária interna humana (Silva, et al., 2008).

A serotonina pode produzir diversos efeitos prejudiciais no organismo, conforme já discutido, dependendo do subtipo de receptor com que interage. A nível cardiovascular, a

serotonina armazenada nas plaquetas sanguíneas pode ser libertada, intervindo em processos de agregação plaquetar (De Clerck et al., 1984), havendo o risco de formação de trombos, espasmo vascular, proliferação de células do músculo liso vascular, aumento da permeabilidade vascular, entre outros. Assim, tratando-se de alguns mecanismos mediados pelo subtipo de receptor 5-HT_{2A} (De Clerck et al., 1984; De Chaffoy de Courcelles, et al., 1985) e, sendo este também o subtipo de receptor indicado como responsável pela actividade da MDMA, a toxicidade cardiovascular deste dever-se-á à replicação dos efeitos nefastos do neurotransmissor, actuando como agonista.

Analisando os resultados obtidos das incubações com o metabolito α -MeDA, o traçado da curva à 5-HT sofre um deslocamento para a direita, face à curva controlo, com diminuição significativa do efeito máximo para as três concentrações estudadas – 63,10% para 20 μ M, 59,32% para 40 μ M e 61,93% para 80 μ M.

Assim, poderemos afirmar que a α -MeDA antagoniza a resposta contráctil da AIMH à 5-HT, comportando-se como agonista parcial dos receptores da 5-HT.

À luz de conclusões de outros trabalhos (Silva, et al., 2008), também a activação do subtipo de receptores 5-HT_{2A}, tal como para a MDMA, pode estar na base desta resposta vascular.

Da análise dos resultados obtidos para as incubações realizadas com N-Me- α -MeDA (Figura 17), há um deslocamento da curva para a direita com redução do efeito máximo pouco acentuada, numa percentagem de 26,47%, 27,79% e 27,56%, para as concentrações crescentes estudadas.

O mecanismo farmacológico subjacente a acção contráctil deste metabolito poderá ser também a activação dos receptores 5-HT_{2A}. A corroborar esta hipótese, existem dados experimentais disponíveis de estudos realizados com cetanserina, antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2A}, em que é avaliada a influência desta substância em curvas dose-resposta do metabolito N-Me- α -MeDA, concluindo-se o agonismo desta última.

No entanto, será necessário dar continuidade a estes estudos para comprovar que, tal como para o MDMA, (Silva, et al., 2008), o agosnismo dos dois metabolitos já referidos se deve à activação dos receptores 5-HT_{2A}.

Das incubações realizadas com o metabolito 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA, nas concentrações de 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M, registou-se desvio da curva controlo de 5-HT para a direita, sendo que para a concentração mais baixa estudada não houve uma redução do efeito máximo significativa, quando comparada com os resultados observados para a concentração de 40 μ M e 80 μ M, para as quais obtivemos reduções de 37,60% e 39,20%, respectivamente.

Assim, resultados como os representados na Figura 13, indicam que o metabolito 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA não apresenta actividade intrínseca na AMIH, para as concentrações estudadas, isto é, não provoca activação dos receptores 5-HT_{2A}. Contudo, após a incubação com este metabolito, os resultados expressos na Figura 18, revelam um desvio da curva controlo da 5-HT para a direita com diminuição do efeito máximo para as concentrações mais elevadas, dados que levam a concluir que, apesar de não existir actividade intrínseca, há afinidade de 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA para os receptores, parecendo actuar como antagonista não competitivo.

Para o metabolito 5-(GSH)- α -MeDA, as incubações nas concentrações de 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M resultaram, graficamente, num registo aparentemente semelhante ao obtido para o metabolito anteriormente estudado, no entanto verificou-se um desvio significativo e mais acentuado da curva controlo para a direita, que se deve essencialmente à incubação de 5-(GSH)- α -MeDA a 80 μ M, à qual correspondeu uma redução do E_{max} de 56,78%, relativamente à curva de serotonina controlo.

No entanto, através da Figura 14, é notória a ausência de resposta contráctil da AMIH, o que é indicador de que este metabolito não possui actividade intrínseca, mas apenas afinidade, ocupando os receptores da serotonina e sugerindo o comportamento de uma substância antagonista não competitiva. Registou-se, ainda que num número pouco significativo de experiências, com esta substância, uma ligeira contracção vascular pouco expressiva (Figura 14).

Da metabolização do MDMA, detalhadamente abordada noutro capítulo, por acção do citocromo P450, por N-demetilação resulta a MDA e forma-se também o metabolito N-Me- α -MeDA. Por sua vez MDA sofre O-demetilação com formação da α -MeDA. Estes dois catecóis podem sofrer reacções de oxidação, originando as correspondentes o-quinonas, compostos muito reactivos que poderão dar origem a radicais semiquinonas, levando à formação de ROS e RNS, ou por outra via, podem ainda formar ligações com o DNA

e com proteínas ou conjugar com a glutatona, formando 5-(GSH)- α -MeDA e 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA, (Hiramatsu et al., 1990). Assim, segundo esta hipótese de mecanismo de metabolização, há formação de espécies altamente reactivas e compostos tóxicos, o que contribui para o aumento da toxicidade da MDMA (Carvalho et al., 2004).

MDA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA são os compostos major resultantes de metabolização do MDMA, a nível hepático (Monks et al., 2004). Através da literatura verifica-se que os metabolitos α -MeDA e N-Me- α -MeDA apresentam neurotoxicidade superior, relativamente à MDMA (Capela et al., 2006), sendo que o primeiro apresentou maior potencial de toxicidade que o segundo.

A nível cardiovascular, o efeito da MDMA pode ser indirecto, actuando na libertação dos neurotransmissores serotonina, dopamina e noradrenalina, ou também directo, actuando nas células cardíacas, conforme um estudo realizado com cardiomiócitos de rato, no qual se verificou que a formação dos metabolitos α -MeDA e N-Me- α -MeDA, a partir da MDMA, é determinante na indução da cardiotoxicidade, tendo-se apontado a N-Me- α -MeDA como o metabolito mais tóxico (Carvalho et al., 2004), tal como já foi reiterado noutros trabalhos.

No nosso estudo, de acordo com a análise feita através da Tabela 2 e 3, e corroborando a informação patente na literatura, obtivemos resultados que nos indicam que estes dois metabolitos catecóis poderão ter um potencial de toxicidade superior ao MDMA. Não podendo ser ignorado, o facto de N-Me- α -MeDA ter apresentado um valor de potência (pEC50) superior à MDMA e à α -MeDA, apesar de termos registado resultados inferiores para a sua actividade intrínseca (E_{max}). Avaliando, ainda, a inibição da curva concentração-resposta à 5-HT, conclui-se, destes dados, um efeito superior para o metabolito α -MeDA, com % de redução de E_{max} vs E_{max} (controlo) superiores às obtidas para a N-Me- α -MeDA, indicando que a α -MeDA, no nosso estudo experimental, aparenta um potencial de toxicidade superior, interferindo no mecanismo de contracção vascular. Contudo, a inibição máxima verificou-se para a concentração superior de MDMA, sendo este um valor que se destaca das % de redução obtidas para as concentrações mais baixas.

Ainda assim, para concluir sobre o potencial tóxico vascular dos dois catecóis, α -MeDA e N-Me- α -MeDA, ter-se-á que dar continuidade a este trabalho, prosseguindo com estudos experimentais, não negligenciando que α -MeDA tem provado elevado potencial tóxico em diversos trabalhos, mas que N-Me- α -MeDA é o principal metabolito plasmático em humanos (de la Torre & Farré, 2004).

Porém, com poucos estudos disponíveis a nível vascular que possamos comparar, os nossos resultados mostram, para os metabolitos conjugados de glutathione, uma resposta contráctil praticamente nula na AMIH. De referir, contudo, que as concentrações trabalhadas (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) são de uma ordem de grandeza inferior às concentrações utilizadas noutros trabalhos, por exemplo, nos estudos de neurotoxicidade (Capela et al., 2007; Capela, et al., 2006).

Relativamente aos metabolitos conjugados de glutathione, apesar de não possuírem actividade intrínseca sobre os receptores da 5-HT, conforme já discutido, os valores apresentados na Tabela 3, traduzem, principalmente no que respeita ao metabolito 5-(GSH)- α -MeDA, uma resposta que antagoniza significativamente o efeito da 5-HT em 56,78%, para a concentração mais elevada.

Concentrações superiores dos metabolitos conjugados de glutathione deverão ser testados posteriormente.

Devemos, assim ressaltar que, para conclusões e resultados mais coesos e coerentes entre si, serão necessários mais estudos relativamente ao efeito vascular e à toxicidade cardiovascular do MDMA e seus metabolitos.

6. CONCLUSÕES

Do presente estudo e de acordo com os objectivos definidos, verificou-se que:

- A MDMA (10 μ M a 800 μ M) provocou contracção dependente da concentração na artéria mamária interna humana;
- A α -MeDA (1 μ M a 600 μ M) induziu contracção dependente da concentração na artéria mamária interna humana;
- A N-Me- α -MeDA (0,1 μ M a 60 μ M) induziu contracção dependente da concentração na artéria mamária interna humana;
- MDMA, α -MeDA e N-Me- α -MeDA não registaram diferenças significativas relativamente à actividade intrínseca, parâmetro E_{max} , no entanto, N-Me- α -MeDA apresentou maior potência (pEC₅₀);
- A 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (0,1 μ M-60 μ M), nas experiências realizadas, não causou qualquer resposta contráctil na artéria mamária interna humana, ou seja, não apresentou actividade intrínseca para os receptores da artéria mamária interna humana;
- A 5-(GSH)- α -MeDA (0,1 μ M-60 μ M), nas experiências realizadas, não provocou resposta contráctil na artéria mamária interna humana, ou seja, registou-se uma actividade intrínseca não significativa;
- Após incubações de 30 minutos de MDMA (400 μ M, 800 μ M e 1600 μ M), a curva concentração-resposta de 5-HT (controlo) sofreu um deslocamento para a direita, com diminuição significativa do efeito máximo, nas duas concentrações mais elevadas; o efeito da MDMA, sugere um efeito de agonista parcial, na artéria mamária interna humana, vindo este resultado comprovar outros resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de trabalho;
- Após incubações de 30 minutos de α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M), a curva concentração-resposta de 5-HT (controlo) sofreu um deslocamento para a direita, com diminuição significativa do efeito máximo, nas três concentrações estudadas, apesar de entre elas não existirem diferenças estatisticamente significativas; o efeito da α -MeDA, sugere um efeito de agonista parcial, na artéria mamária interna humana;
- Após incubações de 30 minutos de N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M), a curva concentração-resposta de 5-HT (controlo) sofreu um deslocamento para a direita, com reduzida diminuição do efeito máximo, nas concentrações estudadas, no entanto, em presença do agonista total (5-HT), interfere com a resposta contráctil da 5-HT,

comportando-se como um agonista parcial dos seus receptores, na artéria mamária interna humana;

- O conjunto de resultados obtidos, relativamente aos metabolitos α -MeDA e N-Me- α -MeDA, converge para a hipótese destes dois metabolitos possuírem toxicidade vascular superior comparativamente ao potencial tóxico da MDMA, tendo-se verificado um efeito mais marcado à α -MeDA;
- Após incubações de 30 minutos de 5-(GSH)-N-Me- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M), a curva concentração-resposta de 5-HT (controlo) sofreu um deslocamento para a direita, com diminuição significativa do efeito máximo, nas duas concentrações mais elevadas; apesar da sua actividade intrínseca nula, demonstrou afinidade para os receptores da 5-HT, na artéria mamária interna humana, sugerindo um efeito antagonista não competitivo;
- Após incubações de 30 minutos de 5-(GSH)- α -MeDA (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M), a curva concentração-resposta de 5-HT (controlo) sofreu um deslocamento para a direita, com diminuição significativa do efeito máximo, na concentração mais elevada; apesar da sua actividade intrínseca não ser significativa, demonstrou afinidade para os receptores da 5-HT, na artéria mamária interna humana, sugerindo um efeito antagonista não competitivo.
- **Os resultados experimentais mostram o envolvimento da MDMA e dos seus metabolitos na inibição das contracções à 5-HT na artéria mamária interna humana, de forma dependente da concentração. Os efeitos vasculares verificados após a toma desta droga de abuso podem ser devidos ao mecanismo atrás referido e potenciado por alguns dos metabolitos que mostraram ter um efeito mais marcado do que o próprio MDMA.**

Este documento foi escrito segundo o Antigo Acordo Ortográfico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antunes, M.J., Franco C. (1993). Revascularização Coronária com Dupla Artéria Mamária Interna. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 437-442.

Antunes, P. (2009). Cirurgia de Revascularização Coronária – Análise de resultados e desenvolvimento de modelos de estratificação de risco. *Dissertação de Doutoramento apresentado à F.M.U.C.*

Badon, L. A., Hiks, A., Lord, K., Ogden, B. A., Meleg-Smith, S., & Varner, K. J. (2002). Changes in Cardiovascular Responsiveness and Cardiotoxicity Elicited during Binge Administration of Ecstasy. *JPET*, 302, 898-907.

Baggott, M., Heifets, B., Jones, R., & Mendelson, J. (2000). Chemical Analysis of Ecstasy Pills. *JAMA*, 284(17).

Barbosa, J.D., Capela J.P., Ferreira, M.L., Branco, P.S., Fernandes, E., Bastos M.L., Carvalho F. (2013). The mixture of "ecstasy and its metabolites is toxic to human SH-SY5Y differentiated cells at physiological relevant concentrations.

Bard, J. A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T., & Weinshank, R. L. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 268, 23422-23426.

Battaglia, G., & De Sousa, E. (1989). Pharmacologic profile of amphetamine derivatives at various brain recognition sites: selective effects of serotonergic systems. *NIDA Res Monogr*, 94, 240-258.

Battaglia, G., Yeh, S., & De Sousa, E. (1988). MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmac Biochem Behav*, 29, 269-274.

Bedford Russell, A. R., Schwartz, R. H., & Dawling, S. (1992). Accidental ingestion of 'Ecstasy' (3,4-methylenedioxymethylamphetamine). *Archives of Diseases of Childhood* 67, 1114-1115.

Bolton, J. L., Trush, M. A., T.M., P., Dryhurst, G., & Monks, T. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*, 13, 135-160.

Brattelid, T., Qvigstad, E., Lynham, J. A., Molenaar, P., Aass, H., & Geiran, O. (2004). Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 370, 157-166.

Broadley, K. (2010). The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacology & Therapeutics*, 125, 363-375.

- Brown, C., & Osterloh, J. (1987). Multiple Severe Complications From Recreational Ingestion of MDMA ('Ecstasy'). *JAMA*, 258(6), 780-781.
- Cadet, J. L., Ladenheim, B., Baum, I., Carlson, E., & Epstein, C. (1994). CuZn-superoxide dismutase (CuZnSOD) transgenic mice show resistance to the lethal effects of methylenedioxyamphetamine (MDA) and of methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res*, 655, 259-262.
- Capela, J., Macedo, C., Branco, P., Ferreira, L., Lobo, A., Fernandes, E., et al. (2007). Neurotoxicity Mechanism of Thioether Ecstasy Metabolites. *Neuroscience*, 146, 1743-1757.
- Capela, J., Meisel, A., Abreu, A., Branco, P., Ferreira, L., Lobo, A., et al. (2006). Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther*, 316, 53-61.
- Carmo, H., Brulport, M., Hermes, M., Oesch, F., Silva, R., Ferreira, L., M., et al. (2006). Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') cytotoxicity. *Pharmacogenet Genomics*, 16, 789-799.
- Carvalho, M., Carvalho, F., & Bastos, M. (2001). Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. *Arch Toxicol*, 74, 789-793.
- Carvalho, M., Hawksworth, G., Milhazes, N., Borges, F., Monks, T., Fernandes, E., et al. (2002a). Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol*, 79, 581-588.
- Carvalho, M., Hawksworth, G., Milhazes, N., Borges, F., Monks, T., Fernandes, E., et al. (2002b). Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells *Archives of Toxicology* 76, 581-588.
- Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Monteiro, M. C., et al. (2004). Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chem Res Toxicol*, 17, 623-632.
- Cerretani, D., Riezzo, I., Fiaschi, A., Centini, F., Giorgi, G., D'errico, S., et al. (2008). Cardiac oxidative stress determination and myocardial morphology after a single ecstasy (MDMA) administration in a rat model. *Int. J. Legal Med*, 122, 461-469.
- Chandra, M., Grupta, V., Johri, A., Misra, R., Kumar, A., & Gujrati, V. (1994). Serotonergic mechanisms in heart failure. *Indian Heart J*, 46, 153-156.

- Colado, M. I., Murray, T. K., & Green, A. R. (1993). 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br J Pharmacol*, *108*(3), 583-589.
- Cole, J. C., Bailey, M., Sumnall, H., Wagstaff, G., & King, L. (2002). The content of ecstasy tablets: implications for the study of their long-term effects. *Addiction*, *97*(12), 1531-1536.
- Cole, J. C., & Sumnall, H. R. (2003). Altered states: the clinical effects of Ecstasy. [doi: 10.1016/S0163-7258(03)00003-2]. *Pharmacology & Therapeutics*, *98*(1), 35-58.
- Connor, H. E., Feniuk, W., & Humphrey, P. P. A. (1989). 5-hydroxytryptamine contracts human coronary arteries predominantly via 5-HT₂ receptor activation. *Eur J Pharmacol*, *161*, 91-94.
- Conti, A., Monopoli, A., Forlani, A., Ongini, E., Antona, C., & Biglioli, R. (1990). Role of 5-HT_{2A} receptors in serotonin-induced contractions in the human mammary artery. *Eur J Pharmacol*, *176*, 207-212.
- Creighton, J., Black, D., & Hyde, C. (1991). 'Ecstasy' psychosis and flashbacks. *The British Journal of Psychiatry* *159*, 713-715
- Davison, D., & Parrot, A. (1997). Ecstasy (MDMA) in recreational users: self-reported psychological and physiological effects. *Human Psychopharmacology*, *12*, 221-226.
- De Chaffoy de Courcelles, D., Leysen, J., De Clerck, F., Van Belle, H., & Janssen, P. A. (1985). Evidence that phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin-S₂ receptor sites. *J Biol Chem*, *260*, 7603-7608.
- De Clerck, F., Xhonneux, B., Leysen, J., & Janssen, P. A. (1984). Evidence for functional 5-HT₂ receptor sites on human blood platelets. *Biochem Pharmacol*, *33*, 2807-2811.
- de La Torre, R., & Farré, M. (2004). Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. [doi: 10.1016/j.tips.2004.08.001]. *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(10), 505-508.
- de la Torre, R., Farré, M., Mathuna, B. O., Roset, P. N., Pizarro, N., Segura, M., et al. (2005). MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. *Eur J Clin Pharmacol*, *61*, 551-554.
- de La Torre, R., Farré, M., Ortuño, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P., et al. (2000). Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *49*(2), 104-109.

- Dekant, W. (2001). Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. *Toxicol Lett*, 124, 21-36.
- Dowling, G., McDonough, E., & Bost, R. (1987). 'Eve' and 'Ecstasy' A Report of Five Deaths Associated With the Use of MDEA and MDMA. *JAMA*, 257(12), 1615-1617.
- Dreteler, G. H., Wouters, W., & Saxena, P. R. (1990). Comparison of the cardiovascular effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist flesinoxan with that of 8-OH-DPAT in the rat. *Eur J Pharmacol*, 180, 339-349.
- National Institute on Drug Abuse. [Acedido a 19 de Dezembro de 2013]. Disponível em <http://www.drugabuse.gov>.
- Egan, C. T., Herrick-Davis, K., & Teitler, M. (1998). Creation of a constitutively activated state of the 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor by site-directed mutagenesis: Inverse agonist activity of antipsychotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 85-90.
- Fischer, H. S., Zernig, G., Schatz, D. S., Humpel, C., & Saria, A. (2000). MDMA ('ecstasy') enhances basal acetylcholine release in brain slices of the rat striatum. *European Journal of Neuroscience*, 12(4), 1385-1390.
- Fitzgerald, J. L., & Reid, J. J. (1994). Sympathomimetic Actions of Methylenedioxymethamphetamine in Rat and Rabbit Isolated Cardiovascular Tissues. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(10), 826-832.
- Freedman, R. R., Johanson, C. E., & Tancer, M. E. (2005). Thermoregulatory effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. *Physiopharmacology (Berl)*, 183, 248-256.
- Fu, L. W., & Longhurst, J. C. (2002). Activated platelets contribute to stimulation of cardiac afferents during ischaemia in cats: role of 5-HT₃ receptors. *J Physiol*, 544, 897-912.
- Fumeron, F., Detoulle, D., Nicaud, V., Evands, A., Kee, F., & Ruidavets, J. (2002). Serotonin transport gene polymorphism and myocardial infarction. *Circulation*, 105, 2943-2945.
- Glusa, E., & Pertz, H. (2000). Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT_{2B} receptors. *Br J Pharmacol*, 130, 692-698.
- Godfraind, T., Dessy, C., & Salomone, S. (1992). A comparison of the potency of selective L-calcium channel blockers in human coronary and internal mammary arteries exposed to serotonin. *The Journal of Pharmacology*, 263, 112-122
- Gowing, L., Henry-Edwards, S., Irvine, R., & Ali, R. (2002). The health effects of ecstasy: a literature review. *Drug and Alcohol Review*, 21(1), 53-63.

- Green, A., Cross, A. J., & Goodwin, G. M. (1995). Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy"). *Psychopharmacology*, 119, 247-260.
- Green, A., Mehan, A., Elliott, J., O'Shea, E., & Colado, M. (2003). The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacological Reviews* 55, 463-508.
- Greer, G., & Strassman, R. (1985). Information on "Ecstasy". *The American Journal of Psychiatry*, 142(11), 1391.
- Grinspoon, L., & Bakalar, J. (1986). Can drugs be used to enhance the psychotherapeutic process? *American Journal of Psychotherapy*, 40(3), 393-404.
- Grob, C. S., Poland, R. E., Chang, L., & Ernst, T. (1996). Psychobiologic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans: methodological considerations and preliminary observations. *Behav Brain Res*, 73, 103-107.
- Gudelsky, G., & Nash, J. (1996). Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *Journal Neurochem*, 66, 243-249.
- Gudelsky, G., & Yamamoto, B. (2008). Actions of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 90(2), 198-207.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59, 1609-1623.
- Hammersley, R., Ditton, J., Smith, I., & Short, E. (1999). Patterns of ecstasy use by drug users. *Br J Crimin*, 39(4), 625-647.
- Harris, P., Fritts, H. W., & Cournand, A. (1960). Some circulatory effects of 5-hydroxytryptamine in man. *Circulation*, 21, 1134-1139.
- He, G. W. Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Grafting: Biological, Characteristics, Functional, Classification and Clinical Choice. *The Society of Thoracic Surgeons*, 277-284.
- He, G. W., Rosenfeldt, F. L., Buxton, B. F., & Angus, J. A. (1989). Reactivity of human isolated internal mammary artery to constrictor and dilator agents. Implications for treatment of internal mammary artery spasm. *Circulation*, 80, 141-150.

- Helmlin, H., Bracher, K., Bourquin, D., Vonlanthen, D., & Brenneisen, R. (1996). "Analysis of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS". *Anal Toxicol.*, 20(6), 432-440.
- Henry, J. A., Jeffreys, K. J., & Dawling, S. (1992). Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxyamphetamine ("ecstasy"). [doi: 10.1016/0140-6736(92)91469-O]. *The Lancet*, 340(8816), 384-387.
- Hergovich, N., Aigner, M., Eichler, H. G., Entlicher, J., Drucker, C., & Jilma, B. (2000). Paroxetine decreases platelet serotonin storage and platelet function in human beings. *Clin Pharmacol Ther*, 68, 435-442.
- Hoyer, D. (Ed.) (2010) Encyclopedia of Life Science.
- Huether, G., Zhou, D., & R  ther, E. (1997). Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its congeners *Journal of Neural Transmission* 104, 771-794.
- Iravani, M., Asari, D., Patel, J., Wiczorek, J., & Kruk, L. (2000). Direct effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) on serotonin or dopamine release and uptake in the caudate putamen, nucleus accumbens, substantia nigra pars reticulata, and the dorsal raphe nucleus slices. *Synapse*, 36, 275-285.
- IDT - Instituto da Droga e da Toxicodependência, I.P. (2011). Relatório anual - 2011. *A Situa  o do País em Matéria de Drogas e Toxicodepend  ncias. Tendência por drogas - Ecstasy.*
- Jones, D., Duvauchelle, C., Ikegami, A., Olsen, M., Lau S., de la Torre R., Monks, T.J. (2005). Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *The Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 313, 422-431.
- Kalant H. (2001). The Pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *Canadian Medical Association*, 917-928.
- Karlsson, C., Bodelsson, G., Bodelsson, M., & Stjernquist, M. (1997). 5-hydroxytryptamine contracts human uterine artery smooth muscle predominantly via 5-HT₂ receptors. *Human Reproduction*, 12, 361-367.
- Katzung, B., Masters, S., Trevor, A. Basic and Clinical Pharmacology. Mcgraw-hill (2009), 11th Edition, 279-284.
- Kaumann, A., J., Parsons, A., Brown, A. (1993). Human arterial constrictor serotonin receptors. *Cardiovascular Research*, 27, 2094-2103.

- Kaumann, A. J., & Sanders, L. (1993). Both β_1 - and β_2 -adrenoceptors mediate catecholamine-evoked arrhythmias in isolated human atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 349, 331-337.
- Kaumann, A. J., & Sanders, L. (1998). 5-hydroxytryptamine and human heart function: the role of 5-HT₄ receptors. In R.M. Eglen (Ed), *5-HT₄ receptors in the Brain and Periphery*. Heidelberg: Springer.
- Kil, H., Zhang, J., & Piantadosi, L. A. (1996). Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16, 100-106.
- Koch, S., & Galloway, M. (1997). MDMA-induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. *J Neural Transm* 104, 135-143.
- Le Mesurier, D. H., Schwartz, C. J., & Whelan, R. F. (1959). Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *Br J Pharmacol*, 14, 246-255.
- Lester, S. J., Baggott, M., & Welm, S. (2000). Cardiovascular effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a double-blind, placebo-controlled trial. [doi: 10.1016/S1062-1458(01)00227-6]. *ACC Current Journal Review*, 10(3), 15.
- Levi, G., & Raiteri, M. T. (1993). Carrier mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci* 16, 415-419.
- Liechti, M., Baumann, C., Gamma, A., & Vollenweider, F. (2000). Acute psychological effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA,"Ecstasy") are attenuated by the serotonin uptake inhibitor citalopram. *Neuropsychopharmacology*, 22, 513-521.
- Liechti, M. E., Gamma, A., & Vollenweider, F. X. (2001). Gender differences in the subjective effects of MDMA *Psychopharmacology*, 154, 161-168.
- Lim, H. K., & Foltz, R. L. (1988). In vivo and in vitro metabolism of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification of metabolites using an ion trap detector. *Chem Res Toxicol*, 1, 370-378.
- Lovren, F., Li, X. F., Lytton, J., & Triggle, C. (1999). Functional characterization and mRNA expression of 5-HT receptors mediating contractions in human umbilical artery. *Br J Pharmacol*, 127, 1247-1255.
- Lyles, J., & Cadet, J. L. (2003). Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res Rev*, 42, 155-168.
- MacLean, M. R., & Dempsey, Y. (2009). Serotonin and pulmonary hypertension--from bench to bedside? *Curr Opin Pharmacol.* , 9(3), 281-286.

- Malberg, J. E., Sabol, K. E., & Seiden, L. S. (1966). Coadministration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 278, 258-267.
- Mangado, E. O. (2002). Drogas de diseño. *Med Clin (Barc)*, 119, 375-376.
- Mas, M., Farré, M., De La Torre, R., Roset, P., Ortuño, J., Segura, J., et al. (1999). Cardiovascular and Neuroendocrine Effects and Pharmacokinetics of 3,4-Methylenedioxyamphetamine in Humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290, 136-145.
- McCall, R. B., & Clement, M. E. (1994). Role of serotonin1A and serotonin2 receptors in the central regulation of the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev*, 46, 231-243.
- McCann, U., Slate, S., & Ricaurte, G. (1996). Adverse reactions with 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA; 'ecstasy'). *Drug safety: an international journal of medical toxicology and drug experience*, 15(2), 107-115.
- McGuire, P., Cope, H., & Fahy, T. (1994). Diversity of psychopathology associated with use of 3,4-methylenedioxyamphetamine ('Ecstasy'). *The British Journal of Psychiatry*, 165, 391-395.
- McGuire, P., & Fahy, T. (1991). Chronic paranoid psychosis after misuse of MDMA ("ecstasy"). *BMJ*, 302.
- Mechan, A., Esteban, B., O'Shea, E., Elliott, J., Colado, M., & Green, A. (2002). The pharmacology of the acute hyperthermic responses that follows administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") in rats. *Br J Pharmacol*, 135, 170-180.
- Miller, R. T., Lau, S. S., & Monks, T. J. (1997). 2,5-bis(Glutathion-S-yl)-a-methyldopamine, a putative metabolite of (+/-)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. *Eur J Pharmacol Exp Ther*, 323, 173-180.
- Milroy, C., Clark, J., & Forrest, A. (1996). Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *Journal of Clinical Pathology*, 49, 149-153.
- Mohr, B., Bom, A. H., Kaumann, A. J., & Thamer, V. (1987). Reflex inhibition of efferent renal sympathetic nerve activity by 5-hydroxytryptamine and nicotine is elicited by different epicardial receptors. *Pflügers Arch*, 409, 145-151.
- Monks, T. J., Jones, D. C., Fengju, B., & Lau, S. S. (2004). The role of metabolism in 3,4-methylenedioxyamphetamine 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) toxicity. *Ther Drug Monit*, 26, 132-136.

- Monks, T. J., & Lau, S. S. (1997). Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol*, *10*, 1296-1313.
- Morgan, M. (2000). Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology*, *152*, 230-248.
- Nagatomoa, T., Rashidb, M., Muntasira, H., & Komiyamac, T. (2004). Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*, *104*(1), 59-81.
- Nash, J., Roth, B., Brodtkin, J., Nichols, D., & Gudelsky, G. (1994). Effects of the R(-) and S(+) isomers of MDA and MDMA on phosphatidyl inositol turnover in cultured cells expressing 5-HT_{2A} or 5-HT_{2C} receptors. *Neurosci Lett*, *177*, 111-115.
- Nature Reviews - Drug Discovery. [Acedido a 4 de Janeiro 2014]. Disponível em <http://www.nature.com>
- Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência. (2013). Relatório Europeu sobre Drogas 2013. *Antigos e Novos Problemas relacionados coma a droga-panorama europeu em 2013*.
- Paris, J. M., & Cunningham, K. A. (1992). Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). [doi: 10.1016/0361-9230(92)90237-R]. *Brain Research Bulletin*, *28*(1), 115-119.
- Parks, V. J., Sandison, A. G., Skinner, S. L., & Whelan, R. F. (1960). The stimulation of respiration by 5-hydroxytryptamine inman. *J Physiol*, *151*, 342-351.
- Parrott, A. (2004). Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. *Psychopharmacology*, *173*, 234-241.
- Parrott, A. C., Sisk, E., & Turner, J. J. D. (2000). Psychobiological problems in heavy 'ecstasy' (MDMA) polydrug users. [doi: 10.1016/S0376-8716(00)80013-7]. *Drug and Alcohol Dependence*, *60*(1), 105-110.
- Patel, M. M., Belson, M. G., Wright, D., Lu, H., Heninger, M., & Miller, M. A. (2005). Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-related myocardial hypertrophy: An autopsy study. *Resuscitation* *66*(2), 197-202.
- Peroutka S.J., Newman H., Harris H. (1988). Subjective effects of MDMA in rcreational users. *Neuropsychopharmacology*, *1*:273-277.
- Pizarro, N., Farre, M., Pujadas, M., Peiro, A. M., Roset, P. N., Joglar, J., et al. (2004). Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihydroxymethamphetamine). *Drug Metab Dispos*, *32*, 1001-1007.

- Ramamoorthy, Y., Yu, A. M., Suh, N., Haining, R. L., Tyndale, R. F., & Sellers, E. M. (2002). Reduced MDMA metabolism with cytochrome P450 2D6 inhibitors and pharmacogenetic variants in vitro. *Biochem Pharmacol*, 30, 2111-2119.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore P.K. Outros mediadores periféricos: 5-HT e purinas. *Farmacologia*, tradução 5ª Edição. Elsevier (2003). 209-221.
- Remião, F., Carvalho, M., Carmo, H., Carvalho, F., & Bastos, M. (2002). Cu²⁺-induced isoproterenol oxidation into isoprenochrome in adult rat calcium-tolerant cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol*, 15, 861-869.
- Reneman, L., Endert, E., Bruin, K., Lavalaye, J.(2002). The acute and chronic effects of MDMA ("Ecstasy") on cortical 5-HT_{2A} receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology*, 26, 387-396.
- Ricaurte, G., Bryan G., Strauss L., Seiden L., Schuster C. (1985). Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science*, 229, 986-988.
- Ropero-Miller, J., & Goldberger, B. (1998). Recreational drugs: Current trends in the 90s. *Clinics in Laboratory Medicine*, 18(4), 727-746.
- Schifano, F. (1991). Chronic atypical psychosis associated with MDMA ("ecstasy") abuse. [doi: 10.1016/0140-6736(91)92633-D]. *The Lancet*, 338(8778), 1335.
- Schoeffter, P., Ullmer, C., Bobirnac, I., & Lübbert, H. (1996). Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 117, 993-994.
- Scholey, A., Parrott, A., Buchanan, T., Heffernan, T., Ling, J., & Rodgers, J. (2004). Increased intensity of Ecstasy and polydrug usage in the more experienced recreational Ecstasy/MDMA users: a WWW study. *Addict Behaviors*, 29(4), 743-752.
- Screaton, G. R., Cairns, H. S., Sarner, M., Singer, M., Thrasher, A., & Cohen, S. L. (1992). Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after MDMA ("ecstasy") abuse. *Lancet*, 339, 677-678.
- Serebruany, V. L., Glassman, A. H., Malinin, A. I., Sane, D. C., Oshrine, B. R., & Ferguson, J. J. (2003). Selective serotonin reuptake inhibitors yield additional antiplatelet protection in patients with congestive heart failure treated with antecedent aspirin. *Eur J Heart Failure*, 5, 517-521.
- Shah, A. M., Andries, L. J., Meulemans, A. L., & Brutsaert, D. L. (1989). Endocardium modulates myocardial inotropic responses to 5-hydroxytryptamine *Am J Physiol*, 257, 790-797.

- Shankaran, M., & Gudelsky, G. A. (1999). A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacology*, *147*, 66-72.
- Shulgin, A. T. (1986). The background and chemistry of MDMA. *J Psychoactive Drugs*, *18*, 291-304.
- Silva, S., Carvalho, F., Fernandes, E., Teixeira, A. M., Antunes, M., & Cotrim, M. D. (2008). MDMA has a partial agonistic effect on the human internal mammary artery through 5-HT₂ receptors. *Livro de resumos da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia: XXVI Reunião de Farmacologia Clínica, VIII Reunião de Toxicologia*.
- Sprague, J. E., Mallett, N. M., Rusyniak, D. E., & Mills, E. (2003). Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and sympathetic nervous involvement in hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *J Pharmacol Exp Ther*, *305*, 159-166.
- Tanaka, N., Nakamura, E., Ohkura, M., Kuwabara, M., Yamashita, A., Onitsuka, T., et al. (2008). Both 5-HT, 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptors are involved in the vasoconstrictor response to 5-HT in the human isolated internal thoracic artery. IN THE HUMAN ISOLATED INTERNAL. *CEEP*, *35(7)*, 836-840.
- Tancer, M. E., Johanson, C. E., & Freedman, R. R. (2003). MDMA elevates core temperature in warm and cold conditions in man. Paper presented at the College on Problems of Drug Dependence Annual Conference.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H. O., & Lübbert, H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Letters*, *370*, 215-221.
- Valentine, G. (2002). MDMA and Ecstasy. *Psychiatric Times*, *19(2)*.
- Van Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact*, *129*, 61-76.
- Vanhoutte, P., Amery, A., Birkenhager, W., Breckenridge, A., Bühker, F., & Distler, A. (1988). Serotonergic mechanisms in hypertension. Focus on effects of ketanserin. *Hypertension*, *11*, 111-133.
- Verheggen, R., Hundeshagen, A. G., Brown, A. M., Schindler, M., & Kaumann, A. J. (1998). 5-HT_{1B} receptor-mediated contractions in human temporal artery: evidence from selective antagonists and 5-HT receptor mRNA expression. *Br J Pharmacol*, *124*, 1345-1354.
- Verheggen, R., Meier, A., Werner, I., Wienekamp, A., Kruschat, T., & Brattelid, T. (2004). Functional 5-HT receptors in human occipital artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, *369*, 391-401.

Winstock, A., Griffiths, P., & Stewart, D. (2001). Drugs and the dance music scene: a survey of current drug use patterns among a sample of dance music enthusiasts in the UK. *Drug and Alcohol Dependence*, 64, 9-17.

Wu, D., Otton, S. V., Inaba, T., Kalow, W., & Sellers, E. M. (1997). Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem Pharmacol*, 53, 1605-1612.

Xavier, C., Lobo, P., Fonteles, M., Vasconcelos, S., Viana, G., & Sousa, F. (2008). Ecstasy (MDMA): pharmacological and toxic effects, mechanism of action and clinical management. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 35(3), 96-103.

Yildiz, O., Cicek, S., Ay, I., Tatar, H., & Tuncer, M. (1996). 5-HT_{1-like} receptor-mediated contraction in human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol*, 28, 6-10.