UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em
Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Contribuição individual dos enantiômeros isolados da
3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) comparativamente
com a mistura racêmica no estresse oxidativo hepático, renal
e estriatal de ratos.**

Graziela Costa Bósio

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo

2011

Graziela Costa Bósio

**Contribuição individual dos enantiômeros isolados da
3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) comparativamente
com a mistura racêmica no estresse oxidativo hepático, renal
e estriatal de ratos.**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a Dr.^a Regina Lúcia de Moraes Moreau
Orientadora / Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

**A Deus,
aos meus pais Emílio e Elza,
aos meus irmãos Marco Antônio e André Luiz,
e ao meu noivo Jamil.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e graças derramadas livremente em minha vida, e por me dar oportunidade e capacidade para realizar este trabalho.

A professora doutora Regina Lúcia de Moraes Moreau, pela orientação desta dissertação, por todo seu apoio, dedicação e paciência com que me transmitiu conhecimentos científicos e profissionais, e me motivou a prosseguir.

Aos meus pais Emílio Bósio e Elza Aparecida Costa Bósio, aos meus irmãos Marco Antônio e André Luiz, e ao meu noivo Jamil Victor de Oliveira Mariúba, pelo amor e apoio incondicionais, carinho, companheirismo, compreensão, torcida, incentivo e interesse no meu trabalho, tornando esta caminhada muito mais leve e feliz.

A Polícia Civil do Estado de São Paulo e CEAP (Centro de Exames, Análises e Pesquisas) do IC (Instituto de Criminalística), por ceder, após autorização judicial, os comprimidos de *ecstasy* utilizados neste trabalho, bem como por autorizar judicialmente o transporte de cloridrato de MDMA até a cidade de São Carlos.

Ao doutor Silvio Fernandes Lapachinske, pelo apoio e aprendizado com relação à extração da MDMA dos comprimidos de *ecstasy*.

A professora doutora Quézia Bezerra Cass e ao doutorando Tiago de Campos Lourenço, pela importante colaboração na separação dos enantiômeros de MDMA.

A professora doutora Tânia Marcourakis, pelo apoio e por me receber em seu laboratório, onde realizei os ensaios de estresse oxidativo e suas padronizações; pela participação na banca de qualificação e por suas sugestões a este trabalho.

A professora doutora Sílvia Berlanga de Moraes Barros, por me receber em seu laboratório durante o preparo dos homogeneizados das amostras, pela participação na banca de qualificação e por suas sugestões a este trabalho.

A professora doutora Karin Argenti Simon-Giavarotti, pela participação na banca de qualificação e por suas sugestões a este trabalho.

A professora doutora Ana Paula de Melo Loureiro, pelo apoio e por me receber em seu laboratório, onde realizei a padronização do método para determinação de malonaldeído.

A professora doutora Inar Alves de Castro, pelo apoio e disponibilização do CLAE-fluorescência, utilizado nos ensaios para determinação de malonaldeído.

A professora doutora Irene da Silva Soares, por me receber em seu laboratório durante o preparo dos homogeneizados das amostras.

Ao professor doutor Maurício Yonamine, pela disponibilização do GC-MS.

Ao aluno de iniciação científica, Bruno Chiachia, pelo apoio cotidiano e especialmente na realização dos experimentos com animais.

Ao Biotério de Criação e Experimentação Animal do IQ/FCF, pelo fornecimento de animais, e aos seus funcionários pelo apoio e disponibilização da bomba peristáltica de perfusão.

Aos funcionários da Toxicologia, pelo apoio dispensado cotidianamente.

A Universidade de São Paulo e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por me receberem como aluna de Pós-graduação.

Ao Coseas, pela concessão do auxílio moradia.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão do auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que colaboraram diretamente ou indiretamente para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Estresse oxidativo e estresse nitrosativo.....	6
2.1.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN).....	6
2.1.2. Dano oxidativo ao DNA, lipídeos e proteínas.....	10
2.1.3. Defesas antioxidantes.....	10
2.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	13
2.1.3.2. Antioxidantes não enzimáticos.....	14
2.2. Mecanismo de ação da MDMA.....	19
2.3. Biotransformação da MDMA e metabólitos reativos.....	22
2.4. Toxicidade hepática.....	26
2.5. Toxicidade renal.....	29
2.6. Toxicidade no SNC.....	31
3. OBJETIVO.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Equipamentos e material.....	38
4.2. Solventes e reagentes.....	39
4.3. Cloridrato de MDMA na forma racêmica <i>R,S-(±)</i> - MDMA.HCl.....	39
4.4. Separação cromatográfica dos enantiômeros da <i>R,S-(±)</i> -MDMA.....	40
4.4.1. Avaliação das colunas quirais e condições cromatográficas..	40
4.4.2. Coluna semipreparativa e condições cromatográficas selecionadas.....	41
4.5. Animais.....	42
4.6. Delineamento experimental.....	42
4.7. Preparo das amostras biológicas e seus homogeneizados.....	43
4.7.1. Amostras biológicas.....	43
4.7.2. Homogeneizados.....	43
4.8. Quantificação de proteínas (método de Bradford).....	44
4.9. Determinação da atividade de glutathione- <i>S</i> -transferase (GST).....	46
4.10. Determinação de glutathione total (GSHT).....	48
4.10.1. Reagente de reciclagem.....	49
4.10.2. Construção da curva de calibração.....	49
4.10.3. Aplicação do método nas amostras biológicas.....	50
4.11. Determinação de malonaldeído (MDA).....	50
4.11.1. Curva de calibração.....	51
4.11.2. Preparo da amostra e procedimento analítico.....	51
4.11.3. Condições cromatográficas.....	53
4.12. Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS.....	54
5.1. Separação dos enantiômeros do <i>R,S-(±)</i> -MDMA.HCl.....	55
5.2. Curva de calibração para determinação de glutathione total (GSHT).....	57
5.3. Curva de calibração para determinação de malonaldeído (MDA).....	58

5.4. Efeito da MDMA e de seus enantiômeros sobre a GST, GSTH e MDA	59
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO	

RESUMO

BÓRIO, G.C. **Contribuição individual dos enantiômeros isolados da 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) comparativamente com a mistura racêmica no estresse oxidativo hepático, renal e estriatal de ratos.** 91 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, *ecstasy*), derivada da anfetamina, é uma droga largamente utilizada para fins recreacionais devido à sensação de euforia, energia e desejo de socialização. Apesar de ter a reputação de ser uma droga segura, um número crescente de relatos clínicos e estudos experimentais indica que a MDMA pode produzir toxicidade no SNC, rim, fígado e coração. Embora esteja contida nos comprimidos de *ecstasy* como racemato (uma mistura de 50% de seus enantiômeros), sua biotransformação é enantioseletiva; em ratos, o enantiômero *R* é biotransformado mais rapidamente que o *S*. Como a biotransformação de MDMA é capaz de produzir metabólitos reativos, muito provavelmente, a forma *R* tenha um maior potencial para gerar ERO/ERN e dano oxidativo nos tecidos do que a forma *S*. Nos seres humanos ocorre o inverso. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a contribuição individual de cada enantiômero da MDMA isoladamente, tendo como referência a mistura racêmica, no estresse oxidativo hepático renal e estriatal de ratos. Ratos Wistar machos adultos (180-220g) foram divididos em quatro grupos: controle (salina), MDMA racêmico, *R*-MDMA e *S*-MDMA. (2 doses consecutivas de 10 mg/kg no intervalo de 24h, gavagem). Parâmetros de estresse oxidativo serão utilizados como a medida da formação de malonaldeído, a determinação de níveis de glutathiona reduzida e a atividade da glutathiona-S-transferase. Os enantiômeros da MDMA racêmica foram separados por meio da cromatografia em fase líquida de alta eficiência em fase estacionária quiral. Os enantiômeros obtidos mostraram um alto grau de pureza e um bom rendimento. Nossos resultados mostraram que o conteúdo hepático de glutathiona total dos ratos do grupo *R,S*-MDMA e do grupo *R*-MDMA, foi significativamente menor do que os do controle e os do *S*-MDMA, revelando que é o enantiômero *R* que contribui para a depleção de glutathiona hepática induzida pela mistura racêmica. A alta reatividade do enantiômero *R* no fígado também pode ser constatada nos animais tratados apenas com *R*-MDMA, uma vez que houve uma produção significativamente aumentada de MDA, comparativamente aos outros grupos tratados e o controle. O conteúdo renal de glutathiona total foi significativamente menor para todos os grupos tratados quando comparados com o controle. Com relação ao estriado, apenas os animais tratados com o isômero *S* isoladamente mostraram uma queda significativa da atividade da GST em comparação aos demais grupos tratados e controle. Tomando todos esses dados em conjunto, esse trabalho mostrou que os enantiômeros isolados da MDMA podem atuar de formas distintas no que se refere ao estado redox, principalmente no fígado, uma vez que o isômero *R* foi o que mais contribuiu para um dano oxidativo.

Palavras chaves: MDMA, *ecstasy*, *R*-MDMA, *S*-MDMA, cromatografia semipreparativa enantioseletiva, estresse oxidativo.

ABSTRACT

BÓRIO, G.C. Individual contribution of single MDMA enantiomers of 3,4-methylenedioxymetamphetamine (MDMA) compared to racemic mixture in liver, kidney and striatal rats toxicity. 91 p. Master - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) is an amphetamine derivate that is largely used for recreational purpose due to its feeling of euphoria, energy and the desire to socialize. Although MDMA has the reputation of being safe, a growing number of clinical reports and experimental studies indicate that MDMA can produce toxicity in the CNS, kidney, liver and heart. Although MDMA is present in ecstasy tablets as a racemate (a 50% mixture of its enantiomer) it has an enantioselective metabolism; in rats, the S-enantiomer is metabolized faster than the R-enantiomer and it is the more active pharmacological form. As the MDMA biotransformation can produce reactive metabolites, probably the R form has a greater potential to generate ROS / ERN and oxidative damage in tissues than the S. In humans, the opposite occurs. Therefore, this aim of the present study was to evaluate the individual contribution of single MDMA enantiomers, compared to racemic mixture in liver, kidney and striatal rats oxidative stress. Adult male Wistar rats (180-220g) will be divided into four groups: control treatment (saline), racemic MDMA, R-MDMA and S-MDMA (two consecutive doses 24h apart with 10mg/kg, gavage). Oxidative stress status parameters will be used to measure malondialdehyde formation, the reduced glutathione levels determination and the glutathione-S-transferase activity. The enantiomers of racemic MDMA were separated by liquid chromatography high-efficiency chiral stationary phase. The enantiomers showed a high degree of purity and a good recovery. Our results showed that the total glutathione content in liver of rats in R,S-MDMA and R-MDMA group was significantly lower than the control and S-MDMA, revealing that the R-enantiomer that contributes to hepatic glutathione depletion induced by the racemic mixture. The high reactivity of the R enantiomer in the liver can also be observed in animals treated with R-MMDA, since there was a significantly increased production of MDA, compared with other treated and control groups. The total glutathione content in kidney was significantly lower for all treated groups compared with control. With respect to the striatum, only animals treated with the S isomer alone showed a significant decrease in GST activity compared to other treatment and control groups. Taking all these data together, this study shows that the isolated enantiomers of MDMA can act differently with regard to the redox state, mainly in the liver, since the R isomer was the largest contributor to oxidative damage.

Key words: MDMA, *ecstasy*, R-MDMA, S-MDMA, semipreparative enantioselective chromatography, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

α -MeDA	3,4-dihidroxianfetamina, α -metildopamina; HHA
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
5-GSH- α -MeDA	5-(glutathion-S-il)- α -metildopamina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	Serotonina
5-HT _{2A}	Receptor de serotonina do tipo 2 ^a
5-HTT	Transportador de serotonina da membrana neuronal
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
Asc-	Ascorbato
Asc•	Ânion radical semidesidroascorbato; radical ascorbila
AsCH ₂	Vitamina C; dehidroascorbato
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BHE	Barreira hematoencefálica
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina do soro bovino
CDNB	Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEAP	Centro de Exames, Análises e Pesquisas
CG-MS	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas
CID	Coagulação intravascular disseminada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CTP	Células tubulares proximais renais
CuZnSOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
CYP	Citocromo P450
CYP1A2	Citocromo P450 do tipo 1A2
CYP2B6	Citocromo P450 do tipo 2B6
CYP2C19	Citocromo P450 do tipo 2C19
CYP2D6	Citocromo P450 do tipo 2D6
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DHE	Dehidroascorbato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP-SG	Aduto 2,4 dinitro-fenil-glutathiona
DSC	Calorímetro exploratório diferencial, “ <i>differential scanning calorimetry</i> ”
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio, “ <i>endothelium-derived relaxing factor</i> ”
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético tetrassódico hidratado
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida

FeSOD	Superóxido dismutase dependente de ferro
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona; L- γ -glutamyl-L-cisteinilglicina
GSHT	Glutathiona total
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona-S-transferase
GSTNB	Aduto glutathiona-5-tio-2-nitrobenzoato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HMA	4-hidroxi-3-metoxianfetamina, 3-O-Me- α -MeDA
HMMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina, 3-O-Me-N-Me- α -MeDA
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HO $\cdot$	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HOO $\cdot$	Radical hidroperoxila
i.p.	Intraperitoneal
IC	Instituto de Criminalística
KH ₂ PO ₄	Bicarbonato de potássio
KI	Iodeto de potássio
LOOH	Hidroperóxido de lipídio
LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Malonaldeído
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDA-(TBA) ₂	Aduto malonaldeído-ácido tiobarbitúrico
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Norepinefrina
NET	Transportador de Norepinefrina
N-Me- α -MeDA	N-metil- α -metildopamina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO $\cdot$	Óxido nítrico
NO ₂ $\cdot$	Dióxido de nitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ $\cdot^-$	Radical ânion superóxido
O ₃	Ozônio
-O-CH ₂ -O-	grupamento metilenodioxi
ONOO $^-$	Peroxinitrito
R-(-)-MDMA	Enantiômero levógeno da MDMA
RNA	Ácido ribonucleico
RO $\cdot$	Radical alcóxila
ROO $\cdot$	Radical peróxila

S-(+)-MDMA	Enantiômero dextrógeno da MDMA
SERT	Transportador de Serotonina
-SH	Grupamento sulfidrila
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SSA	Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado
S-SG	Dissulfeto misto de glutathione
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TPH	Triptofano hidroxilase
VMAT	Transportador vesicular monoaminérgico
γ -GluCis	γ -glutamilcisteína
γ -GT	γ -glutamil transpeptidase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estruturas químicas da MDMA e de substâncias relacionadas.
- Figura 2 Enantiômeros da MDMA
- Figura 3 Redução tetravalente da molécula de oxigênio até a formação de água, com a formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons.
- Figura 4 Vias de formação de ERO, processo de lipoperoxidação e papel da glutathiona (GSH) e outros antioxidantes como Vit.E, Vit.C ($AsCH^{\cdot-}$) e ácido lipóico (ALA) no gerenciamento do estresse oxidativo (equações não estão balanceadas).
- Figura 5 Mecanismo de ação da MDMA no terminal nervoso serotoninérgico e na fenda sináptica.
- Figura 6 Vias metabólicas da biotransformação da MDMA.
- Figura 7 Metabolismo do conjugado da N-metil- α -metildopamina com a GSH nos rins.
- Figura 8 Fluxograma do preparo de homogeneizado de fígado, rins e estriado.
- Figura 9 Reação de CDNB com GSH utilizada para determinação da atividade de GST em 340 nm.
- Figura 10 Método de reciclagem enzimática para quantificação de GSH e/ou GSSG.
- Figura 11 Reação entre malonaldeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o aduto colorido $MDA-(TBA)_2$, detectado por CLAE-fluorescência (λ_{exc} 515 nm, λ_{em} 543 nm).
- Figura 12 Fluxograma do método proposto para determinação de malonaldeído em fígado, rim e estriado de ratos.

- Figura 13 Separação cromatográfica de *R,S*-(±)-MDMA. a) condições diluídas, b) reciclo (as linhas pontilhadas indicam as zonas coletadas).
- Figura 14 Ordem de eluição e pureza dos enantiômeros da MDMA em ciclodextrina (Hibar ChiralDex) com fase móvel metanol:tampão acetato de amônio 0,1 M em pH 6 (70:30, v:v).
- Figura 15 (A) Absorbância das concentrações iniciais de GSH no poço da microplaca (0 - 3 μM) em função do tempo; (B) Curva de calibração resultante plotada com os valores de $\Delta A/\text{min}$ versus concentrações de GSH (0,1 - 3 μM). Cada ponto é a média das medidas feitas em triplicata.
- Figura 16 Curva de calibração de MDA, equação da reta e coeficiente de correlação linear.
- Figura 17 Cromatograma típico de amostra de fígado do grupo tratado com *R,S*-(±)-MDMA e analisada conforme o método proposto para determinação de MDA.
- Figura 18 Níveis de GSHT ($\mu\text{M.g de tecido}^{-1}$), atividade de GST ($\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) e níveis de MDA ($\mu\text{M.mg de proteína}^{-1}$) em amostras de fígado, rim e estriado de ratos tratados com *R,S*-(±)-MDMA ou seus enantiômeros (*R*-(-)-MDMA ou *S*-(+)-MDMA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Tabela 2 Colunas quirais avaliadas.

Tabela 3 Fases móveis e modos de eluição avaliados.

Tabela 4 Resultados da separação dos enantiômeros de *R,S*-(±)-MDMA.

Tabela 5 Atividade de GST ($\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$), níveis de GSH total ($\mu\text{M}\cdot\text{g}$ de tecido⁻¹) e de MDA ($\mu\text{M}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹) em amostras de fígado, rim e estriado de ratos tratados com *R,S*-(±)-MDMA ou seus enantiômeros (*R*-(-)-MDMA ou *S*-(+)-MDMA). Os valores são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Ecstasy é o nome popular da 3,4-metilenodioximetanfetamina ou MDMA, considerada como o protótipo do grupo das chamadas anfetaminas alucinogênicas ou feniletilaminas. Assemelha-se estruturalmente com a metanfetamina, composto com propriedades simpatomiméticas estimulantes, diferindo-se desta apenas pela presença de um grupamento metilenodioxi ($-O-CH_2-O-$) ligado ao anel aromático, o que lhe confere propriedades psicomiméticas alucinogênicas similares às proporcionadas pela mescalina (Kalant, 2001) (Figura 1).

Figura 1 - Estruturas químicas da MDMA e de substâncias relacionadas.

Em geral, os efeitos desejados pela maioria dos usuários são produzidos com doses baixas (50 - 150 mg, conteúdo médio de MDMA por comprimido) e em episódios isolados de consumo. Os efeitos imediatos se iniciam entre 20 e 60 minutos e persistem por 3 até 5 horas (Kalant, 2001; Green *et al.*, 2003). São frequentemente relatados como: estado eufórico, sensação de bem-estar, estimulação, elevação do humor, aumento da energia e, particularmente, indução da empatia, ou seja, uma sensação de proximidade afetiva com os sentimentos e comportamento dos outros, capacidade essa que caracteriza a MDMA como “empatógena” ou “entactógena”. Associado a esses efeitos, também tem sido relatado alterações na percepção de cores, de sons e do senso de realidade; entretanto, estas alterações não são consideradas como alucinógenas típicas do LSD (dietilamida do ácido lisérgico) (de la Torre *et al.*, 2004a; Molero-Chamizo, 2005).

Devido a esses efeitos, seu consumo está basicamente ligado ao lazer, relacionado ao contexto das *raves*; isto é, festas com dança exaustiva ao som de

música eletrônica, no qual usuários buscam uma mudança para melhorar o estado emocional devido a seus efeitos conhecidos por 3 Es: energia, empatia e euforia (Hall & Henry, 2006).

Comprimidos de *ecstasy* são manufaturados em laboratórios clandestinos sob os mais variados aspectos, dimensões, cores e logos e entram no Brasil provenientes de países europeus, principalmente da Bélgica, da Alemanha e da Holanda, para serem consumidos nos grandes centros urbanos (NAÇÕES UNIDAS, 2009). A partir do ano de 1998, o município de São Paulo passou a receber as famosas *megaraves*, com número de participantes variando de 4.000 a 20.000 pessoas. Desse modo, o *ecstasy* ganhou uma rápida popularização em nosso país (Battisti *et al.*, 2006). De acordo com os dados da Polícia Federal do Brasil, foram apreendidos mais de 210.000 comprimidos de *ecstasy* em 2007, colocando o Brasil em 22º lugar no *ranking* de países com maiores apreensões no mundo (UNODC, World Drug Report 2009).

Embora no meio recreativo o *ecstasy* tenha a reputação de ser uma droga segura, um número crescente de relatos clínicos e estudos experimentais indica que a MDMA pode produzir toxicidade no SNC, rim, fígado e coração (Bai *et al.*, 1999; Campbell & Rosner, 2008; Beitia *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2004b). Apesar do número de mortes ser pequeno quando comparado com a frequência de uso, a imprevisibilidade e gravidade de efeitos advindos de seu consumo tem um impacto na saúde bastante significativo (Green *et al.*, 2003). Além do mais, o uso associado com outras drogas de abuso, como o etanol e cocaína, comum entre usuários, também pode ter um efeito sinérgico na toxicidade (Kuypers *et al.*, 2006).

Nos casos fatais, a morte é geralmente devida à hipertemia fulminante acompanhada por coagulação intravascular disseminada, hiponatremia grave seguida de edema cerebral, rabdomiólise, falência múltipla dos órgãos, insuficiência cardíaca aguda e acidente vascular cerebral (Ramcharan *et al.*, 1998; Hall & Henry, 2006).

A MDMA é um composto quiral, mas está presente nos comprimidos de *ecstasy* como racemato, ou seja, uma mistura de 50% de seus dois enantiômeros especulares: S-(+)-MDMA e R-(-)-MDMA (Figura 2). Apesar da MDMA ser consumida como racemato, sua biotransformação é enantioseletiva, sendo que o enantiômero S é biotransformado mais rapidamente que o R (Pizarro *et al.*, 2004).

Figura 2 - Enantiômeros da MDMA

As formas enantioméricas da MDMA apresentam propriedades farmacológicas distintas. O isômero S tem maior afinidade pelos transportadores de serotonina (SERT), dopamina (DAT) e noradrenalina (NET) inibindo a recaptura dessas monoaminas e revertendo a ação dos transportadores (Verrico *et al.*, 2007) enquanto que o isômero R apresenta 3 a 5 vezes mais afinidade pelos receptores serotoninérgicos centrais tipo 2A (Lyon *et al.*, 1986). Estudos têm demonstrado que o S-(+)-MDMA tem ação estimulante mais marcante no SNC que o R-(-)-MDMA (Nichols *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1986) além de contribuir mais para a degeneração serotoninérgica associada ao uso de MDMA (Schmidt *et al.*, 1987).

Fato de extrema relevância é a biotransformação da MDMA conduzir à formação de metabólitos redox-ativos, os quais produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que induzem estresse oxidativo no interior das células. Nesse sentido, vários trabalhos têm evidenciado a importância do estresse oxidativo na toxicidade no SNC (Jones *et al.*, 2005; Capela *et al.*, 2007) renal (Carvalho *et al.*, 2002b; Ninkovic *et al.*, 2008), hepática (Montiel-Duarte *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2008) e cardíaca (Shenouda *et al.*, 2008; Cerretani *et al.*, 2008) mediada pela MDMA.

Frente ao exposto e considerando que o centro estereogênico da MDMA é preservado nos principais metabólitos, é possível estimar que maiores quantidades de metabólitos reativos na forma S serão formados, o que contribuiria para um maior dano oxidativo comparativamente à forma R.

Nesse contexto, esse projeto visa avaliar a contribuição de cada um dos enantiômeros isolados de MDMA no estresse oxidativo hepático, renal e estriatal de ratos e comparar com a atuação conjunta desses enantiômeros (1:1), que é a forma como estão presentes nos comprimidos de *ecstasy*. Portanto, além do racemato, é fundamental a disponibilidade de enantiômeros puros para o desenvolvimento do presente estudo.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estresse oxidativo e estresse nitrosativo

Espécies reativas de oxigênio (ERO), como de nitrogênio (ERN) são produtos normais do metabolismo celular que estão envolvidos em funções biológicas importantes, como na fagocitose de agentes patogênicos, na sinalização intercelular e na regulação do crescimento celular. No entanto, quando a produção de ERO/ERN supera a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes na remoção das mesmas, estabelece-se uma condição conhecida como estresse oxidativo/estresse nitrosativo (Vasconcelos *et al.*, 2007; Simic *et al.*, 2008).

Quando em excesso, ERO, ERN e outras espécies reativas atuam sobre a membrana celular, bem como sobre membranas de organelas intracelulares (mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo, etc.), as quais possuem uma estrutura bilipídica e uma variedade de proteínas e açúcares. O dano celular resulta basicamente do ataque de ERO e ERN a macromoléculas, tais como açúcares (CHOH)_n, DNA, proteínas e lipídios. Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, como na indução do câncer e na propagação de HIV em pacientes soropositivos, bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças autoimunes, cardiopatias, câncer, doenças de pulmão, intoxicação por xenobióticos e outras (Vasconcelos *et al.*, 2007; Valko *et al.* 2007).

Sendo assim, o equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais das espécies reativas é de grande importância aos seres vivos, sendo alcançado por mecanismos de “regulação redox”, os quais fazem a proteção contra o estresse oxidativo (Valko *et al.* 2007).

2.1.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN)

As principais espécies reativas distribuem-se em dois grupos, radicalares e não radicalares (Tabela 1). Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contém um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais atômicos ou moleculares (Halliwell & Gutteridge, 2007). Tal particularidade lhes confere um considerável grau de reatividade,

tendendo a interagir com outras moléculas em sua proximidade, comportando-se como oxidantes (ao receber elétrons) ou redutores (ao doar elétrons) (Augusto, 2006).

Tabela 1 - Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Espécies Reativas de Oxigênio		Espécies reativas de nitrogênio	
Radicais	Não radicais	Radicais	Não radicais
$O_2^{\cdot-}$ superóxido	H_2O_2 peróxido de hidrogênio	$NO^{\cdot}$ óxido nítrico	$ONOO^-$ peroxinitrito
$HO^{\cdot}$ hidroxila	$^1O_2^*$ oxigênio singlete	$NO_2^{\cdot}$ dióxido de nitrogênio	
$HOO^{\cdot}$ hidroperoxila	O_3 ozônio		
$ROO^{\cdot}$ peroxila	$HOCl$ ácido hipocloroso		
$RO^{\cdot}$ alcoxila			

Durante o metabolismo celular aeróbio, a molécula de oxigênio sofre redução tetravalente, com ganho de quatro elétrons, resultando na formação de água (Figura 3). No decorrer desse processo são formadas espécies reativas de oxigênio, que podem ser produzidas em vários locais da célula, nomeadamente nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos lisossomas, nas membranas celulares, nos peroxissomas e no citosol (Matsubara *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007).

Figura 3 - Redução tetravalente da molécula de oxigênio até a formação de água, levando a geração de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons.

Adaptado de Ferreira et al. (2007).

Normalmente, a completa redução do oxigênio ocorre na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, onde as espécies reativas tem sua reatividade neutralizada com o recebimento dos quatro elétrons. As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q (Halliwell & Gutteridge, 2007). Entretanto, estima-se que 2 % a 5 % do oxigênio consumido durante a respiração não seja completamente reduzido à água, sendo esta uma importante fonte geradora de ERO (Augusto, 2006).

O $O_2^{\cdot -}$ também pode ser gerado pela redução do oxigênio molecular, mediada pelas enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase e durante a auto-oxidação de moléculas, tais como tióis, quinonas e catecolaminas (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Nos microsossomas, o sistema NADH-citocromo P-450-redutase/citocromo P-450 produz $O_2^{\cdot -}$ durante o metabolismo de diversos xenobióticos. As células fagocíticas também geram $O_2^{\cdot -}$ durante o *burst* oxidativo e a fagocitose, devido à ativação da NADPH oxidase presente na membrana dessas células. Dessa forma, o $O_2^{\cdot -}$ tem importância na defesa do organismo protegendo-o contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos (Barreiros *et al.*, 2006).

Apesar do $O_2^{\cdot -}$ ser um oxidante fraco e ficar normalmente restrito ao compartimento onde foi produzido (habitualmente na matriz mitocondrial) é considerado um precursor de espécies reativas mais potentes, que podem desencadear a peroxidação de lipídeos induzindo dano a macromoléculas. Dessa forma, por ser um forte agente redutor em meio aquoso, participa principalmente na síntese de ERO mais reativas como o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), por acelerar a reação de Fenton (ilustrada abaixo), reduzindo Fe^{3+} a Fe^{2+} (Reação de Haber-Weiss), bem como na produção de peroxinitrito ($ONOO^-$) devido à reação com óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) (Vasconcelos *et al.*, 2007).

O $O_2^{\cdot-}$ sofre dismutação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD), pela redução de dois elétrons da molécula de O_2 , produzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é parcialmente eliminado pela catalase, glutational peroxidase e outras peroxidases ligadas à tioredoxina (Barreiros *et al.*, 2006).

Ao contrário do $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 pode transpor facilmente membranas celulares, apresentando-se como a ERO menos reativa de sua espécie. No entanto, na presença de metais de transição, principalmente de ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+), comporta-se como um intermediário decisivo para a síntese de $HO^{\cdot}$, por meio da reação de Fenton (Ferreira *et al.*, 2007).

Outra via de produção do radical $HO^{\cdot}$ no organismo é pela homólise da água por exposição à radiação ionizante. A incidência de radiação ultravioleta, γ e X pode produzir o radical $HO^{\cdot}$ nas células da pele, originar mutações no DNA e, consequentemente, o desenvolvimento de câncer (Barreiros *et al.*, 2006).

O radical $HO^{\cdot}$ é o mais reativo e mais lesivo radical conhecido. Com tempo de meia vida ($t_{1/2}$) muito curto no organismo, de ordem de 10^{-9} segundos, tem um âmbito limitado de ação, reagindo perto de seu local de formação (Pastor *et al.*, 2000, Valko *et al.*, 2007).

Uma vez formado, o $HO^{\cdot}$ reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA, danos em proteínas, inativação enzimática e, ao abstrair um átomo de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados de membranas celulares, inicia o processo de peroxidação lipídica, com as consequentes alterações estruturais e funcionais membranares. A reação de uma ERO com outra molécula adjacente pode produzir uma ERO diferente, podendo, esta última, ser mais ou menos reativa do que a ERO inicial (Barreiros *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Com relação às espécies reativas de nitrogênio, destaca-se o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), que é produzido nos tecidos biológicos por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) a partir de arginina, oxigênio molecular e NADPH, em uma reação que envolve a transferência de cinco elétrons, gerando o aminoácido citrulina. Originalmente identificado como fator relaxante derivado do endotélio ("*endothelium-derived relaxing factor*", EDRF), o $NO^{\cdot}$ é um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial, mas também atua em

outros processos biológicos, como no relaxamento da musculatura lisa, neurotransmissão e regulação da função imune (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas da NOS, sendo duas constitutivas (cNOS), presentes nas células do tecido nervoso (nNOS ou isoforma I) e nas células endoteliais (eNOS ou isoforma III) e requerem cálcio e calmodulina como cofatores. A outra isoforma é induzida por estímulos inflamatórios como lipopolissacarídeos bacterianos e/ou citocinas (iNOS ou isoforma II) e não requer cálcio e calmodulina como cofatores (Valko *et al.*, 2007).

Células do sistema imune produzem $O_2^{\cdot-}$ e $NO^{\cdot}$ durante o *burst* oxidativo desencadeado em processos inflamatórios. O $O_2^{\cdot-}$ e $NO^{\cdot}$ reagem entre si para formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), e, adicionalmente, o $ONOO^{\cdot-}$ contribui na formação de $HO^{\cdot}$ independente da presença de metal de transição. O $ONOO^{\cdot-}$ é um potente agente oxidante, instável, com curto $t_{1/2}$ e pode causar danos a muitas moléculas biológicas, tais como DNA, proteínas e lipídios. Alternativamente, pode sofrer reações secundárias que formam agentes capazes de nitrar tocoferol, gerando 5- γ -nitrotocoferol, aminoácidos aromáticos, tal como tirosina, gerando 3-nitrotirosina e bases de DNA, em particular a guanina, gerando 8-nitroguanina. A 3-nitrotirosina e o 5- γ -nitrotocoferol constituem os biomarcadores de oxidação NO-dependentes em tecidos biológicos (Barreiros *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007).

2.1.2. Dano oxidativo ao DNA, lipídeos e proteínas

Em altas concentrações, as ERO podem ser importantes mediadoras de danos a estruturas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (Valko *et al.*, 2006). O radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) por exemplo, reage com todos os componentes da molécula de DNA, causando modificações das bases púricas como as pirimidínicas e quebra das fitas (Halliwell & Gutteridge, 2007). A lesão ao DNA mais extensivamente estudada é a formação de 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina, comumente chamado de 8-oxodGuo. A modificação permanente do material genético, resultante desses danos oxidativos incidentes, representa o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (Barreiros *et al.*, 2006).

É conhecido que a geração de ERO induzida por metais resulta em um ataque não somente ao DNA, mas também a outros componentes celulares como

os ácidos graxos poliinsaturados, que são extremamente sensíveis à oxidação, resultando no acúmulo de hidroperóxidos de lipídio (LOOH). Estes podem ser degradados na presença de íons ferro ou cobre gerando radicais alcóxila ($\text{RO}^\bullet$) e peróxila ($\text{ROO}^\bullet$). Esses radicais ($\text{RO}^\bullet$ e $\text{ROO}^\bullet$) podem danificar proteínas de membrana e também atacar outras moléculas de lipídio, propagando a peroxidação lipídica (Barbosa *et al.*, 2006). Os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação são inúmeros, sendo o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) os mais importantes (Figura 4). O MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos (especialmente lisina). Também pode reagir com bases de DNA (especialmente guanina) gerando lesões mutagênicas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Acredita-se que em níveis elevados (acima de 1 μM), o HNE atue em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos mitocondriais, inibindo a ação de chaperonas e algumas isoformas de citocromos P450 (CYP2E1 e CYP1A1), a síntese de DNA e proteínas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Também parece ser especialmente citotóxico para células neuronais, já que em alguns animais modelo, a formação de HNE precede a morte destas células (Barbosa *et al.*, 2006). Entretanto, o HNE também é um potente indutor de defesas antioxidantes.

Os mecanismos envolvidos na oxidação de proteínas por ERO foram elucidadas por estudos em que aminoácidos, peptídeos e proteínas simples foram expostos a radiações ionizantes, em condições onde são formados radicais hidroxila ou uma mistura de radicais hidroxila e superóxido (Stadtman, 2004). As cadeias laterais de todos os resíduos de aminoácidos de proteínas, em especial cisteína e metionina, são suscetíveis a oxidação pela ação de ERO/ERN (Stadtman, 2004). A oxidação de resíduos de cisteína pode levar a formação reversível de dissulfetos mistos entre grupos sulfidril (-SH) de proteína e tióis de baixo peso molecular, particularmente a glutathiona, formando o dissulfeto misto de glutathiona (S-SG), uma reação denominada glutatilação (Valko *et al.*, 2007).

A glicação não-enzimática de proteínas ou reação de Maillard geram os produtos finais de glicação avançada (AGEs). Inicia-se com a formação de uma base de Schiff instável, gerada pela condensação de um grupamento carbonila de um açúcar redutor como glicose e grupamentos amino livres de proteínas. Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos, produzindo uma cetoamina estável,

o produto de Amadori. Como essa reação não requer a participação de enzimas, as variáveis que regulam os níveis de produtos glicosilados *in vivo* são: a concentração de glicose e proteína, o $t_{1/2}$ da proteína e sua reatividade com os grupamentos amino. Os produtos de Amadori são degradados em compostos carbonílicos, os quais são muito mais reativos que os açúcares dos quais foram originados e agem como propagadores de reações com grupamentos amino de várias proteínas. Tais compostos carbonílicos originam compostos insolúveis de forma irreversível, frequentemente fluorescentes, os chamados produtos finais de glicação avançada (AGEs). A formação de AGEs ocorre vagarosamente sob condições fisiológicas e afeta predominantemente moléculas de $t_{1/2}$ longo, como o colágeno, exercendo importante função no processo de envelhecimento. No entanto, sob condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, a geração de AGEs aumenta intensamente. Além do mais, durante algumas das reações que levam a formação de AGEs, são geradas ERO, que concorrem paralelamente com o estresse oxidativo e com os danos estruturais e funcionais a macromoléculas (Barbosa *et al.*, 2008).

2.1.3. Defesas antioxidantes

O organismo desenvolve uma série de mecanismos de defesas contra a exposição de ERO e ERN no sentido de eliminar diretamente essas espécies reativas ou de reduzir o dano causado. Os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos compreendem sistemas enzimáticos e não enzimáticos e podem ser classificados em função de seu mecanismo de ação predominante (de prevenção, de intercepção e de reparação), de sua localização orgânica (intracelulares e extracelulares) e de sua proveniência (exógenos e endógenos) (Ferreira *et al.*, 2007).

2.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes: o primeiro é composto pela superóxido dismutase (SOD), o segundo pela catalase e o terceiro, pela glutathione (GSH), um tripeptídeo protéico, em conjunto com as enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) (Barreiros *et al.*, 2006).

As SOD correspondem a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem três

isoenzimas da SOD, codificadas e reguladas de forma independente: a citosólica (Cu/ZnSOD ou SOD1), a mitocondrial (MnSOD ou SOD2) e uma forma extracelular (Cu/ZnSOD ou SOD3) (Matsubara *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2007). Somente a isoforma que contém Mn^{2+} como centro redox tem sua atividade aumentada com o estresse oxidativo (Barreiros *et al.*, 2006). Outra isoforma, a qual contém ferro em sua composição (FeSOD), é encontrada em bactérias (Halliwell & Gutteridge, 2007). Todas as formas catalisam a mesma reação onde o $O_2^{\bullet-}$ é convertido em oxigênio e H_2O_2 .

A dismutação de $O_2^{\bullet-}$ ocorre naturalmente, porém, sendo uma reação de segunda ordem, necessita de maior concentração deste radical para que ocorra colisão entre duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$. A SOD favorece a dismutação e a eliminação de $O_2^{\bullet-}$ mesmo em baixas concentrações, pois torna a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade de colisão entre as moléculas (Matsubara *et al.*, 1997; Barreiros *et al.*, 2006). A atividade da SOD total no músculo esquelético é inferior a do fígado e do rim, sendo semelhante a do cérebro, coração e pâncreas e superior a de eritrócitos (Ferreira *et al.*, 2007).

Para a eliminação do H_2O_2 existem duas enzimas principais, a catalase e a GPx. A catalase, uma hemoproteína citoplasmática, tem como função dismutar o H_2O_2 em água e oxigênio, e está localizada em maior abundância nos peroxissomos, tanto em animais como em plantas (Matsubara *et al.*, 1997; Barreiros *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007). Em animais, a catalase está presente em praticamente todos os tecidos, particularmente mais concentrada no fígado e nos eritrócitos. O cérebro, o coração e os músculos esqueléticos possuem baixas concentrações desta enzima (Ferreira *et al.*, 2007).

A glutathione peroxidase (GPx) catalisa a redução de H_2O_2 a água e de peróxidos orgânicos a seus correspondentes alcoóis às custas da conversão de GSH em glutathione oxidada (GSSG) (Matsubara *et al.*, 1997). Em seguida, a GSH é regenerada pela ação da GR. A GPx é considerada a principal enzima de eliminação de H_2O_2 em mamíferos, tendo papel importante na proteção de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos contra ERO. Sua afinidade ao H_2O_2 é superior a da catalase, principalmente quando as concentrações de H_2O_2 apresentam-se baixas. Quando as concentrações de H_2O_2 são elevadas, a ponto do H_2O_2 constituir de substrato para formação de $HO\bullet$, via reação de Fenton, acredita-se que a catalase atue em um mecanismo adicional de defesa, limitando

o acúmulo de H_2O_2 intracelular. A GPx é uma selenoproteína, que apresenta elevada atividade em diversos tecidos animais; na célula, distribui-se pelo citosol e pela mitocôndria. Na mitocôndria existem dois tipos de enzimas peroxidases, a GPx clássica e a GPx dos hidroperóxidos lipídicos, sendo esta a única enzima intracelular capaz de reduzir diretamente hidroperóxidos de fosfolipídios e colesterol de membrana (Ferreira *et al.*, 2007).

A glutathione redutase (GR) é uma flavoproteína, não possui função antioxidante direta, porém é importante para o funcionamento normal do sistema antioxidante. Esta enzima atua catalisando a reação de regeneração da GSH, utilizando como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na sua forma reduzida (NADPH) produzido na via das pentoses. Em condições fisiológicas normais, a GR mantém mais de 98% da GSH intracelular no estado reduzido, contribuindo, assim, para a manutenção do meio intracelular em estado reduzido, para a presença de GSH em quantidades adequadas e consequentemente, para manutenção da homeostasia orgânica (Ferreira *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2007). A GR também parece atuar na manutenção redox de NADP em tecidos onde GSSG está presente (Vasconcelos *et al.*, 2007). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GR (Matsubara *et al.*, 1997).

Além da atuação da GPx, a redução de hidroperóxidos orgânicos, na presença de GSH, também pode ser catalisada por uma enzima independente de selênio, a glutathione-S-transferase (GST), atuando tanto como peroxidase ou como transferase. Porém, enquanto a atividade da GST parece estar amplamente envolvida na eliminação de compostos por meio da conjugação com a GSH, particularmente a nível hepático, a atividade da GPx parece ser particularmente importante na redução de hidroperóxidos orgânicos (Ferreira *et al.*, 2007).

2.1.3.2. Antioxidantes não enzimáticos

A glutathione (GSH, L- γ -glutamyl-L-cisteinylglycine), é um tripeptídeo abundante na mitocôndria, citosol e núcleo, sendo considerado o principal antioxidante solúvel em tais compartimentos celulares (Valko *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008).

Presente em todos os organismos aeróbios, a GSH exerce funções essenciais na célula (Matsubara *et al.*, 1997). A presença de GSH em quantidades adequadas é determinante para manutenção da homeostasia orgânica, devido a sua participação na síntese e expressão de DNA, síntese de proteínas, na atividade de diversas enzimas intracelulares, na liberação de neurotransmissores no sistema nervoso e principalmente, na biotransformação e eliminação de xenobióticos e defesa das células contra o estresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008).

A GSH apresenta capacidade redutora determinada pelo grupamento -SH presente na cisteína (Matsubara *et al.*, 1997; Vasconcelos *et al.*, 2007). Acerca de sua função como antioxidante, a GSH atua como cofator de enzimas detoxificantes, tais como GPx e GST; participa no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática; inibe diretamente o radical HO• e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), e por meio da ação catalítica da GPx, detoxifica o H_2O_2 e peróxidos lipídicos; participa da regeneração de importantes antioxidantes às suas formas ativas, tais como vitaminas C e E (Valko *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008). Além disso, a GSH mantém resíduos cisteinila de hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito na forma reduzida. A falha nesta função resulta na formação de meta hemoglobina e consequente deficiência no transporte de oxigênio pelo eritrócito, além de causar uma deformação do eritrócito, impedindo sua passagem para órgãos vitais (Vasconcelos *et al.*, 2007).

A síntese de GSH ocorre no citosol intracelular, exceto em células epiteliais, pela ação das enzimas γ -glutamilcisteína sintetase e glutathione sintetase. Primeiramente, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase, formando γ -L-glutamil-L-cisteína. Este dipeptídeo liga-se à glicina pela ação da glutathione sintetase, com gasto ATP e Mg^{+2} . A γ -glutamilcisteína sintetase é regulada pela própria GSH por meio de um *feedback* negativo, o que previne a produção excessiva desta ou o acúmulo do intermediário γ -glutamilcisteína. Se a conversão de γ -glutamilcisteína em GSH for insuficiente, uma reação alternativa predomina: a conversão a 5-oxoprolina, catalisada pela γ -glutamilciclotransferase (Huber *et al.*, 2008). A GSH possui ainda duas proteínas transportadoras presentes na membrana mitocondrial, dicarboxilato e 2-oxoglutarato, as quais são

capazes de efetuar o transporte de GSH mesmo contra um gradiente de concentração (Valko *et al.*, 2007).

Considerada um tampão redox sulfidrílico, a glutathione opera em ciclos entre sua forma oxidada (GSSG) e sua forma reduzida (GSH), de modo que a forma reduzida seja reciclada em um ciclo catalítico, o qual permite que sua atividade antioxidante seja preservada (Barreiros *et al.*, 2006; Huber *et al.*, 2008). No ciclo catalítico de reciclagem, a GSH é oxidada por ação catalítica das enzimas GPx e glutathione oxidase (GO), sendo convertida em GSSG. A GSSG, por sua vez, é reduzida por ação catalítica da enzima GR, que utiliza como cofator NADPH, regenerando a GSH. Os níveis intracelulares de GSH são, portanto, dependentes da interação das enzimas GPx e GR, bem como dos mecanismos de síntese intracelular e de captação de GSH a partir do meio extracelular (Ferreira *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008). O equilíbrio deste ciclo catalítico é importante, uma vez que altas concentrações de GSSG podem comprometer a ação de diversas enzimas antioxidantes. A GSSG acumulada pode alterar a razão 2GSH/GSSG, a qual é considerada um importante marcador de estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2007).

A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel essencial ao homem, ou seja, não pode ser sintetizado a partir de glicose, como ocorre em plantas e na maioria dos animais, necessitando assim que seja obtida por meio da dieta nutricional. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico, 99,95 % da vitamina C (AsCH_2) encontra-se na forma de ascorbato (Asc^-), o qual atua como antioxidante sobre ERO e ERN em meio aquoso, ao doar um $\text{H}^\bullet$ a um radical, levando a formação do ânion radical semidesidroascorbato ($\text{Asc}^\bullet$) ou ascorbila, considerado pouco reativo. Atua eficientemente sobre as espécies $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ClO^- , $\text{OH}^\bullet$ e $\text{HOO}^\bullet$. O ascorbato ainda pode atuar diretamente nas membranas celulares, impedindo a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana. Além disso, pode regenerar o ânion radical urato a partir de urato, fechando seu ciclo de atuação antioxidante (Matsubara *et al.*, 1997; Vasconcelos *et al.*, 2007). O ascorbato atua também como cofator de enzimas, tais como a prolina hidroxilase e a lisina hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno, bem como é requerido pela enzima dopamina β -hidroxilase, a qual converte dopamina em noradrenalina (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A Vitamina E é o termo comum a duas famílias de compostos: tocoferóis e tocotrienóis, que apresentam, qualitativamente, a mesma atividade biológica do α -tocoferol, o composto mais potente e, geralmente, a forma predominante. O tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados de membranas e lipoproteínas. Intercepta $RO_2^\bullet$, levando a formação do radical tocoferila, relativamente estável, o qual pode ser regenerado por ascorbato, GSH ou ubiquinol a tocoferol (Matsubara *et al.*, 1997; Vasconcelos *et al.*, 2007). O tocoferol ainda estimula a resposta imunológica, reduz a severidade das alterações mediadas por prostaglandinas e inibe a conversão de nitritos a nitrosaminas, as quais possuem potencial cancerígeno (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Figura 4 - Vias de formação de ERO, processo de lipoperoxidação e papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes como Vit. E, Vit. C (AsCH⁻) e ácido lipóico (ALA) no gerenciamento do estresse oxidativo (equações não estão balanceadas). Reação 1: O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é formado pelo processo de redução de oxigênio molecular mediado pelas NADPH oxidases e xantina oxidase ou não-enzimaticamente na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Reação 2: O $O_2^{\bullet -}$ é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Reação 3: O H_2O_2 é mais eficientemente eliminado pela enzima glutatona peroxidase (GPx) que requer GSH como doadora de elétrons. Reação 4: A glutatona oxidada (GSSG) é reduzida de volta para GSH pela enzima glutatona redutase (GR), que utiliza NADPH como doador de elétrons. Reação 5: síntese do radical hidroxila reativo ($HO^{\bullet}$) pela reação de Fenton, acelerada pela participação do $O_2^{\bullet -}$. Reação 6: O $HO^{\bullet}$ pode abstrair um elétron de ácidos graxos poliinsaturados (LH) para dar origem a um radical de carbono ($L^{\bullet}$). Reação 7: O $L^{\bullet}$ pode ainda interagir com o oxigênio molecular para dar um radical peroxila ($ROO^{\bullet}$). Se o $ROO^{\bullet}$ não for reduzido com antioxidantes, ocorre o processo de lipoperoxidação. MDA: malonaldeído; HNE: 4-hidroxi-2-nonenal.

2.2. Mecanismo de ação da MDMA

A MDMA é um agonista monoaminérgico indireto, com propriedades simpatomiméticas e de efeito estimulante com intensidade e duração proporcionais a dose e a via de administração. Sua ação é devido à liberação de neurotransmissores simpáticos de vesículas de terminações nervosas e da glândula adrenal, nomeadamente: serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), dopamina (DA), adrenalina e noradrenalina (NA; norepinefrina, NE). A MDMA tem efeito neurotóxico seletivo e degenerativo sobre terminações nervosas serotoninérgicas, marcado por um período inicial de liberação aguda de 5-HT, o qual é seguido por um período de depleção prolongada dos marcadores neuronais serotoninérgicos, nomeadamente 5-HT e o seu metabólito, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA).

A MDMA promove a liberação de monoaminas por meio da interação com proteínas transportadoras, contudo, apresenta maior afinidade para o local de captação serotoninérgico, cerca de 40 vezes superior à afinidade ao local de captação dopaminérgico; liberando, portanto, preferencialmente 5-HT (Schmidt, 1994) tanto *in vivo* (Steranka & Sanders-Bush, 1980) como *in vitro* (Fuller & Henderson, 1994).

A MDMA promove a liberação de 5-HT por meio de difusão por troca, processo no qual adentra no neurônio através de sua captação pelo transportador de serotonina (5HTT) localizado na membrana neuronal. Por conseguinte, o 5-HTT liga-se a 5-HT livre no meio intracelular, transportando-a para a fenda sináptica (Huether *et al.*, 1997). Também por interação direta com 5-HTT, a MDMA inibe a recaptação de 5-HT (Kuczenski & Segal, 1994). Ao contrário da liberação fisiológica de catecolaminas por meio de potencial de ação neuronal, o processo de inversão de função do 5-HTT induzido por MDMA, é independente de cálcio, podendo ser bloqueado por inibidores seletivos, tais como fluoxetina e imipramina (Gudelsky & Nash, 1996).

A MDMA também é capaz de inibir os transportadores de DA (DAT) e de NE (NET), com afinidade variável conforme a espécie (Montgomery *et al.*, 2007). ROTHMAN *et al.* (2001) demonstraram que culturas de células intestinais 407 que expressam transportadores humanos, apresentaram a seguinte ordem de inibição de transportadores induzida por MDMA: NET > 5-HTT > DAT. No mesmo estudo, porém, em células que expressam transportadores de camundongos, a ordem de

inibição foi de 5-HTT > NET > DAT, estando de acordo com dados obtidos em ratos (Han *et al.*, 2006). Em ratos, observou-se que o enantiômero *S*(+)-MDMA atua mais fortemente como substrato de 5-HTT, NET e DAT do que *R*(-)-MDMA. Além disso, os isômeros *S* de MDMA e de MDA são liberadores de DA mais potentes do que seus correspondentes isômeros *R* (Partilla *et al.*, 2006).

Em altas concentrações, a MDMA adentra nas vesículas neuronais por difusão passiva, e por ser uma base fraca, pode aumentar o pH vesicular e modificar o gradiente de íons H⁺ regulados pela bomba dependente de adenosina trifosfato (ATP) (Kuczenski & Segai, 1994). A modificação no pH promove o efluxo de 5-HT por meio do transportador vesicular monoaminérgico (VMAT) localizado na membrana vesicular. Porém, mesmo em baixas concentrações, a MDMA também promove a depleção de 5-HT das vesículas neuronais por meio de interação direta com VMAT, revertendo sua função normal de transporte. (Rudnick & Wall, 1992). Além disso, a MDMA inibe parcialmente a monoamina oxidase (MAO), preferencialmente a MAO do tipo A (MAO_A), isoforma com maior afinidade pela 5-HT (Leonardi & Azmitia, 1994). A liberação massiva de 5-HT e sua maior disponibilidade na fenda sináptica ocorrem até 1 hora após o consumo de MDMA e já 3 horas após, a liberação de 5-HT decai a níveis inferiores aos fisiológicos. Em modelos *in vitro* (Johnson *et al.*, 1986) e *in vivo*, inclusive em ratos, o isômero *S* apresenta ação neurotóxica mais potente do que o isômero *R* (Schmidt *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1988). Detalhes acerca do mecanismo de ação da MDMA, mais precisamente em neurônios serotoninérgicos, estão representados na Figura 5.

A MDMA também causa inibição irreversível da triptofano hidroxilase (TPH), enzima limitante da síntese de 5-HT, a qual pode permanecer com atividade diminuída de alguns meses até anos após a administração (Fischer *et al.*, 1995).

Além disso, a MDMA atua como agonista direto do receptor de 5-HT do tipo 2A (5-HT_{2A}) localizado em neurônios pós-sinápticos, fato responsável por suas propriedades alucinogênicas (Green *et al.*, 2003). A ativação deste receptor pela MDMA ou pela 5-HT liberada leva a diminuição dos níveis do neurotransmissor ácido γ-aminobutírico (GABA) (Yamamoto *et al.*, 1995) e, consequente estímulo da síntese e liberação de DA (Nash *et al.*, 1990). Em estudos comportamentais envolvendo ratos treinados, demonstrou-se que LSD foi substituída por *S*(+)-

MDMA (Chu *et al.* 1996) e S-(+)-MDA (Baker *et al.*, 1995), situação na qual os ratos os diferenciaram de salina. No entanto, LSD e DOM ((±)-2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina), um derivado anfetamínico alucinogênico, foram substituídas por R-(-)-MDA (Broadbent *et al.*, 1992), o que reforça a hipótese de que a propriedade alucinogênica seja devido ao anel metilenodioxí.

Além disso, a MDMA apresenta capacidade relevante de se ligar a diversos receptores, desde que concentrações em grandeza micromolar sejam alcançadas no cérebro (Johnson *et al.*, 2004). Por ordem de afinidade, a MDMA liga-se diretamente aos receptores α_2 -adrenérgicos, histamínicos do tipo 1 (H_1), muscarínicos do tipo 1 (M_1) e do tipo 2 (M_2), α_1 -adrenérgicos, β -adrenérgicos, 5-HT₁, dopaminérgicos do tipo 1 e 2, opióides e benzodiazepínicos (Bataglia *et al.*, 1988).

Figura 5 - Mecanismo de ação da MDMA no terminal nervoso serotoninérgico e na fenda sináptica. 1) influxo de MDMA através do transportador de serotonina (5-HTT). 2) influxo de MDMA nas vesículas através do transportador vesicular monoaminérgico (VMAT) e consequente liberação de serotonina (5-HT). 3) Inibição da triptofano hidroxilase (TPH). 4) Inibição da MAO_B, localizada na membrana mitocondrial. 5) Liberação de 5-HT para a fenda sináptica por reversão da função normal do 5-HTT. 6) MDMA atua como agonista do receptor 5-HT_{2A} (Capela *et al.*, 2009).

2.3. Biotransformação da MDMA e metabólitos reativos

A biotransformação da MDMA é fundamentalmente hepática, tanto em humanos quanto em animais de laboratório, gerando metabólitos redox ativos (Figura 6) que exercem um efeito tóxico direto não somente nas células hepáticas (Moon *et al.*, 2008), como também nas do SNC (Yamamoto & Raudensky, 2008; Capela *et al.*, 2009), rins (Carvalho *et al.*, 2002; Ninkovic *et al.*, 2008) e coração (Carvalho *et al.*, 2004).

O carbono α responsável pelas propriedades estereoquímicas da MDMA é preservado ao longo das vias metabólicas; portanto, todos os produtos formados também são compostos quirais que podem estar presentes como uma mistura de seus enantiômeros (Figura 2). As principais vias metabólicas da MDMA podem ser observadas na Figura 6.

Inicialmente, a MDMA sofre *N*-desmetilação para formar a MDA (3,4-metilenodioxianfetamina) (Via I da Figura 6), tal reação é catalisada predominantemente pela CYP2B6 nos humanos e pela CYP1A2 em ratos (Maurer *et al.*, 2000). A seguir, a MDA e a MDMA são O-desmetilenadas formando os metabólitos catecóis α -metildopamina (α -MeDA) e N-metil- α -metildopamina (N-Me- α -MeDA), respectivamente, pelos citocromos P-450 2D, 2B e 3A, e principalmente 2D6 (Via II). Esses catecóis são posteriormente O-metilados pela catecol-O-metiltransferase (COMT) formando a HMA (4-hidroxi-3-metoxi-anfetamina) e HMMA (4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina), respectivamente. Esses quatro metabólitos, preferencialmente HMA e HMMA, são excretados essencialmente na urina na forma de conjugados com ácido glicurônico ou com íon sulfato.

Quando a concentração de α -MeDA e N-Me- α -MeDA se torna excessiva, com a concomitante saturação da COMT, devido a presença do anel catecol em suas moléculas, esses metabólitos podem ser rapidamente oxidados às suas correspondentes o-quinonas, gerando ERO (Via III).

Quinonas são compostos que apresentam uma grande capacidade de originar ciclos redox, pois são eletrofílicas e ao sofrer redução com o recebimento de um elétron, originam um radical semiquinona (via IV), que por sua vez, pode ser oxidado na presença de oxigênio molecular, regenerando a quinona e produzindo um ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Bolton *et al.*, 2000). Este processo poderá dar origem ao estresse oxidativo, tal como já descrito no item 2.1. O $O_2^{\cdot-}$

pode sofrer uma dismutação espontânea ou enzimática para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e também pode reagir com óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito (ONOO^-). Adicionalmente, o H_2O_2 na presença de íons ferro pode gerar o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$). Desta forma, as quinonas levam à formação de ERO e ERN, que causam estresse oxidativo dentro das células pela formação de macromoléculas oxidadas, incluindo lipídeos, proteínas e DNA.

As o-quinonas também podem ser oxidadas em um processo que envolve uma ciclização 1,4-intramolecular irreversível, resultando na formação de aminocromos (via V) e compostos relacionados, tais como 5,6-diidroxiindol (via VI), que levam ao aparecimento de polímeros escuros insolúveis do tipo melanina (VII) (Bindoli *et al.*, 1992). Por outro lado, os intermediários reativos o-quinonas agem como eletrófilos em sistemas biológicos e podem promover danos celulares por meio da alquilação de biomoléculas, tais como proteínas celulares vitais e/ou DNA (Bolton *et al.*, 2000).

As o-quinonas podem ser conjugadas com GSH para formar um mono aduto glutationil (VIII), que foi identificado, pela primeira vez em microsossomos de ratos por HIRAMATSU *et al.* (1990). Esses mono conjugados com GSH permanecem redox ativos e podem ser prontamente oxidados a quinona tioéter, que após a redução por uma segunda molécula de GSH, produz conjugados 2,5-bis-glutationil (IX).

A formação sistêmica dos conjugados com a GSH da α -MeDA e da N-Me- α -MeDA no fígado é seguida da sua distribuição para outros órgãos, nomeadamente para o cérebro. Ambos os conjugados mono e bis-GSH podem ser metabolizados via ácidos mercaptúricos pela γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) e dipeptidases aos correspondentes conjugados com a cisteína e, finalmente, pela N-acetiltransferase a conjugados com a N-acetilcisteína (NAC) (Jones *et al.*, 2005; Erives *et al.*, 2008).

Comparando-se o metabolismo da MDMA entre seres humanos e animais de laboratório, observa-se que as principais reações metabólicas são qualitativamente similares. No entanto, a velocidade e a importância destas vias metabólicas apresentam diferenças quantitativas (de la Torre & Farre, 2004). Nos humanos, a O-desmetilação com formação de N-Me- α -MeDA é a via predominante para qualquer dose administrada (de la Torre *et al.*, 2000),

enquanto que nos ratos a N-desmetilação da MDMA, que leva à formação da MDA, é a via metabólica mais importante para baixas doses (Chu *et al.*, 1996).

Similarmente, em seres humanos, a etapa enantiosseletiva é a O-desmetilenação para N-Me- α -MeDA, principalmente regulada pela CYP2D6. O enantiômero *R* é biotransformado mais lentamente que o *S*; o $t_{1/2}$ plasmático do enantiômero *R* atinge 14,8 horas, cerca de três vezes maior que do *S*, de apenas 4,8 horas (Pizarro *et al.*, 2004). A maior afinidade da *S*-MDMA pela CYP2D6 resulta numa razão $R/S > 1$ em fluídos biológicos quando a MDMA é consumida como racemato (Fallon *et al.*, 1999; Pizarro *et al.*, 2004).

Após a administração oral de 40 mg de uma mistura racêmica de MDMA, a $C_{m\acute{a}x}$ para o enantiômero *R*-(-)-MDMA é bastante superior a do enantiômero *S*-(+)-MDMA. A razão enantiomérica (R/S) da AUC referente a 24 horas indica uma eliminação mais rápida do enantiômero *S*-MDMA. Um estudo realizado por FALLON *et al.* (1999) e colaboradores indica que o enantiômero *S*-MDMA tem uma distribuição mais extensa, o que sustenta a hipótese da estereosseletividade da farmacocinética da MDMA em humanos.

Recentemente, MEYER *et al.*, (2008) também observaram a enantiosseletividade da CYP2C19, com preferência pelo enantiômero *S*-MDMA nas reações de N-desmetilação e desmetilenação. Isso mostra que a diferente farmacocinética dos enantiômeros de MDMA, em humanos, é causada muito provavelmente pela enantiosseletividade metabólica das isoenzimas CYP2C19 e CYP2D6. Neste contexto, a CYP2D6 parece ser a mais importante uma vez que contribui para 33 % da metabolização da MDMA, mesmo com as condições máximas de substrato, enquanto a CYP2C19 contribui com um máximo de 17 %.

Em ratos, ao contrário do homem, a etapa enantiosseletiva é a N-desmetilação da MDMA a MDA, sendo que a forma *R* é biotransformada mais rapidamente que a forma *S* (Matsushima *et al.*, 1998). Portanto, o $t_{1/2}$ de eliminação do enantiômero *R*-MDMA é menor do que do enantiômero *S*-MDMA. O nível de MDA formado após administração via i.v. de *S*-MDMA a ratos machos é cerca de três vezes maior do que em relação a *R*-MDMA (Cho *et al.*, 1990). Portanto, a enantiosseletividade, em ratos, está associada a N-desmetilação, via a qual contribui com apenas de 8 % a 9 % da metabolização enantiosseletiva de MDMA em humanos.

Figura 6 - Vias metabólicas da biotransformação da MDMA. (I) MDMA é N-desmetilada para formar MDA; (II) isoenzimas do citocromo P-450 (principalmente CYP2D6 em humanos) catalisam a O-desmetilação da MDMA e MDA a N-Me- α -MeDA e α -MeDA respectivamente; (III e IV) os catecóis são prontamente oxidados às suas correspondentes *o*-quinonas que podem entrar em ciclos redox com os radicais semiquinonas levando à formação de ERO e ERN; (V, VI e VII) ciclização das *o*-quinonas originando aminocromos e compostos como 5,6-diidroxiindol que sofrem oxidação posterior e polimerização para formar pigmentos escuros do tipo melanina; (VIII e IX) as *o*-quinonas podem reagir com GSH para formar os correspondentes conjugados com GSH. MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDA, metilenodioxianfetamina; N-Me- α -MeDA, N-metil- α -metildopamina; α -MeDA, α -metildopamina; HMA, 4-hidroxi-3-metoxi-anfetamina; HMMA, 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina; COMT, catecol-O-metiltransferase; GSH, glutaciona. * carbono α .

Adaptado de Carvalho et al., 2010.

2.4. Toxicidade hepática

O consumo de *ecstasy* tem sido responsável pelo aparecimento de vários casos de falência hepática aguda na população jovem. ANDREU *et al.* (1998) relataram que a MDMA foi a segunda causa mais comum de insuficiência hepática (depois de etanol) em pacientes com idade inferior a 25 anos, representando até 20 % desse total de casos.

Clinicamente, a lesão hepática induzida pela MDMA pode mostrar padrões diferentes que vão desde formas benignas, semelhante à hepatite viral (Dykhuizen *et al.*, 1995), para formas graves, incluindo disfunção hepática devido necrose extensa e/ou focais ou mesmo insuficiência hepática fulminante com perda total do parênquima hepático funcional, bem como encefalopatia, que podem progredir para edema cerebral e falência múltipla dos órgãos (Henry *et al.*, 1992; Milroy *et al.*, 1996).

O mecanismo fisiopatológico da hepatotoxicidade induzida pela MDMA ainda não é completamente compreendido, devido a sua complexidade. Uma variedade de hipóteses tem sido sugerida, incluindo a reatividade dos seus metabólitos (de la Torre *et al.*, 2004a), hipertermia (Green *et al.*, 2004), o aumento de efluxo de neurotransmissores (de la Torre *et al.*, 2004a), oxidação de aminas biogênicas (Carvalho *et al.*, 2004a), disfunção mitocondrial (Moon *et al.*, 2008) e apoptose (Montiel-Duarte *et al.*, 2004). A influência de polimorfismos genéticos também sido relatada.

A hipertermia induzida pela MDMA pode ser pelo menos em parte, responsável pela hepatotoxicidade observada *in vivo*. Deve ser enfatizado que a hipertermia é uma condição agressiva pró-oxidante que pode levar a danos hepatocelulares irreversíveis (Santos-Marques *et al.*, 2006).

A influência da hipertermia na hepatotoxicidade induzida por MDMA foi avaliada em hepatócitos de camundongo recém-isolados (Carvalho *et al.*, 2001) e em cultura primária de hepatócitos de rato (Pontes *et al.*, 2008) incubados com MDMA em condições normotérmica (37°C) e hipertérmica (41°C). Este procedimento simula, *in vitro*, a resposta hipertérmica induzida *in vivo* por MDMA, sem a interferência de outros fatores associados *in vivo*. Em ambos os modelos de células, a condição hipertérmica potencializou os efeitos hepatotóxicos de MDMA principalmente relacionados ao estresse oxidativo: depleção dos níveis de GSH, peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular (Pontes *et al.*, 2008).

CARVALHO *et al.* (2010) sugerem uma possível explicação para a influência da hipertermia no dano hepático induzido por MDMA: os metabólitos reativos produzidos após biotransformação hepática reagem com a GSH e provavelmente com outros grupos sulfidrilas intracelulares ao mesmo tempo que a MDMA induz um aumento de temperatura corporal. O fígado, parcialmente depletado de grupos sulfidrilas, seria, então, exposto a hipertermia, que parece exercer danos principalmente via estresse oxidativo.

A MDMA provoca hipertermia em animais e seres humanos. No entanto, enquanto a hipertermia induzida por MDMA em animais de laboratório é dose-dependente (Green *et al.*, 2004), em humanos, este efeito não é necessariamente relacionado com a quantidade consumida (Hall & Henry, 2006). Evidências indicam que a hipertermia induzida pela MDMA é potencializada pela alta temperatura do ambiente, desidratação e esforço físico excessivo (Carvalho *et al.*, 2002a), o que pode explicar a diferente suscetibilidade entre os seres humanos. Esse fato é de extrema importância uma vez que comprimidos de *ecstasy* são frequentemente consumidos em boates e festas *rave*, onde a dança acontece em um ambiente quente, que pode exacerbar o efeito da MDMA.

Estudos recentes tem sugerido que as mitocôndrias podem ser organelas alvo importantes para a toxicidade de MDMA (Moon *et al.*, 2008; Nakagawa *et al.*, 2009). A administração de MDMA promove uma inibição rápida e transitória da função mitocondrial (Burrows *et al.*, 2000), embora os mecanismos não sejam completamente compreendidos. É plausível que MDMA e/ou seus metabólitos reativos (especialmente os derivados quinona) possam inibir a função mitocondrial interagindo diretamente com proteínas mitocondriais, como o citocromo c (Fisher *et al.*, 2007), ou podem causar disfunção mitocondrial indiretamente por meio do aumento do estresse oxidativo/nitrosativo. MOON *et al.* (2008) demonstraram que a MDMA provoca inativação oxidativa de enzimas mitocondriais chaves, como aquelas envolvidas no fornecimento de energia, metabolismo de gorduras e defesa antioxidante, o que provavelmente acarreta em uma disfunção mitocondrial e danos subsequentes ao fígado. Dentre essas enzimas, as atividades das aldeído desidrogenases mitocondriais (metabolizam acetaldeído e aldeídos lipídicos), 3-cetoacil-CoA tiolases (envolvidas na produção de ATP através da via de degradação de gordura) e ATP sintase, foram significativamente inibidas após a exposição a MDMA, sugerindo que os

hepatócitos não podem realizar adequadamente muitas funções celulares, o que contribui para a morte celular.

A atividade pró-apoptótica da MDMA foi demonstrada em hepatócitos isolados de ratos e em células da linhagem HSC (Montiel-Duarte *et al.*, 2002 e 2004). A indução de apoptose por MDMA foi acompanhada por redução da proteína anti-apoptótica Bcl-xL, liberação mitocondrial de citocromo c e ativação de caspase-3. Esses autores também avaliaram a influência do estresse oxidativo na atividade pró-apoptótica da MDMA e observaram que a exposição da cultura de células HSC à MDMA resultou no acúmulo de ERO e depleção de GSH intracelular (Montiel-Duarte *et al.*, 2004). Esses efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com antioxidantes, mas não o processo de apoptose, indicando assim que a apoptose mediada pela MDMA não está relacionada ao estresse oxidativo. De maior importância, esses autores demonstraram que a ação conjunta de GSH e seu precursor N-acetilcisteína aumentou o efeito apoptótico. Além disso, a inibição da atividade do citocromo P-450, principalmente CYP2D6, pelo pré-tratamento de células com quinina, diminuiu significativamente a apoptose mediada pela MDMA, sugerindo que a ativação metabólica da MDMA, resultando na formação de conjugados com a glutatona e cisteína, pode ser determinante para sua ação apoptótica (Montiel-Duarte *et al.*, 2004).

Uma vez que o metabolismo oxidativo da MDMA (via O-desmetilação) é catalisado pela CYP2D6 no homem, seria razoável supor que o polimorfismo genético associado com essa enzima pudesse contribuir para a variabilidade interindividual das manifestações de toxicidade da MDMA (Carmo *et al.*, 2006). Seria de se esperar que os indivíduos com atividade da enzima diminuída (metabolizadores lentos) fossem mais suscetíveis aos efeitos agudos da MDMA. E por outro lado, os metabolizadores ultrarrápidos, em virtude do aumento da formação dos metabólitos tóxicos, estariam mais predispostos à citotoxicidade da MDMA, como a neurotoxicidade, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em longo prazo.

No entanto, a formação de um complexo metabólito-enzima resulta em uma auto inibição que torna todos os indivíduos, independente do genótipo, metabolizadores fenoticamente lentos após a administração de duas doses consecutivas (de la Torre *et al.*, 2005). Portanto, esse fato limita o impacto do polimorfismo genético da CYP2D6 sobre a toxicidade aguda da MDMA.

As catecolaminas liberadas por ação da MDMA podem ativar receptores adrenérgicos presentes na artéria hepática provocando vasoconstrição, seguida de hipóxia (Losser *et al.*, 1996). Além disso, a ativação de receptores α -adrenérgicos presentes nos hepatócitos pode levar a depleção de GSH (James *et al.*, 1983), aumento da atividade mitocondrial e dos níveis intracelulares de cálcio livre (Taylor *et al.*, 1983), que representam potenciais contribuintes para os danos celulares. A lesão hepática pode também resultar do metabolismo oxidativo das catecolaminas biogênicas. Catecolaminas liberadas pela ação da MDMA podem sofrer auto-oxidação para formar espécies altamente reativas, incluindo metabólitos reativos, ERO e ERN, capazes de iniciar o estresse oxidativo e formação de aduto (Bindoli *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1997).

2.5. Toxicidade renal

A MDMA pode induzir processos de vasoconstrição, hipotensão, hipertermia, coagulação intravascular disseminada (CID) e rabdomiólise (Carvalho *et al.*, 2002b), o que pode contribuir para os danos renais secundários descritos na literatura, tais como: falência renal aguda e crônica (Henry *et al.*, 1992; Fahal *et al.*, 1992; Cunningham, 1997), vasculite renal necrosante (Citron *et al.*, 1970) e lesão aguda de túbulos proximais (Kwon *et al.*, 2003). Em destaque, a CID e a rabdomiólise, frequentes complicações clínicas observadas após o abuso da MDMA, são responsáveis por causar isquemia renal súbita e necrose tubular aguda, devido à obstrução microvascular pela deposição de fibrina, plaquetas ou mioglobina, respectivamente (Fahal *et al.*, 1992; Cunningham, 1997).

Há também a possibilidade da ação tóxica direta dos metabólitos da MDMA sobre o tecido renal. CARVALHO *et al.* (2002b) demonstraram *in vitro* que metabólitos catecóis, tal como α -MeDA, são tóxicos para culturas primárias de células tubulares proximais renais (CTP) humanas e de ratos, bem como levam a formação de pigmentos insolúveis do tipo melanina através de reações de polimerização, que contribuem para obstrução tubular. Entretanto, após exposição direta com MDMA e MDA não se constatou citotoxicidade, demonstrando que o metabolismo é necessário para toxicidade *in vitro*.

In vivo, a nefrotoxicidade é baseada na ação dos conjugados da MDMA e MDA com a GSH (Monks & Lau, 1997 e 1998), os quais são metabolizados extracelularmente pela enzima γ -glutamiltranspeptidase (γ -GT), a qual possui

elevada atividade na membrana apical de células tubulares proximais renais, formando dipeptídeos cisteinilglicina, que são clivados por dipeptidases, a exemplo da aminopeptidase M, formando conjugados com N-acetilcisteína. Tais conjugados com cisteína adentram e atuam nas células epiteliais do túbulo proximal devido a um sistema membranar de transporte de aminoácidos (Monks & Lau, 1997) (Figura 7).

Figura 7 - Metabolismo do conjugado da N-metil-α-metildopamina com a GSH nos rins.
Adaptado de Monks & Lau (1997).

No interior das células, os conjugados com cisteína continuam a exercer sua toxicidade por permanecer redox ativos, podendo ainda ser convertidos pela enzima N-acetiltransferase ao correspondente ácido mercaptúrico ou então pela enzima β-liase ao correspondente tiol reativo, o qual pode ser inativado pela enzima S-metiltransferase (Monks & Lau, 1987; van Bladeren, 2000). A via metabólica catalisada pela β-liase parece ser responsável pela nefrotoxicidade causada por metabólitos de MDMA conjugados com GSH, pois tais metabólitos tioéteres retêm a capacidade de entrar em ciclos redox geradores de ERO.

CARVALHO *et al.* (2002b) propuseram que a hidrólise pela γ -GT e posterior clivagem pela aminopeptidase M representam um mecanismo de detoxificação, já que esta via de metabolização leva a formação, através de ciclização, de um composto do tipo benzotiazólico inativo, uma vez que o grupo catecol reativo da molécula é eliminado (Monks, 1995; Carvalho *et al.*, 2002b). Porém, os compostos quinona tioéteres são capazes de inibir diversas enzimas que utilizam GSH como substrato ou co-substrato, incluindo a γ -GT (Monks & Lau, 1998). Desta forma, os próprios metabólitos tioéteres da MDMA interferem na atividade da γ -GT, e podem, conseqüentemente, levar ao seu acúmulo e conseqüente aumento da toxicidade tanto para os rins quanto para outros órgãos, uma vez que além do grupo catecol reativo, a estrutura α -metilfeniletilamínica do composto inicial também é preservada (Cheng *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2002b).

2.6. Toxicidade no SNC

O potencial neurotóxico da MDMA tem sido alvo de intenso estudo nas últimas duas décadas. Como descrito no item 2.2., a MDMA possui efeito neurotóxico seletivo e degenerativo em terminações nervosas serotoninérgicas, marcado por um período de liberação aguda de serotonina (5-HT), seguido por um período de depleção prolongada de 5-HT e 5-HIAA. A MDMA também promove a inibição da TPH, diminuição da função e do número de 5-HTT, prejudicando a recaptação de 5-HT pelas células serotoninérgicas (Ricaurte *et al.*, 2000).

Existem evidências histológicas de degeneração de terminais nervosos serotoninérgicos causados por MDMA (Molliver *et al.*, 1990), as quais são frequentemente associadas a efeitos secundários, tais como deficiências de memória e na aprendizagem, distúrbios no sono, aumento da ansiedade e da impulsividade, ataques de pânico e depressão grave (Kish, 2002). Embora os efeitos neurotóxicos promovidos pela MDMA sejam bem definidos, os mecanismos responsáveis por tais efeitos ainda são pouco conhecidos.

Diversas teorias buscam explicar a ação neurotóxica da MDMA, uma das quais propõe o envolvimento de metabólitos tóxicos de dopamina (DA). NASH & BRODKIN (1991) demonstraram a relação linear entre a liberação de DA e a extensão da depleção dos marcadores neuronais serotoninérgicos em longo

prazo. SPRAGUE *et al.* (1998) propuseram que ocorra a captação da dopamina em excesso no espaço sináptico para o interior dos neurônios depletados em 5-HT. A desaminação oxidativa da DA pela MAO_B, presente em terminais nervosos serotoninérgicos, leva a formação de H₂O₂ (Spraghe *et al.*, 1998), e, por conseguinte, de radicais HO[•] via reação de Fenton (Wink *et al.*, 1994). O excesso de dopamina nestes terminais e os processos oxidativos envolvidos podem levar a depleção dos mecanismos endógenos de defesa antioxidante e consequente citotoxicidade (Gudelsky & Nash, 1996). Adicionalmente, em processos patológicos, a DA pode ser metabolizada via auto-oxidação no interior do neurônio (Arriagada *et al.*, 2000), com consequente formação de ERO, além de quinonas e semiquinonas altamente reativas (Bindoli *et al.*, 1992). As quinonas podem reagir com alvos nucleofílicos intracelulares (Hastings *et al.*, 1996), formando tioéteres potencialmente citotóxicos (Monks & Lau, 1997) ou podem levar a formação de aminocromos reativos (Smythies & Galzigna, 1998).

Contudo, estudos recentes contrariam o envolvimento da DA na neurotoxicidade induzida por MDMA. YUAN *et al.* (2002) demonstraram que o tratamento com reserpina não protege os neurônios serotoninérgicos da ação da MDMA, mesmo que a temperatura corporal seja mantida elevada. Outras limitações desta teoria são explicar como regiões pouco inervadas por DA, como córtex frontal e hipocampo, apresentam depleção de 5-HT induzida por MDMA, ou como explicar que a MDMA, quando injetada diretamente no cérebro, induz ao aumento de DA, porém não induz a depleção de 5-HT em longo prazo, falhando assim em reproduzir os efeitos de neurotoxicidade após administração sistêmica (Nixford *et al.*, 2001).

Outra importante teoria propõe que a neurotoxicidade é causada pela ação de metabólitos tóxicos de MDMA, ou seja, que o dano oxidativo seja causado pela formação de catecóis e quinonas reativas, resultantes da oxidação da própria molécula de MDMA e/ou de MDA (Monks & Lau, 1998) (item 1.4).

A neurotoxicidade serotoninérgica observada após administração sistêmica de MDMA ou de MDA não é reproduzida quando esses compostos são injetados intracerebroventricularmente em ratos e primatas não humanos (Schmidt & Taylor, 1988), sugerindo que o desenvolvimento de neurotoxicidade seja dependente do metabolismo hepático (de la Torre *et al.*, 2004a).

Os metabólitos reativos N-Me- α -MeDA e α -MeDA são oxidados às o-quinonas, as quais podem alquilar proteínas e DNA, ou entrar em ciclos redox com suas correspondentes semiquinonas, levando à formação de ERO; de maneira semelhante ao que ocorre no metabolismo de catecolaminas biogênicas, a exemplo da DA (Bolton *et al.*, 2000). Alternativamente, na presença de GSH, a oxidação de α -MeDA à correspondente quinona é seguida da conjugação com a GSH, formando 5-(glutathion-S-il)- α -MeDA (Hiramatsu *et al.*, 1990b), o qual pode sofrer a adição de uma segunda molécula de GSH levando à formação de 2,5-bis(glutathion-S-il)- α -MeDA (Miller *et al.*, 1997). JONES *et al.* (2005), detectaram tais conjugados mono e bis-GSH e conjugados mono e bis-NAC em estriado de ratos após a administração via s.c. de 20 mg/kg de MDMA. Também observaram uma relação direta entre a concentração de metabólitos NAC e a extensão da neurotoxicidade, avaliada pela depleção de marcadores neuronais serotoninérgicos no dialisado estriatal. Adicionalmente, ERIVES *et al.* (2008) demonstraram um acúmulo significativo de metabólitos tioéteres no dialisado estriatal após múltipla administração s.c. de MDMA (4 doses de 20 mg/kg em intervalos de 12 horas).

Entretanto, a administração intracerebroventricular de α -MeDA, N-Me- α -MeDA, HMA e HMMA não reproduz os efeitos neurotóxicos de MDMA e MDA, demonstrando que a formação de conjugados tioéteres é determinante para ocorrer a neurotoxicidade (de la Torre *et al.*, 2004a). Corroborando a estes dados, demonstrou-se que a injeção intracerebroventricular de conjugados com GSH e com NAC reproduzem os efeitos neurotóxicos e neurocomportamentais induzidos pela MDMA após administração sistêmica (Monks *et al.*, 2004), mas não alteram as concentrações de DA ou NA (Bai *et al.*, 1999). CAPELA *et al.* (2005) demonstraram em culturas de neurônios corticais de rato que os metabólitos são mais neurotóxicos que a MDMA, sendo o conjugado com a GSH o mais tóxico.

Portanto, apesar da conjugação com a GSH ser considerada uma via de detoxificação normalmente, ao favorecer a eliminação de reatividade química ou biológica de compostos eletrofílicos, o que é observado com relação à MDMA é exatamente o contrário, uma vez que a conjugação das quinonas com a GSH contribui para sua bioativação (Monks & Lau, 1997; van Bladeren, 2000).

MONKS & LAU (1997) propuseram um mecanismo de passagem do conjugado catecol-GSH através da barreira hemato-encefálica (BHE), uma vez

que os tioéteres são compostos hidrofílicos, envolvendo transportadores de GSH localizados na membrana endotelial. No interior do cérebro, o conjugado tioéter (5-(glutathion-S-il)- α -MeDA) sofre ação da γ -GT, presente em altas concentrações na membrana endotelial da BHE (Wolf *et al.*, 1992), e de dipeptidases, formando o correspondente conjugado cisteína-polifenol (5-(cistein-S-il)- α -MeDA), o qual é acetilado a N-acetilcisteína-polifenol (5-(N-acetilcistein-S-il)- α -MeDA) (Monks & Lau, 1997). Este último é eliminado mais lentamente do cérebro devido sua incapacidade para ciclizar internamente, o que o mantém reativo, portanto é considerado mais potencialmente neurotóxico (Bai *et al.*, 1999).

BAI *et al.* (2001) demonstraram que a inibição da γ -GT potencia a depleção de 5-HT e de 5-HIAA induzida por MDMA ou MDA. Tal fato pode ser devido a diminuição do metabolismo dos conjugados de α -MeDA e de N-Me- α -MeDA com a GSH presentes no lúmen dos capilares cerebrais, resultando em um aumento destes conjugados não degradados, os quais podem ser transportados através da BHE por meio de transportadores de GSH. Além disso, a γ -GT sofre inibição direta dos próprios conjugados polifenóis com a GSH, contribuindo assim na neurotoxicidade induzida por MDMA (Monks & Lau, 1998).

Objetivo

3. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi separar os enantiômeros da MDMA racêmica e avaliar a contribuição individual dos enantiômeros isolados, comparativamente com a mistura racêmica no estresse oxidativo hepático, renal e estriatal de ratos, após administração aguda por via oral.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos e material

A separação semipreparativa dos enantiômeros da *R,S*-(±)-MDMA foi realizada empregando-se um sistema analítico e um sistema preparativo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), descritos a seguir.

SISTEMA ANALÍTICO: Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba LC-10AD, auto injetor SIL-10A com *loop* de 500 µL, detector SPD-10A com comprimento de onda variável de UV-vis e um detector polarimétrico da Jasco, modelo CD-2095 plus, com detecção acoplada em série a um dicróismo circular, conectados a uma interface CBM-10A. A aquisição de dados foi registrada pelo *software* Labsolutions.

SISTEMA PREPARATIVO: Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba LC-6A, injetor Rheodyne com *loop* de 500 µL, detector SPD-6AV com comprimento de onda variável de UV-vis, conectados a uma interface CBM-10A. A aquisição de dados foi registrada pelo *software* CLASS-VP.

As colunas quirais de polissacarídeos foram adquiridas pela Chiral Technologies (West Chester, United States), enquanto que a coluna Hibar ChiralDex foi obtida pela Merck (Darmstadt, Germany) e a Kromasil KR100-16CH-TBB pela Akzonobel (Amsterdam, Netherlands). As colunas de glicopeptídeos macrocíclicos e as colunas P-CAP e P-CAP DP foram adquiridas da Astec (Whippany, New Jersey, USA) e a coluna polimérica sintética DEAVB foi gentilmente doada pelo Professor Dr. Daniel W. Armstrong.

Para determinação do aduto MDA-(TBA)₂ foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Agilent Technologies 1200 series (Santa Clara, EUA), composto por três bombas Quat Pump G1311A, degaseificador G1322A, auto injetor ALS G1329A, forno para coluna FC/ALS Therm, detector de fluorescência FLD G1321A. A aquisição de dados foi registrada pelo *software* Agilent ChemStation. A água utilizada na fase móvel foi purificada pelo sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

Os ensaios envolvendo espectrofotometria foram realizados em um espectrofotômetro com leitor de microplacas da Bio-Tek Instruments INC. (Winooski, VT), modelo Power Wave x 340 e *software* KC4 versão 3.0.

Para o preparo dos homogeneizados das amostras e realização de ensaios foram utilizados um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem da Marconi, modelo MA099 (Piracicaba, SP) e centrífugas refrigeradas para tubos da Eppendorf, modelos Centrifuge 5702 e 5810r (Hamburgo, Alemanha).

A perfusão cardíaca em ratos com solução salina foi realizada por meio de uma bomba peristáltica da Watson Marlon Bredel Pumps (Falmouth, Inglaterra), modelo 401U/D1 200 rpm, acoplada a uma mangueira de silicone de 3,2 mm ($\varnothing$ externo) x 1,6 mm ($\varnothing$ interno).

4.2. Solventes e reagentes

Os eluentes utilizados como fase móvel foram de grau CLAE. Metanol e *n*-hexano foram adquiridos da TEDIA (EUA), enquanto que acetronitrila, etanol e 2-propanol da J.T. Baker (México) e *n*-butanol da Sigma-Aldrich (Alemanha).

Glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GR), cofator β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), ácido 5-sulfosalicílico dihidratado 99+ % (SSA), ácido etilenodiaminotetracético tetrassódico hidratado 98 % (EDTA), cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), ácido 2-tiobarbitúrico 98 % (TBA), 1,1,3,3-tetrametoxipropano 99 % (TMP) e hidroxitolueno butilado 99+ % (BHT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.3. Cloridrato de MDMA na forma racêmica *R,S*-($\pm$)-MDMA.HCl

O cloridrato de MDMA na forma racêmica foi obtido a partir da extração da *R,S*-($\pm$)-MDMA de comprimidos de *ecstasy*, conforme LAPACHINSKE *et al.* (2009). Resumidamente, a *R,S*-($\pm$)-MDMA, base livre, foi extraída com *n*-hexano após a adição de tampão carbonato pH 11 aos comprimidos pulverizados; a seguir, sulfato de sódio anidro foi acrescentado à fase orgânica para desidratá-la e vapor de HCl foi borbulhado nessa fase para produzir o *R,S*-($\pm$)-MDMA.HCl. A identidade química da MDMA no sal obtido foi confirmada por cromatógrafo em fase gasosa modelo Focus CG acoplado a espectrômetro de massas Ion Trap modelo Polaris Q, ambos da Thermo Electron (Waltham, MA, EUA). Utilizou-se ionização eletrônica a 70 eV e o *software* Xcalibur. A pureza do sal foi determinada por um calorímetro exploratório diferencial (DSC), modelo DSC-50 (Schimadzu, Kyoto, Japão), obtendo-se um valor de 99,7 %.

Os comprimidos de *ecstasy* foram oriundos de apreensões realizadas pela Polícia Civil do Estado de São Paulo e cedidos pelo CEAP (Centro de Exames, Análises e Pesquisas) do IC (Instituto de Criminalística), após autorização judicial (anexo).

4.4. Separação cromatográfica dos enantiômeros da *R,S*(±)-MDMA

Esta etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, com a colaboração da Dra. Quezia B. Cass. O transporte de *R,S*(±)-MDMA.HCl até São Carlos foi autorizado judicialmente (anexo).

4.4.1. Avaliação das colunas quirais e condições cromatográficas

Para a separação semipreparativa dos enantiômeros de *R,S*(±)-MDMA por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram avaliadas várias colunas quirais (Tabela 2) e fases móveis conforme o modo de eluição empregado (Tabela 3).

Tabela 2 - Colunas quirais avaliadas.

Fase estacionária	Coluna	Seletor quiral	Tamanho da partícula	Dimensão da coluna
Glicopeptídeos Macrocíclicos	Chirobiotic V	vancomicina	5 µm	15,0 x 0,46cm
	Chirobiotic T	teicoplanina		
	Chirobiotic TAG	teicoplanina aglicona		
	Chirobiotic R	ristocelina A		
Ciclodextrina	Hibar ChiralDex	ciclodextrina	5 µm	25,0 x 1,0cm
Polissacarídeos	Chiralpak AD	tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	20 µm	10,0 x 1,0cm
	Chiralpak AS	tris [(S)-1-feniletilcarbamato] de amilose		15,0 x 0,46cm
	Chiralcel OD	tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose		24,0 x 1,0cm
Polímeros sintéticos	Kromasil KR100-16CH-TBB	(0,0'-bis[4-terc-butil-benzoil]-N,N'-dialil-L-tartadiamida	16 µm	25,0 X 1,0 cm
	P-CAP	trans-1,2-ciclo-hexanodiil-bis-acrilamida	5 µm	25,0 X 0,46 cm
	P-CAP DP	N,N'-[(1R,2R)-1,2-difenil-1,2-etanodil]bis-2-propenamida		
	DEAVB	trans-9,10-di-hidro-9,10-etanoantraceno-(11S,12S)-11,12-ácido dicarboxílico bis-4-vinilfenilamida		

As colunas baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos e ciclodextrina foram avaliadas no modo reverso e modo polar orgânico de eluição, enquanto que as de polissacarídeos e de polímeros sintéticos, no modo normal e polar orgânico.

Tabela 3 - Fases móveis e modos de eluição avaliados.

Modo de eluição	Fase móvel
Polar orgânico	acetonitrila (100 %), metanol (100 %) ou mistura desses dois eluentes
Normal	composições diferentes de <i>n</i> -hexano/etanol ou <i>n</i> -hexano/2-propanol; em alguns casos, a dietilamina foi usada com aditivo.
Reverso	metanol/água, acetonitrila/água, metanol /tampão acetato de amônio (pH 6) ou acetonitrila/tampão acetato de amônio (pH 6)

4.4.2. Coluna semipreparativa e condições cromatográficas selecionadas

A separação dos enantiômeros de *R,S*-MDMA foi realizada utilizando-se a coluna Hibar ChiralDex constituída de ciclodextrina como fase estacionária. A fase móvel consistiu de metanol:tampão acetato de amônio 0,1 M em pH 6 (70:30, v/v) com vazão de 3 mL.min⁻¹. A detecção foi conduzida a 270 nm e volume de injeção de 500 µL. As soluções de *R,S*-MDMA.HCl foram preparadas dissolvendo 160 mg do composto em 8 mL de fase móvel (10 mg.mL⁻¹ de cada enantiômero).

Os parâmetros cromatográficos como fator de retenção (*k*), fator de separação (α) e fator de resolução (*R_s*) foram calculados. O fator de retenção é a razão entre o número de moléculas do soluto na fase estacionária e o número de moléculas do soluto na fase móvel. O fator de separação mede a seletividade de separação entre duas bandas adjacentes. O fator de resolução é calculado a partir da distância entre dois picos adjacentes dividido pela média das larguras de suas respectivas bases. As purezas dos dois enantiômeros foram avaliadas utilizando as mesmas condições cromatográficas e coluna semipreparativa, com volume de injeção de 20 µL.

Para a separação semipreparativa dos enantiômeros de *R,S*-MDMA foi otimizada a técnica de reciclo. Após a eluição, o eluente foi evaporado em rotaevaporador e depois liofilizado. O produto final foi resuspendido em acetato de etila e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio para eliminar a presença de sais.

4.5. Animais

Ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso entre 180 e 220 g foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em salas com temperatura controlada (22 a 24 °C) e com ciclos de 12 horas de claro e escuro e receberam ração padrão e água *ad libitum* até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com a aprovação do projeto de pesquisa (protocolo nº 220) em 08 de junho de 2009 pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP (anexo).

A eutanásia dos animais e os procedimentos experimentais de coleta de material biológico foram conduzidos em animais anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de cetamina (75 mg/kg; Syntec, Hortolândia, SP) associada à xilazina (10 mg/kg; Syntec, Hortolândia, SP) em uma proporção 2:1 (v:v). A anestesia é atingida após um período de latência de 2 a 5 minutos com período hábil de 30 minutos para duração de seu efeito.

4.6. Delineamento experimental

Os animais foram elencados ao acaso em 4 grupos de 6 animais: *R,S-(±)*-MDMA, *R-(-)*-MDMA, *S-(+)*-MDMA e controle. Os três primeiros grupos foram tratados com duas doses consecutivas de 10 mg/kg das respectivas substâncias diluídas em solução salina, por *gavage*, com um intervalo de 24 horas entre as administrações. Os animais do grupo controle receberam idêntico volume (1 mL/kg) de solução salina 0,9 % pela mesma via e regime de dosagem. Doze horas após as administrações, os animais foram individualmente anestesiados e a seguir foram submetidos à perfusão cardíaca com solução salina 0,9 % gelada por meio de uma bomba peristáltica. A vazão utilizada foi de 40 mL.min⁻¹, recomendada para perfusão em ratos adultos.

4.7. Preparo das amostras biológicas e seus homogeneizados

4.7.1. Amostras biológicas

Após a perfusão cardíaca, o fígado, os rins e o estriado foram imediatamente removidos, mantendo-se as amostras imersas em gelo ao longo de todo o processo. O fígado foi inicialmente reduzido a pequenos fragmentos com o auxílio de uma tesoura; esses fragmentos foram misturados entre si, divididos em duas porções, uma foi reservada para a determinação de proteínas, glutathione-S-transferase (GST) e malonaldeído (MDA) e a outra para a determinação de glutathione total (GSHT). De igual forma, o estriado, após ser dissecado do cérebro, também foi dividido em duas porções visando às mesmas determinações e no caso dos rins, um deles foi destinado à realização da determinação de GSHT e o outro para os demais ensaios.

Os tecidos assim divididos foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o preparo dos homogeneizados (item 4.7.2.), com exceção do rim destinado para a determinação de GSHT, que foi homogeneizado de imediato, pois órgãos ricos em transpeptidases não devem ser congelados, uma vez que a transpeptidase cliva a glutathione reduzida quando o tecido é degelado (Anderson, 1985).

4.7.2. Homogeneizados

Um dos rins e uma porção dos fragmentos de fígado foram pesados e homogeneizados, com um volume de tampão fosfato $0,1\text{ M}$ pH 7 igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra (1:3 m:v). O homogeneizado foi centrifugado a 1.010 g por 20 minutos à temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante obtido foi reservado para determinação de MDA e quantificação de proteínas; o precipitado foi novamente centrifugado a 14.000 g por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O novo sobrenadante obtido foi reservado para determinação da atividade enzimática de GST e para a quantificação de proteínas.

O outro rim e a outra porção dos fragmentos de fígado foram pesados e homogeneizados em 5 volumes de uma solução gelada de ácido sulfossalicílico 5 % (m:v em água ultrapura) para desproteínização. Após centrifugação a 14.000 g por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante obtido foi reservado para determinação de GSHT, sendo analisado o mais rapidamente possível.

Uma porção do estriado foi pesado e homogeneizado diretamente em ultrassom com um volume de tampão fosfato 0,1M pH 7 igual a 15 vezes o valor absoluto da massa da amostra (1:15 m:v) mantendo-se em gelo o reservatório com a amostra. Esse homogeneizado foi posteriormente utilizado para determinação de MDA, atividade de GST e quantificação de proteínas. A outra porção do estriado, destinada a determinação de GSHT, foi pesada e homogeneizada diretamente em ultrassom, em 5 volumes de uma solução gelada de ácido sulfossalicílico 5 % (m:v em água ultrapura), sendo o homogeneizado analisado o mais rapidamente possível.

Todos os homogeneizados foram aliquotados e armazenados a -80 °C até o momento das análises. A Figura 8 ilustra a sequência das etapas envolvidas no preparo das homogeneizados.

4.8. Quantificação de proteínas (método de Bradford)

A quantificação de proteínas em fígado, rins e estriado de ratos foi realizada segundo o método espectrofotométrico de Bradford (1976), utilizando o kit da Bio-Rad (kit II, nº500-0002) de acordo com o protocolo do fabricante. O principal componente do reagente de Bradford é o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em meio ácido, que forma um complexo com a proteína. A medida da absorbância é lida em 595 nm e estável por 1 hora.

A curva de calibração foi construída com as seguintes concentrações de padrão de soro albumina bovina (BSA): 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 µg/µL. Cada ponto foi feito em triplicata e o cálculo de regressão linear foi realizado pelo método dos mínimos quadrados ($R^2 > 0,99$). Essa faixa de concentração foi selecionada, pois segundo o fabricante, o intervalo dinâmico da linearidade do método para ensaio em microplaca situa-se entre 0,05 µg/µL e aproximadamente 0,5 µg/µL.

Os homogeneizados de tecidos preparados inicialmente conforme o item 4.7. contém altas concentrações de proteína; portanto, foram diluídos para que a concentração de proteína de cada tecido pudesse ser lida dentro da faixa de linearidade estabelecida. Após tentativas no sentido de se estabelecer quais seriam as diluições adequadas, os homogeneizados de fígado e de rim foram diluídos com tampão fosfato 0,1 M pH 7 em uma proporção de 1:100 (v:v) e o homogeneizado de estriado, na proporção de 1:15 (v:v) (Figura 8).

Figura 8 - Fluxograma do preparo de homogeneizado de fígado, rins e estriado.

4.9. Determinação da atividade de Glutathione S-Transferase (GST)

O método para a determinação da atividade da GST presente em fígado, rins e estriado de ratos foi realizado com base no método de Habig *et al.* (1974), utilizando-se o modo cinético de leitura de um espectrofotômetro com leitor de microplacas.

As transferases são ativas com o composto 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Dessa forma, o ensaio mede a atividade de GST por meio da conjugação do CDNB com a GSH, dando origem ao aduto colorido 2,4 dinitro-fenil-glutathione (DNP-SG) (Figura 9). O aumento da absorbância do DNP-SG no comprimento de onda em 340 nm é diretamente proporcional à atividade de GST da amostra.

Figura 9 - Reação de CDNB com GSH utilizada para determinação da atividade de GST em 340 nm.

O intervalo dinâmico do ensaio é limitado pela linearidade da mensuração de absorbância. De acordo com o manual do equipamento onde foram realizadas as análises, a linearidade é de $\pm 1\%$ de 0 a 2,000 e $\pm 3\%$ de 2,000 a 2,500. Portanto, foi selecionado o intervalo entre 0 e 2 e as amostras muito concentradas foram diluídas.

A padronização do método foi conduzida segundo a condição acima descrita. Dessa forma, foram realizadas tentativas no sentido de estabelecer quais seriam as diluições adequadas dos homogeneizados de cada tecido, bem como a molaridade das soluções de CDNB em etanol absoluto e de GSH em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 (0,1 M ou 0,05 M) e seus respectivos volumes (5, 10 ou 20 μ L). A condição que ofereceu os melhores resultados foi selecionada: 10 μ L de solução de GSH 0,1 M e 5 μ L de solução de CDNB 0,05 M.

Os homogeneizados de fígado, rins e estriado preparados conforme o item 4.7. foram diluídos com uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 7 em uma

proporção 1:30, 1:10 e 1:1/3 (v:v), respectivamente. O aumento da absorbância foi monitorado em 340 nm à 25 °C, com leitura em intervalos de 30 segundos durante 5 minutos.

Como esse ensaio não se usa um substrato padrão, não é possível construir uma curva padrão. No entanto, pode-se calcular a quantidade de substrato utilizado na reação. Dessa forma, a atividade da GST é expressa em η moles do produto de reação gerado (DNP-SG) por minuto, a 25 °C, por mg de proteína.

A atividade é determinada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi \cdot b} \right] / \text{proteína}$$

Onde:

Atividade = atividade específica de GST ($\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$).

k = inclinação da curva (min^{-1})

ξ = 9,6 = coeficiente de extinção molar do DNP-SG ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

b = 0,524 = caminho óptico do poço (cm)

proteína = massa de proteínas totais utilizada no ensaio (mg)

Os valores de absorbância obtidos foram plotados em função do tempo, expresso em minutos, para obter o coeficiente angular (método dos mínimos quadrados) que corresponde à variação de absorbância por minuto, ou seja, $\Delta A_{340}/\text{min}$ ou pela letra k, na fórmula. Os resultados de absorbância obtidos da amostra foram descontados pelos valores do branco.

Os resultados foram expressos em atividade específica pela massa de proteína contida na reação. Para tanto, foi calculada a quantidade de massa de proteína presente em 20 μL de cada homogeneizado utilizado para o ensaio de GST ajustando com as diluições que foram feitas para a determinação de proteína.

4.10. Determinação de glutathiona total (GSHT)

Foi padronizado um método de reciclagem enzimática para determinação de glutathiona total para ser aplicado às amostras de fígado, rim e estriado de ratos, com base no método de Shaik & Mehvar (2006) utilizando-se o modo cinético de leitura de um espectrofotômetro com leitor de microplacas.

Como indicado na Figura 10, a GSH (glutathiona reduzida) reage com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) para formar o dissulfeto GSTNB (aduto glutathiona-5-tio-2-nitrobenzoato) e o cromóforo amarelo TNB (5-tio-2-nitrobenzoato). O aduto glutathiona-TNB (GSTNB) é reduzido pela GR (glutathiona redutase) na presença de NADPH, reciclando novamente a GSH para a reação. A taxa da formação de TNB, medida em 405 nm é proporcional à concentração de GSH presente na amostra.

Esse método foi utilizado para quantificar a glutathiona total (glutathiona reduzida + oxidada), em equivalentes de GSH, uma vez que a GSSG (glutathiona oxidada) é reduzida a duas moléculas de GSH pela ação da GR, altamente específica, e do cofator NADPH, que estão presentes no reativo de reação, denominado reagente de reciclagem (item 4.10.1).

Esse método também poderia ser utilizado para quantificar apenas a GSSG, empregando-se um reativo capaz de formar um complexo estável com a GSH livre que prevenisse sua participação na reação de reciclagem. Dessa forma, seria assegurada que a GSH encontrada no meio é proveniente apenas da redução da GSSG pela ação da GR.

Figura 10 - Método de reciclagem enzimática para quantificação de GSH e/ou GSSG. GSSG (glutathiona oxidada); GSH (glutathiona reduzida); GR (glutathiona redutase); DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico); TNB (5-tio-2-nitrobenzoato); GSTNB (aduto glutathiona-5-tio-2-nitrobenzoato).

4.10.1. Reagente de reciclagem

O reagente de reciclagem é constituído por três soluções-estoque (I, II e III) abaixo relacionadas, preparadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo EDTA 1 mM (tampão fosfato-EDTA).

- I. NADPH 0,75 mM
- II. DTNB 0,45 mM
- III. GR 16 unidades/mL

Essas soluções devem ser preparadas imediatamente antes do uso e somente misturadas no momento da leitura, seja da amostra ou padrão, na seguinte proporção: 40 μ L do reagente I; 50 μ L de II e 10 μ L de III. As concentrações finais desses reagentes nessa mistura são: 0,3 mM de NADPH; 0,225 mM de DTNB e 1,6 unidades de GR.

4.10.2. Construção da curva de calibração

Inicialmente, foram preparados a partir de uma solução estoque de GSH de 56,25 mM em água ultrapura, cinco pontos, em triplicata, nas seguintes concentrações: 0,9; 2,25; 4,5; 13,5 e 27 mM de GSH.

Uma alíquota de 20 μ L de cada ponto foi diluída com 100 μ L de solução gelada de ácido sulfossalicílico (SSA) a 5 % e a seguir, 10 μ L dessa solução foi diluída 500 vezes com 4990 μ L de tampão fosfato-EDTA. O branco foi preparado diluindo-se 10 μ L de solução de SSA a 5 % com 4990 μ L de tampão fosfato-EDTA. Uma alíquota de 50 μ L de cada solução foi transferida para a microplaca e tratada com 100 μ L de reagente de reciclagem, conforme descrito em 4.10.1. Imediatamente após a adição do reagente e breve agitação da microplaca, o aumento da absorbância foi monitorado em 405 nm a 30 °C, com leitura em intervalos de 30 segundos durante 4 minutos. Foram construídas curvas para cada ponto, pela análise de regressão linear da alteração na absorbância da amostra, que corresponde à velocidade da formação de TNB (que é proporcional à concentração inicial de GSH no poço da microplaca, ou seja, de 0,1 a 3 μ M, correspondendo à massa de 4,6 ng a 138,3 μ g).

A curva de calibração foi gerada a partir dos valores de coeficiente angular ($\Delta A/\text{min}$) obtidos em cada uma dessas curvas traçadas inicialmente, plotados contra suas respectivas concentrações padrões de GSH no poço da microplaca.

Os parâmetros da curva de calibração resultante foram determinados novamente pela análise de regressão linear.

4.10.3. Aplicação do método nas amostras biológicas

Uma alíquota de 10 μL dos homogeneizados de fígado, rim e estriado preparados conforme o item 4.7., também foram inicialmente diluídos 500 vezes com 4990 μL tampão fosfato-EDTA (volume total 5 mL), seguindo o mesmo protocolo descrito para as soluções padrão de GSH (item 4.10.2.).

A velocidade da formação de TNB, que é proporcional à concentração de glutathiona total da amostra, foi determinada pela análise de regressão linear da alteração na absorbância da amostra em 405 nm *versus* tempo durante 4 minutos em intervalos de 30 segundos. O valor de $\Delta A/\text{min}$ encontrado foi usado para calcular o conteúdo de glutathiona na amostra por comparação com a curva de calibração obtida em 4.10.2. Esse valor obtido pela curva é 1500 vezes menor que o encontrado no volume inicial de 5 mL de homogeneizado de tecido com solução de SSA 5 %, que por sua vez, é 200 vezes maior que a massa (μM) de glutathiona em 1 g de tecido. Ou seja, para encontrar a massa de glutathiona total em 1 g de tecido, basta multiplicar o resultado da concentração obtida por meio da curva de calibração pelo fator 7,5.

4.11. Determinação de malonaldeído (MDA)

Foi padronizado um método para a determinação de malonaldeído (MDA) em amostras de fígado, rins e estriado de ratos com base no método descrito por Templar *et al.* (1999) e Hong *et al.* (2000) em que o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo um aduto de cor vermelha, $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$, determinado por CLAE-fluorescência (λ_{exc} 515 nm, λ_{em} 543 nm) (Figura 11).

Figura 11 - Reação entre malonaldeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o aduto colorido $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$, detectado por CLAE-fluorescência (λ_{exc} 515 nm, λ_{em} 543 nm).

4.11.1. Curva de calibração

Uma curva de calibração com concentrações conhecidas de MDA foi construída a partir de uma solução estoque de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), que nas condições ácidas do teste sofre hidrólise e libera MDA. Utilizando como padrão o TMP, foi preparada uma solução estoque de 10 mMolar em solução de H₂SO₄ a 1 %, com posterior incubação à temperatura ambiente por 2 horas.

A solução estoque foi diluída 600 vezes para obtenção da solução de uso, a qual foi analisada em um espectrofotômetro da Biochrom Libra S12 (Inglaterra), *software* BioDC versão 2.0., em 245 nm contra um branco de H₂SO₄ a 1 %, para obtenção de sua concentração de MDA por meio da fórmula: $\text{Conc} = \text{Abs} / 13700$. A partir desse dado, partindo-se da solução de uso, foram preparados os pontos da curva de calibração nas concentrações: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10 e 12 µM de MDA em tampão fosfato 0,5 M pH 7, em um volume final de 1000 µL. O ponto branco foi preparado por uma mistura composta pelo mesmo volume de tampão fosfato contido no ponto mais concentrado da curva (12 µM), completando o restante do volume (q.s.p. 1000 µL) com solução H₂SO₄ a 1 %. Tanto os pontos da curva de calibração, como o branco e as amostras biológicas a serem analisadas passaram pelo mesmo procedimento analítico descrito a seguir (item 4.11.2.).

4.11.2. Preparo da amostra e procedimento analítico

Os homogeneizados de fígado e rins preparados conforme o item 4.7. foram diluídos em uma proporção de 1:30 e 1:5 (v:v), respectivamente, com tampão fosfato 0,1 M pH 7. No caso do estriado, foi utilizado o próprio homogeneizado preparado conforme o item 4.7., ou seja, na proporção de 1:15, sem proceder qualquer diluição.

O procedimento analítico do método otimizado proposto neste trabalho está esquematizado na Figura 12. Inicialmente, um antioxidante (hidroxitolueno butilado, BHT) é adicionado na amostra ou na solução padrão e é procedida uma hidrólise alcalina (NaOH) para obtenção de MDA livre de proteínas teciduais. A seguir, é feita uma desproteinização pela adição de solução de ácido tricloacético (TCA) e iodeto de potássio (KI). Após derivatização com ácido tiobarbitúrico (TBA), o aduto de cor vermelha MDA-(TBA)₂ é formado e extraído com *n*-butanol.

Uma alíquota dessa fase é injetada no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor fluorimétrico.

As incubações com agitação e controle de temperatura (60 °C e 90 °C) foram realizadas em incubadora da Labnet International, modelo Vortemp 56 (Woodbridge, New Jersey, USA), utilizando ainda tubos com tampa de rosca para prevenir a abertura accidental das tampas e vazamento das amostras durante o aquecimento.

Figura 12 - Fluxograma do método proposto para determinação de malonaldeído em fígado, rim e estriado de ratos.

4.11.3. Condições cromatográficas

A separação foi realizada em uma coluna Luna C18 (150 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex (Torrance, CA), protegida com uma pré coluna C18 (4 mm x 3 mm) da Phenomenex (Torrance, CA), com fluxo isocrático de 1 mL.min⁻¹ de fase móvel, a qual consistiu de uma mistura de 35 % de metanol e 65% de tampão fosfato 50 mM em pH 7. As temperaturas do amostrador e da coluna mantiveram-se em 4 °C e 30 °C, respectivamente. A detecção foi realizada fluorimetricamente a uma excitação de 515 nm e emissão de 543 nm. O tempo total de análise foi de 10 minutos e o tempo de retenção do MDA foi de aproximadamente 3 minutos.

4.12. Análise estatística

Foram calculadas as médias e os erros padrões da média para cada uma das medidas realizadas e dos grupos estudados. Utilizou-se o teste *t* de *Student* para dados não pareados, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$ (nível de significância de, pelo menos, 5 %). A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism for Windows versão 5.0. (GraphPad Software INC., São Diego, EUA).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Separação dos enantiômeros do *R,S*-(±)-MDMA.HCl

Os parâmetros cromatográficos medidos para os enantiômeros resolvidos de *R,S*-(±)-MDMA foram:

- fator de retenção do primeiro enantiômero *R*-(-)-MDMA (k_1)=1,07
- fator de retenção do segundo enantiômero (*S*)-(+)-MDMA (k_2)=1,19
- fator de separação (α)=1,11
- fator de resolução (R_s)=0,84

Devido à baixa capacidade de discriminação quiral da fase de ciclodextrina, foi utilizada a técnica de reciclo (Figura 13). Após a otimização do método, 10 mg do racemato dissolvidos em 500 μ L da fase móvel foram injetados na coluna. Um total de quatro ciclos foi necessário para a separação dos enantiômeros. Com esta técnica foi possível resolver 160 mg de racemato (16 injeções de 10 mg), de forma automatizada, em um processo contínuo durante um dia e meio (36 horas). Apesar do tempo de eluição de cada injeção ser alto, ou seja, 135 minutos, a coleta dos enantiômeros durou 21 minutos. No total foram gastos 2.160 minutos (36 horas) de corrida e 336 minutos (5,6 horas) de coleta dos enantiômeros para completar o processo de separação (Figura 13).

Figura 13 - Separação cromatográfica de *R,S*-(±)-MDMA. a) condições diluídas, b) reciclo (as linhas pontilhadas indicam as zonas coletadas). O primeiro enantiômero (*R*-(-)-MDMA) foi coletado nos intervalos de 47,1 a 47,4 min; 73,9 a 74,14 min e 101,1 a 102,92 min. O segundo enantiômero (*S*-(+)-MDMA) foi coletado em 54,74 a 57,51min; 81,94 a 84,05 min; 107,5 a 112,24 min e 130,2 a 134,93 min.

A Figura 14 ilustra a ordem de eluição e a pureza dos enantiômeros, a qual foi determinada por dicróismo circular; o enantiômero *R*-(-)-MDMA elui primeiro que o *S*-(+)-MDMA.

Figura 14 - Ordem de eluição e pureza dos enantiômeros da MDMA em ciclodextrina (Hibar ChiralDex) com fase móvel metanol:tampão acetato de amônio 0,1 M em pH 6 (70:30, v:v).

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a separação de *R,S*-(±)-MDMA. O primeiro enantiômero (*R*) apresentou 99 % de pureza e 56 % de recuperação (45 mg coletados de 80 mg) enquanto que o segundo enantiômero (*S*) apresentou 96 % de pureza e 93 % de recuperação (75 mg coletados de 80 mg).

Tabela 4 - Resultados da separação dos enantiômeros de *R,S*-(±)-MDMA.

		Valores
<i>(R)</i> -(-)-MDMA	Razão enantiomérica (%)	99,0
	Massa coletada (mg)	45,0
	Velocidade de produção (mg/dia)	30,0
	Recuperação (%)	56,0
<i>(S)</i> -(+)-MDMA	Razão enantiomérica (%)	96,0
	Massa coletada (mg)	75,0
	Velocidade de produção (mg/dia)	50,0
	Recuperação (%)	93,0
Consumo de solvente (L)		1,00

5.2. Curva de calibração para determinação de glutathiona total (GSHT)

Os gráficos obtidos do tempo decorrido da formação de TNB, consequência da reação de reciclagem das soluções padrões contendo diferentes concentrações de GSH e sua curva de calibração representativa estão ilustradas na Figura 15 A. Houve um aumento linear da absorbância durante o período de 4 minutos para todas as concentrações estudadas. A inclinação de cada uma dessas retas ($\Delta A/\text{min}$), após a correção com a inclinação da amostra branca, plotadas contra suas respectivas concentrações de GSH (0,1 - 3 μM) resultou numa relação linear ($R^2=0,9987$) (Figura 15 B).

Figura 15 - (A) Absorbância das concentrações iniciais de GSH no poço da microplaca (0 - 3 μM) em função do tempo; (B) Curva de calibração resultante plotada com os valores de $\Delta A/\text{min}$ versus concentrações de GSH (0,1 - 3 μM). Cada ponto é a média das medidas feitas em triplicata.

5.3. Curva de calibração para determinação de malonaldeído (MDA)

O método mostrou-se linear no intervalo dinâmico considerado (0,25 - 12 μM de MDA com um coeficiente de correlação linear calculado pela regressão linear dentro dos limites estabelecidos ($R^2 > 0,98$) (Figura 16).

Figura 16 - Curva de calibração de MDA, equação da reta e coeficiente de correlação linear.

Figura 17 - Cromatograma típico de amostra de fígado do grupo tratado com *R,S*-($\pm$)-MDMA e analisada conforme o método proposto para determinação de MDA.

5.4. Efeito da MDMA e de seus enantiômeros sobre a GST, GSHT e MDA

A Tabela 5 ilustra os resultados da atividade de glutathione-S-transferase (GST) e dos níveis de glutathione total (GSHT) e de malonaldeído (MDA), encontrados em amostras de tecido hepático, renal e estriatal de ratos tratados com salina, *R,S*-MDMA, *R*-(-)-MDMA e *S*-(+)-MDMA.

A análise estatística dos dados mostrou que o grupo dos animais tratados com o racêmico e o enantiômero *R* apresentou uma diminuição da glutathione total no fígado em relação aos demais grupos e não diferiram entre si ($F(3,20)=13,77$; $p<0,0001$). Com relação ao rim, a análise estatística dos dados mostrou que o grupo dos animais tratados com a mistura racêmica e seus enantiômeros (*R* e *S*) apresentou uma diminuição da glutathione total em relação ao grupo salina e não diferiram entre si ($F(3,20)=21,56$; $p<0,0001$).

A análise estatística dos dados mostrou que o grupo dos animais tratados com o enantiômero *S* apresentou uma diminuição da atividade de GST no estriado em relação aos demais grupos ($F(3,19)=10,65$; $p=0,0003$).

A análise estatística dos dados mostrou que o grupo dos animais tratados com o enantiômero *R* apresentou um aumento da produção de MDA no fígado em relação aos demais grupos ($F(3,16)=18,48$; $p<0,0001$).

Tabela 5 - Níveis de GSHT ($\mu\text{M.g de tecido}^{-1}$), atividade de GST ($\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) e níveis de MDA ($\mu\text{M.mg de proteína}^{-1}$) em amostras de fígado, rim e estriado de ratos tratados com *R,S*-($\pm$)-MDMA ou seus enantiômeros (*R*-(-)-MDMA ou *S*-(+)-MDMA).

Grupos					
	Tecido	Salina	<i>R,S</i> -($\pm$)-MDMA	<i>R</i> -(-)-MDMA	<i>S</i> -(+)-MDMA
GSHT	Fígado	6,01 $\pm$ 0,61	4,39 $\pm$ 0,79*	4,82 $\pm$ 0,69*	6,43 $\pm$ 0,18
	Rim	1,87 $\pm$ 0,07	1,34 $\pm$ 0,09*	1,18 $\pm$ 0,03*	1,16 $\pm$ 0,08*
	Estriado	0,89 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,05
GST	Fígado	2,08 $\pm$ 0,06	2,21 $\pm$ 0,11	2,06 $\pm$ 0,20	2,34 $\pm$ 0,08
	Rim	0,30 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,01
	Estriado	0,25 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01*
MDA	Fígado	10,32 $\pm$ 1,16	10,37 $\pm$ 0,74	19,51 $\pm$ 1,57*	9,58 $\pm$ 0,70
	Rim	4,96 $\pm$ 0,70	5,91 $\pm$ 0,72	4,28 $\pm$ 0,36	4,93 $\pm$ 0,55
	Estriado	8,68 $\pm$ 1,55	11,60 $\pm$ 0,95	9,50 $\pm$ 1,07	9,81 $\pm$ 1,05

GSHT (glutathiona total); GST (glutathiona-S-transferase); MDA (malonaldeído). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos e não diferem entre si. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações, $n=6$ animais/grupo para GST e GSHT; $n=5$ para MDA.

Figura 18 - Níveis de GSHT ($\mu\text{M.g de tecido}^{-1}$), atividade de GST ($\text{nmol.min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$) e níveis de MDA ($\mu\text{M.mg de proteína}^{-1}$) em amostras de fígado, rim e estriado de ratos tratados com *R,S*($\pm$)-MDMA ou seus enantiômeros (*R*(-)-MDMA ou *S*(+)-MDMA). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos e não diferem entre si. Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações, $n=6$ animais/grupo para GST e GSHT; $n=5$ para MDA. GSHT (glutathiona total); GST (glutathiona-S-transferase); MDA (malonaldeído).

Discussão

7. DISCUSSÃO

O potencial neurotóxico, hepatotóxico, nefrotóxico e cardiotoxico da MDMA tem sido alvo de intenso estudo nas últimas duas décadas. Sem dúvida alguma, o metabolismo da MDMA, resultando na formação de metabólitos altamente reativos, como a N-Me- α -MeDA e α -MeDA, capazes de gerar ERO/ERN e de se conjugarem com a glutatona (Figura 6), é um fator crucial no estresse oxidativo e nos danos celulares induzidos pela MDMA nesses tecidos.

Como já é de conhecimento que após a administração de *R,S*-MDMA em humanos, o *S*-MDMA é biotransformado mais rapidamente que a forma *R*, é de se esperar que sejam formadas maiores quantidades de *S*-N-Me- α -MeDA em relação à forma *R*. Portanto, muito provavelmente, a forma *S* tenha um maior potencial para gerar ERO/ERN e dano oxidativo nos tecidos do que a forma *R*.

Partindo desse princípio, o presente trabalho teve como objetivo avaliar qual seria a contribuição individual de cada enantiômero da MDMA isoladamente, tendo como referência a mistura racêmica, no estresse oxidativo hepático renal e estriatal de ratos.

Para investigar essa hipótese, foi imprescindível a obtenção da mistura racêmica de MDMA, bem como de seus enantiômeros isolados. No entanto, o cloridrato de MDMA (MDMA.HCl) racêmico e seus enantiômeros não são comercialmente disponíveis no Brasil. Diante desse fato, optou-se por extrair o MDMA.HCl de amostras de comprimidos de *ecstasy* apreendidos. Para tanto, obtivemos uma autorização judicial (anexo) para utilização dessas amostras no desenvolvimento da atual pesquisa. Uma vez de posse desses comprimidos, foi realizada a extração de MDMA.HCl, tomando-se como base o método preconizado por LAPACHINSKE *et al.* (2009) e obtendo-se cristais com alto grau de pureza - 99,7% - que foi medida por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Quanto à obtenção dos enantiômeros, duas abordagens poderiam ter sido utilizadas: a) síntese assimétrica do enantiômero desejado, que requer o desenvolvimento de duas vias sintéticas, para cada enantiômero e b) resolução da mistura racêmica em enantiômeros individuais, que tem a vantagem de produzir ambos enantiômeros de uma só vez (Miller & Potter, 2008).

Dentre as várias técnicas desenvolvidas para essa finalidade, a cromatografia líquida de alta eficiência em fase estacionária quiral (CLAE-FEQ) é a mais amplamente utilizada por constituir uma resposta rápida, rentável e efetiva na obtenção de enantiômeros com elevado grau de pureza, tanto em escalas preparativas como semipreparativas. Deve-se ressaltar que, na última década, essa técnica tem sido extensivamente utilizada na pesquisa farmacêutica, uma vez que a quiralidade de fármacos e medicamentos tem se mostrado um importante tema do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e regulador, havendo um grande interesse na obtenção de enantiômeros puros, (Miller & Potter, 2008, Zhang *et al.*, 2005; Silva-Junior *et al.*, 2006).

Portanto, optou-se por realizar a separação enantiomérica da mistura racêmica, a partir dos cristais de MDMA.HCl extraídos das amostras apreendidas, empregando-se a CLAE-FEQ em escala semipreparativa (multimiligramas).

Os efeitos dos enantiômeros isolados da MDMA *in vivo* também tem sido objeto de vários estudos recentes na literatura para obter um melhor entendimento dos efeitos biológicos da mistura racêmica em humanos (Murnane *et al.*, 2009; Fantergrossi *et al.*, 2009; Murnane *et al.*, 2010; McClung *et al.*, 2010; Huot *et al.*, 2010; von Ameln *et al.*, 2010). No entanto, esses compostos não são disponíveis comercialmente, quer no Brasil, quer no exterior. A maioria dos estudos sobre esse tema utilizou o *R*-MDMA e o *S*-MDMA fornecidos pelo “National Institute on Drug Abuse” (NIDA) (Murnane *et al.*, 2009; Murnane *et al.*, 2010; McClung *et al.*, 2010; Fantergrossi *et al.*, 2009). Huot *et al.* (2010) sintetizaram o *R*(-) e o *S*(+)MDMA por meio de uma síntese assimétrica, envolvendo a reação de abertura estereoseletiva de aziridinas quirais, pela adição de reagente de Grignard. Por outro lado, von AMELN *et al.* (2010) não reportaram como sintetizaram os enantiômeros de MDMA.

A única referência encontrada na literatura que faz menção do uso de CLAE-FEQ para a separação racêmica de MDMA é a de MEYER *et al.* (2008), que empregou uma coluna semipreparativa de ciclodextrina.

Dessa forma, decidiu-se avaliar não somente a coluna de ciclodextrina utilizada por MEYER *et al.* (2008), como várias outras fases estacionárias e seletores quirais (Tabela 2), fases móveis e modo de eluição (Tabela 3), no sentido de verificar qual condição teria a melhor resposta na enantioseparação da MDMA.

Embora vários seletores quirais tenham sido avaliados, de fato, o de ciclodextrina foi o único capaz de discriminar os enantiômeros da MDMA, apesar da baixa enantioseletividade ($\alpha = 1,11$) e enantioresolução ($R_s=0,84$) (Figura 13).

As ciclodextrinas (CDs) são polissacarídeos cíclicos com forma similar à de um cone truncado. A cavidade interna das CDs é relativamente hidrofóbica devido à ausência de grupos hidroxila livres orientados para o interior da cavidade enquanto que as bordas da cavidade são hidrofílicas, devido à presença de grupos hidroxilas primários e secundários. Para que ocorra o reconhecimento quiral, os enantiômeros entram, pelo menos parcialmente, na cavidade das moléculas de ciclodextrina formando complexos diastereoisoméricos. Estes complexos de inclusão são estabilizados por interações dipolo-dipolo induzido, dispersões de London e estéricas entre os enantiômeros do analito e a fase estacionária. Interações secundárias do tipo ligações de hidrogênio, entre os grupos hidroxila da superfície externa da ciclodextrina e parte da molécula do analito que ficou fora da cavidade, também contribuem para a estabilização dos complexos diastereoisoméricos (Lourenço *et al.*, 2010; Bonato *et al.*, 2005).

Muito provavelmente a enantioseparação ocorreu devido à reação entre o anel aromático da MDMA e as moléculas de ciclodextrina na formação do complexo de inclusão (Ali *et al.*, 2005). Esse complexo também foi estabilizado pelas interações do tipo ligação de hidrogênio da amina secundária e dipolo-dipolo do grupo metila da MDMA.

A técnica do reciclo foi empregada para aumentar o limite de carga da coluna e mostrou bons resultados, conforme apresentado na Tabela 4

Portanto, a técnica de separação enantiomérica da MDMA racêmica desenvolvida no presente trabalho, mostrou-se eficaz e representou uma melhoria em relação à técnica empregada por MEYER *et al.* (2008). Além da obtenção de um melhor rendimento do isômero S (93% contra 60% dos referidos autores), é econômica, com menos etapas e com menor descarte de efluentes, uma vez que foram consumidos apenas 1L de solvente em todo o processo (Tabela 4).

Para avaliar a indução do estresse oxidativo, foram medidas a atividade da glutathione-S-transferase (GST), a determinação de glutathione total (GSHT) e a determinação de malonaldeído (MDA).

A determinação da atividade de GST em fígado, rins e estriado de ratos foi baseado no método descrito por HABIG *et al.* (1974). Porém, para otimização e

padronização do método para os tecidos mencionados, foi necessário estabelecer as concentrações adequadas da enzima contida nas amostras bem como a molaridade e volume dos reagentes específicos a serem utilizadas no ensaio.

Segundo TORRES *et al* (2004), baixas concentrações da enzima GST não favorecem à linearidade da reação. Portanto, foi necessário realizar várias tentativas para selecionar a diluição adequada dos homogeneizados de cada tecido que oferecia a maior linearidade dentro do intervalo de leitura de medida de absorbância entre 0 a 2,0, chegando-se aos seguintes valores: fígado (diluição 1:30 do homogeneizado original 1:3), rim (diluição 1:10 do homogeneizado original 1:3) e estriado (homogeneizado original 1:15, sem posterior diluição).

Também foi necessário estabelecer a molaridade das soluções de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em etanol absoluto e de GSH em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5 e seus respectivos volumes adicionados ao meio de reação. O pH do meio também é crítico, mas ficou estabelecido o valor de 6,5, pois segundo HABIG *et al.* (1974), é o pH ótimo a ser utilizado.

A atividade da GST aumenta linearmente até a concentração de 0,25 mM do substrato CDNB; a partir desse valor há uma diminuição da taxa de reação até a concentração de 1 mM, acima da qual começa a se estabilizar. Portanto, é recomendado que o substrato (CDNB) e o cofator (GSH) sejam adicionados em excesso, pois em concentrações acima do nível de saturação, as suas velocidades iniciais de reação são de ordem zero e o único fator limitante para a velocidade do sistema torna-se apenas a concentração de enzima em estudo (Habig *et al.*, 1974; Torres *et al.*, 2004).

Após várias tentativas, os melhores resultados foram selecionados: 5 µL de solução de CDNB a 0,05 M em etanol absoluto, correspondendo a 1,25 mM por poço e 10 µL de solução de GSH 0,1 M em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5, correspondendo a 5 mM por poço.

Com relação aos métodos capazes de medir o conteúdo total de glutatona, o mais amplamente utilizado é o clássico método espectrofotométrico de reciclagem enzimática de TIETZE (1969), devido à sua simplicidade, sensibilidade e baixo custo. É mais rápido que as técnicas cromatográficas e é específico devido a alta especificidade da glutatona redutase (GR). BAKER (1990) adaptou o método para leitura em microplaca e mais recentemente, SHAIK & MEHVAR

(2006) validaram um método para aplicação em amostras de fígado e bile de ratos.

Frente a essas informações, optou-se padronizar um método para a determinação de glutathiona total com base no método de SHAIK & MEHVAR (2006).

Uma vez que a glutathiona reduzida (GSH) rapidamente se oxida de forma não enzimática e também por ser um substrato da γ -glutamiltanspeptidase (γ -GT), assim como a glutathiona oxidada (GSSG), as amostras biológicas precisam ser acidificadas rapidamente para reduzir a oxidação de GSH para GSSG e para outros dissulfetos mistos, como também para inativar a γ -GT. Vários ácidos como pícrico, metafosfórico, tricloroacético e perclórico tem sido usados para desproteinização. Dentre eles, o ácido pícrico (1% m/v) e 5-sulfossalicílico (geralmente 5%, m/v) são preferíveis. Optou-se pelo ácido 5-sulfossalicílico, pois também foi utilizado nos trabalhos de GRIFFITH (1980), ANDERSON (1985), BAKER (1990), SHAIK & MEHVAR (2006).

Para a avaliação da lipoperoxidação, os métodos clássicos utilizam a reação de MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo um aduto de cor vermelha MDA-(TBA)₂ detectável por meio de leitura espectrofotométrica em 532 nm. Esses métodos são muito questionados por sua inespecificidade já que o TBA também reage com uma série de compostos como açúcares, aminoácidos, certos aldeídos, bilirrubina, ácido salicílico, prostaglandina e desoxirribose, denominados TBARS (substâncias reativas ao TBA). Esses interferentes acabam superestimando a concentração de MDA presente na amostra tanto nas determinações colorimétricas quanto fluorimétricas (Grotto *et al.*, 2007).

Nesse sentido, métodos que utilizam a CLAE para separação do MDA de compostos interferentes são mais específicos, confiáveis e reprodutíveis (Grotto *et al.*, 2007). A detecção pode ser realizada por fluorescência ou por espectrofotometria no UV (Antunes *et al.*, 2008, Del Rio *et al.*, 2005).

Portanto, optou-se por padronizar um método utilizando a CLAE, com base nos métodos descritos por TEMPLAR *et al.* (1999) e HONG *et al.* (2000), com detecção fluorimétrica.

Como a MDA é ligada cerca de 90% à proteína plasmática (Hong *et al.*, 2000), foi incluída a etapa de hidrólise alcalina para garantir a completa liberação do MDA às proteínas teciduais e um aumento significativo de sua detecção.

A aplicação de uma etapa desproteinizante da amostra utilizando TCA antes da incubação com TBA, resulta no aumento de mais de três vezes no tempo de vida útil da coluna de separação, mantendo a sensibilidade do teste e excluindo qualquer etapa exaustiva de pré-tratamento da amostra (Templar *et al.*, 1999).

Para evitar valores superestimados de MDA, foram adicionados o BHT, um antioxidante e o iodeto de potássio (KI), que atua reduzindo possíveis hidroperóxidos lipídicos formados; dessa forma é bloqueada uma nova iniciação de lipoperoxidação durante o ensaio (Hong *et al.*, 2000).

Quanto à seleção do regime de dosagem de (*R,S*) MDMA e seus enantiômeros, foi adotado o procedimento de MOON *et al.* (2008); ou seja, a administração de duas doses consecutivas de 10 mg/kg diluídos em solução salina, por *gavage*, com um intervalo de 24 h entre elas. A eutanásia e coleta de tecidos foi realizada 12 h após a segunda administração. Nessas condições, conforme MOON *et al.* (2008), foi observado o início das alterações das proteínas mitocondriais, que podem levar à disfunção mitocondrial e dano hepático, em consequência do aumento do estresse oxidativo, conforme descrito no item 2.1.2. Esse achado justifica o protocolo utilizado no presente trabalho. Doses maiores (20 mg/kg) e múltiplas exposições causam um grave dano hepático (necrose).

Interessante ressaltar que humanos são mais sensíveis ao MDMA que os ratos. Por exemplo, segundo NINKOVIC *et al.* (2008), o efeito produzido após a administração oral de 10-20 mg/kg em ratos é semelhante ao produzido após a administração oral de 1,7 mg/kg em humanos. Considerando um homem de 70 kg, a dose seria ao redor de 119 mg, o que corresponde ao usualmente encontrado em um comprimido de *ecstasy* (50-150 mg).

Muito provavelmente um dos motivos da maior sensibilidade dos humanos em relação aos ratos, reside na diferença da etapa enantioseletiva da biotransformação da MDMA. Enquanto no homem a via principal é a O-desmetilação, que leva a maior formação de (*R,S*)-N-Me- α -MeDA, nos ratos, é a etapa da N-desmetilação, que forma mais (*R,S*)- α -MeDA. Segundo CARVALHO *et al.*, 2004, os efeitos tóxicos induzidos pela (*R,S*)-N-Me- α -MeDA são mais pronunciados do que aqueles encontrado no metabólito catecol (*R,S*)- α -MeDA.

O papel dos metabólitos reativos na hepatotoxicidade induzida pela MDMA foi estudada por CARVALHO *et al.*, 2004a, 2004c, usando suspensões de

hepatócitos isolados de rato. Nesses estudos, os efeitos da MDMA, MDA, N-Me- α -MeDA e α -MeDA foram avaliados sobre a viabilidade celular, níveis de glutathiona e nas atividades da GR, GPx e GST. A MDMA e seus metabólitos diminuíram os níveis de glutathiona reduzida (GSH) de uma forma dependente da concentração e do tempo de incubação. Esse efeito foi significativo para a N-Me- α -MeDA, nas maiores concentrações estudadas (0,8 e 1,6 mM) e para α -MeDA na maior concentração (1,6 mM), sendo acompanhada por uma maior perda de viabilidade celular. Entretanto, a depleção de GSH não foi acompanhada por um aumento proporcional de formação de GSSG, o que indica que a depleção dos níveis de GSH foi devido à formação de conjugados intracelulares com a GSH.

Nossos resultados mostraram que o conteúdo hepático de glutathiona total dos ratos do grupo *R,S*-MDMA e do grupo *R*-MDMA, foi significativamente menor do que os do controle e os do *S*-MDMA (Figura 18). A depleção de glutathiona hepática após exposição da MDMA racêmica *in vivo* já havia sido relatada por outros autores. MOON et al. (2008), que empregou o mesmo desenho experimental que o presente trabalho, mostrou que a razão GSH/GSSG diminuiu de $47,3 \pm 7,1$ a $29,1 \pm 15,6$. Segundo BEITIA et al. (2000), 3 e 6 horas após um tratamento repetido por quatro dias consecutivos de 20 mg/kg de MDMA em ratos, os níveis de glutathiona reduziram 22% e 27%, respectivamente. No entanto, esses autores não encontraram diferença do conteúdo de glutathiona hepática, 3 e 6 horas após a administração de uma única dose de 20 mg/kg de MDMA.

Mas nossos resultados revelaram que é o enantiômero *R* que contribui para a depleção de glutathiona hepática induzida pela mistura racêmica. Como já foi referido anteriormente, em ratos, a forma *R* biotransforma mais rapidamente que a *S* e, portanto, é de se esperar que quando o isômero *R* é administrado isoladamente, produza maiores quantidades de metabólitos *o*-quinonas, que por sua vez, geram mais ERO/ERN e metabólitos reativos conjugados com GSH comparativamente com a administração isolada do isômero *S*. Dessa forma, os níveis hepáticos de glutathiona diminuem significativamente após o tratamento dos animais com a forma *R* isoladamente. No caso do isômero *S*, como a quantidade dos metabólitos *o*-quinonas é bem menor, a função antioxidante da glutathiona consegue ser efetiva. Quanto à administração da MDMA racêmica, a geração de ERO/ERN induzida pelo isômero *R* é grande o suficiente para provocar uma depleção significativa da glutathiona, mesmo na metade da dose.

A alta reatividade do enantiômero *R* no fígado também pode ser constatada nos animais tratados apenas com *R*-MMDA, uma vez que houve uma produção significativamente aumentada de MDA, comparativamente aos outros grupos tratados e o controle (Figura 18).

No entanto, após o tratamento com a mistura racêmica, em que o enantiômero *R* se encontra na metade da dose, a lipoperoxidação é inibida. Esses resultados não estão de acordo com os observados por MOON *et al* (2008), que encontraram um aumento significativo da MDA, de $26,1 \pm 2,0$ a $43,3 \pm 8,1$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, após a administração da MDMA racêmica no mesmo esquema de dosagem que utilizamos. Uma possível explicação seria que a linhagem de ratos utilizada, Sprague-Dawley, seja mais sensível a esse efeito que os da linhagem Wistar. BEITIA *et al.* (2000) não encontraram diferença significativa no fígado após tratamento agudo com 20 mg/kg, 3 e 6 horas após a administração, mas encontrou aumento da lipoperoxidação após tratamento crônico por 4 dias consecutivos.

No caso da administração isolada do isômero *S*, conforme esperado, não foi observado um potencial peroxidativo significativo, o que corrobora sua menor reatividade hepática comparada ao enantiômero *R*.

Esses resultados mostraram que uma das primeiras consequências do metabolismo hepático da MDMA é a quebra da manutenção da homeostasia pelo grupamento sulfidríla. Como a glutatona é um antioxidante crítico para a função e sobrevivência celular, sua depleção deixa as células mais vulneráveis aos efeitos dos compostos reativos e dos ERO/ERN que são formados, dando início à cascata de eventos que levam ao dano oxidativo.

Os estudos de CARVALHO *et al.*, 2004a, 2004c em suspensões de hepatócitos isolados de ratos acima referidos, também mostrou um decréscimo das atividades das enzimas antioxidantes (GR, GPx e GST) para a N-Me- α -MeDA nas maiores concentrações estudadas (0,8 e 1,6 mM) e para α -MeDA na maior concentração (1,6 mM). Essa inibição pode estar relacionada à oxidação ou alquilação dos grupos sulfidrílas presentes no sítio da enzima ativa. Outros trabalhos já mostraram que as o-quinonas e os conjugados de GSH causam inibição irreversível de enzimas que possuem sulfidrílas no sítio da enzima e / ou resíduos de cisteína, que são críticos para a função enzimática (Bindoli *et al.*,

1992.; Ploemen *et al.*, 1991; Monks *et al.*, 2004). A inibição dessas enzimas pode aumentar o estresse oxidativo resultante da oxidação dos metabólitos.

Nossos resultados relativos à atividade de GST hepática, não mostrou diferença significativa em nenhum dos grupos tratados quando comparados com o controle. Provavelmente, a dose utilizada, de 10 mg/kg de MDMA por dois dias consecutivos não foi suficientemente alta para mostrar uma diferença significativa, uma vez que a inibição é concentração dependente. Mesmo a administração de 20 mg/kg de MDMA por quatro dias consecutivos também não apresentou diferença de atividade de GST em relação ao controle, 3 e 6 horas após a última administração, conforme estudo de BEITIA *et al.* (2000).

Com relação aos resultados da atividade de GST nas amostras de rim, também não houve diferença significativa em nenhum dos grupos tratados quando comparados com o controle, muito provavelmente, também, pela baixa dose de MDMA utilizada, insuficiente para que a produção das o-quinonas e os conjugados com GSH causassem uma inibição irreversível da enzima.

Nossos resultados mostraram que o conteúdo renal de glutathiona total foi significativamente menor para todos os grupos tratados quando comparados com o controle, inclusive para o enantiômero S, que no fígado era menos reativo (Figura 18). Essa maior susceptibilidade dos rins em relação à depleção da glutathiona comparado com o fígado pode ser explicada pelo fato dos rins possuírem um menor conteúdo de glutathiona e altos níveis de γ -GT, dipeptidases e N-acetiltransferase. Essas enzimas reagem com os adutos de glutathiona resultantes da biotransformação de MDMA no fígado, formando conjugados com cisteína e N-acetilcisteína (Figura 6). Os conjugados com GSH, cisteína e N-acetilcisteína, geram ciclos redox, por manter o grupo catecol e a estrutura α -metilfenilamínica. Dessa forma, nos rins, há uma maior formação de conjugados reativos, que geram mais ERO/ERN contrapondo com uma menor defesa de glutathiona. Como consequência, mesmo os animais tratados apenas com o enantiômero S não conseguem contrabalançar esse estado oxidativo.

Por outro lado, não foi observado lipoperoxidação em nenhum dos grupos tratados quando comparados com o controle. Uma possível explicação pode ser a dose empregada, de 10 mg/kg, ter sido baixa para a observação de um efeito agudo.

Quanto aos ensaios realizados nas amostras de estriado, um resultado chamou a atenção. Apenas os animais tratados com o isômero S isoladamente mostraram uma queda significativa da atividade da GST em comparação aos demais grupos tratados e controle. Dado interessante é que estudos empregando a microdiálise *in vivo* mostrou que apenas o isômero S causa liberação de dopamina no estriado (Hiramatsu *et al.*, 1989).

Existem inúmeras evidências experimentais que demonstram a existência de uma relação entre a oxidação da dopamina (DA) e a formação de HO[•]. É sabido que a DA é uma molécula reativa que pode ser degradada por via enzimática pela MAO originando ácido 3,4-Diidrofenilacético (DOPAC) e H₂O₂, o qual, por sua vez, origina o HO[•] por via da reação de Fenton. Quando, ao nível intracelular, se esgotam as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, a DA pode entrar num processo de oxidação com a formação de espécies altamente reativas. Comparativamente a outros neurotransmissores catecolaminérgicos, a DA é o mais propenso a sofrer auto-oxidação com a consequente formação de quinonas, semiquinonas, aminocromos, tioéteres, ROS e RNS, que podem danificar macromoléculas essenciais à sobrevivência da célula.

Como já referido, os conjugados N-Me- α -MeDA e α -MeDA com a GSH, resultantes da biotransformação da MDMA no fígado, podem ser metabolizados no cérebro ou mesmo no lúmen capilar, pela ação da γ -GT e dipeptidase aos correspondentes conjugados com a cisteína. Posteriormente, esses adutos podem ser metabolizados a seus correspondentes NAC derivados via N-acetiltransferase. Ambos conjugados com a GSH e com a cisteína podem atravessar a barreira hematoencefálica por transportadores específicos de aminoácidos. Entretanto, o acúmulo destes compostos no cérebro pode ser comprometida pela ação dos transportadores multirresistentes a fármacos 1 e 2, os quais estão localizados na barreira hematoencefálica e fazem a eliminação do cérebro dos adutos da GSH. Os adutos com a NAC tendem a acumular no cérebro uma vez que este mecanismo não favorece a sua retirada. Os conjugados com a GSH e com a NAC podem exercer a sua ação tóxica em diferentes neurônios no cérebro, mas parecem ter grande afinidade para entrar nos neurônios serotoninérgicos via 5-HTT e dopaminérgicos via DAT. Os conjugados com a GSH, mas principalmente com a NAC, são altamente reativos

e podem entrar no ciclo redox, o que conduz à formação de quinonas e ROS, podendo também formar adutos com outras moléculas como proteínas e DNA (Capela *et al.*, 2009).

Nos animais tratados com o isômero S, provavelmente pode ter ocorrido um aumento da produção de conjugados com GSH de vários compostos polifenóis, o que diminuiu atividade de γ -GT (Monks & Lau, 1998).

Tomando todos esses dados em conjunto, esse trabalho mostrou que os enantiômeros isolados da MDMA podem atuar de formas distintas no que se refere ao estado redox, principalmente no fígado, uma vez que o isômero R foi o que mais contribuiu para um dano oxidativo.

Esses resultados podem servir para pesquisas futuras, como, por exemplo, em uma possível aplicação terapêutica de um dos enantiômeros da MDMA. Apesar da MDMA ser uma droga de abuso, recentemente, ressurgiu um interesse na investigação científica do potencial uso da MDMA como auxílio no tratamento do transtorno pós-traumático (TEPT). Seu uso em conjunção com a psicoterapia poderia reduzir temporariamente o medo e aumentar a confiança interpessoal, sem inibir o acesso a emoções, o que levaria a um significativo decréscimo dos sintomas de TEPT (Sessa *et al.*, 2007; Mithoefer *et al.*, 2010).

Mithoefer *et al.* (2010) publicaram o primeiro estudo piloto completo, randomizado e controlado para avaliação da MDMA como complemento terapêutico. O estudo foi conduzido com 23 pacientes, com faixa etária entre 21 e 70 anos, recrutados entre 2004 e 2008. A taxa de resposta clínica foi de 83% no grupo com tratamento com MDMA e de 25% no grupo placebo. Não houve relato de evento adverso sério, evento adverso cognitivo ou aumento clinicamente significativo de pressão arterial.

Nesse sentido, seria interessante investigar se uma das formas enantioméricas da MDMA poderia ser mais efetiva do que a mistura racêmica.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- A cromatografia semipreparativa enantiomérica usando a técnica de reciclo foi empregada com êxito na separação dos enantiômeros da MDMA;
- Os enantiômeros obtidos mostraram um alto grau de pureza e um bom rendimento;
- Os enantiômeros isolados da MDMA podem atuar de formas distintas no que se refere ao estado redox;
- O enantiômero *R* contribuiu significativamente para a depleção de glutathiona e produção de malonaldeído no fígado;
- Nos rins, não foi observado diferença de atividade entre os enantiômeros;
- No estriado, o enantiômero *S* mostrou uma queda significativa da atividade da GST.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, K., Kumerer, H.Y., Aboul-Enein. Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatographia*, v. 63, p. 295-307, 2005.

Anderson, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, v. 113, p. 548-555, 1985.

Andreu, V., Mas, A., Bruguera, M., Salmeró n, J.M., Moreno, V., Nogue´ S, Rode´ s, J. Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. *J. Hepatol.*, v. 29, p. 394-397, 1998.

Antunes, M.V., Lazzaretti, C., Gamaro, G.D., Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 2, 2008.

Arriagada, C., Dagnino-Subiabre, A., Ceviedes, P., Armero, J.M., Caviedes, R. Segura-Aguilar, J. Studies of aminochrome toxicity in a mouse derived neuronal cell line: is this toxicity mediated via glutamate transmission? *Amino Acids*, v. 18, p. 363-373, 2000.

Augusto, Ohara. *Radicais livres: bons, maus e naturais*. São Paulo: Oficina de textos, 2006.

Bai, F., Lau, S.S., Monks, T.J. Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of α -methyldopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxymphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 12, p. 1150-1157, 1999.

Baker, L.E., Broadbent, J., Michael, E.K., Matthews, P.K., Metosh, C.A., Saunders, R.B., West, W.B., Appel, J.B. Assessment of the discriminative stimulus effects of the optical isomers of ecstasy (3,4-methylenedioxymphetamine; MDMA). *Behav. Pharmacol.*, v. 6, p. 263–275, 1995.

Baker, M. A., Cerniglia, G. J. & Zaman, A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.*, v. 190, p. 360-365, 1990.

Barbosa, D.J., Capela, J.P., Oliveira, J.M.A., Silva, R., Ferreira, L.M., Siopa, F., Branco, P.S., Fernandes, E., Duarte, J.A., Bastos, M.A., Carvalho, F. Pro-oxidant effects of Ecstasy and its metabolites in mouse brain synaptosomes. *British Journal of Pharmacology* (DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01453.x), 2006.

Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.C.G., Paula, S.O., Minin, V.P.R., Bressan, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

Battaglia, G., Brooks, B.P., Kulsakdinun, C., de Souza, E.B. Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 149, v. 1-2, p. 159-163, 1988.

Battisti, M.C., Noto, A.R., Nappo, S., Carlini, E.A. A profile of Ecstasy (MDMA) use in São Paulo, Brazil: an ethnographic study. *Journal of Psychoactive Drugs*, v. 38, n.1, p. 13-18, 2006.

Beitia G., Cobreros A., Sainz L., Cenarruzabeitia, E. Ecstasy-induced toxicity in rat liver. *Liver*, v. 10, p. 8-15, 2000.

Bindoli, A., Rigobello, M.P., Deeble, D.J. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 13, p. 391-405, 1992.

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

Bonato, P.S., Jabor, V.A.P., Gaitani, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Quim. Nova*, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

Broadbent, J., Appel, J.B., Michael, E.K., Ricker, J.H. Discriminative stimulus effects of the optical isomers of 3,4-methylenedioxymphetamine (MDA). *Behav. Pharmacol.*, v. 3, p. 443-454, 1992.

Burrows, K., Gudelsky, G., Yamamoto, B. Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymphetamine administration. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 398, n. 1, p. 11-18, 2000.

Campbell, G.A. & Rosner, M.H. The agony of ecstasy: MDMA (3,4-Methylenedioxymethamphetamine) and the kidney. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 3, p. 1852-1860, 2008.

Capela, J.P., Carmo, H., Remião, F., Bastos, M.L., Meisel, A., Carvalho, F. Molecular and cellular mechanisms of Ecstasy-induced neurotoxicity: an overview. *Mol. Neurobiol.*, v. 39, p. 210-271, 2009.

Capela, J.P., Macedo, C., Branco, P.S., Ferreira, L.M., Lobo, A.M., Fernandes, E., Remião, F., Bastos, M.L., Dirnagl, U., Meisel, A., Carvalho, F. Neurotoxicity mechanisms of thioether ecstasy metabolites. *Neuroscience*, v. 146, p. 1743-1757, 2007.

Capela, J.P., Meisel, A., Abreu, A.R., Branco, P.S., Ferreira, L.M., Lobo, A.M., Remião, F., Bastos, M.L., Carvalho, F. Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons and influence of hyperthermia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 316, p. 53-61, 2005.

Carmo, H., Brulport, M., Hermes, M., Oesch, F., Silva, R., Ferreira, L.M., Branco, P.S., Boer, D., Remião, F., Carvalho, F., Schön, M.R., Krebsfaenger, N., Doehmer, J., Bastos, M.L., Hengstler, J.G. Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity. *Pharmacogenet. Genomics*, v. 16, n.11, p. 789-799, 2006.

Carvalho, F., Remião, F., Soares, M.E., Catarino, R., Queiroz, G., Bastos, M.L. d-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.*, v. 71, n. 7, p. 429-436, 1997.

Carvalho, M., Carvalho, F., Bastos, M.L. Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. *Arch. Toxicol.*, v. 74, p. 789-793, 2001.

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

Carvalho, M., Hawksworth, G., Milhazes, N., Borges, F., Monks, T., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. *Arch. Toxicol.*, v. 76, n. 10, p. 581-588, 2002b.

Carvalho, M., Milhazes, N., Remiao, F., Borges, F., Fernandes, E., Amado, F., Monks, T.J., Carvalho, F., Bastos, M.L. Hepatotoxicity of 3,4- methylenedioxymphetamine

and α -methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates. *Arch. Toxicol.*, v. 78, p. 16-24, 2004a.

Carvalho, M., Pontes, H., Remião, F., Bastos, M.L., Carvalho, F. Mechanisms underlying the hepatotoxic effects of ecstasy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 11, p. 476-495, 2010.

Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Monteiro, Mdo.C., Gonçalves, M.J., Seabra, V., Amado, F., Carvalho, F., Bastos, M.L. Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 17, n. 5, p. 623-632, 2004b.

Carvalho, M., Remião, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. The toxicity of N-methyl- α -methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. *Toxicology*, v. 200, p. 193-203, 2004c.

Cerretani, D., Riezzo, I., Fiaschi, A.I., Centini, F., Giorgi, G., D'Errico, S., Fiore, C., Karch, S.B., Neri, M., Pomara, C., Turillazzi, E., Fineschi, V. Cardiac oxidative stress determination and myocardial morphology after a single ecstasy (MDMA) administration in a rat model. *Int. J. Legal. Med.*, v. 122, p. 461-469, 2008.

Cheng, F.C., Kuo, J.S., Dryhurst, G. Elevated 5-scysteinyldopamine/homovanillic acid ratio and reduced homovanillic acid in cerebrospinal fluid: possible markers for and potential insights into the pathoetiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 103, p. 433-446, 1996.

Cho, A.K., Hiramatsu, M., Distefano, E.W., Chang, A.S., Jenden, D.J. Stereochemical differences in the metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in vivo and in vitro: a pharmacokinetic analysis. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 18, p. 686-691, 1990.

Chu, T., Kumagai, Y., DiStefano, E.W., Cho, A.K. Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem. Pharmacol.*, v. 51, p. 789-796, 1996.

Citron, B.P., Halpern, M., McCarron, M., Lundberg, G.D., McCormick, R., Pincus, I.J., Tatter, D., Haverback, B.J. Necrotizing angiitis associated with drug abuse. *New England Journal of Medicine*, v. 283, p. 1003-1011, 1970.

Cunningham, M. Ecstasy-induced rhabdomyolysis and its role in the development of acute renal failure. *Intensive & Critical Care Nursing*, v.13, p. 216-223, 1997.

de la Torre & R., Farre', M. Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 25, n. 10, p. 505-508, 2004.

de la Torre, R., Farre, M., Mathuna, B.O., Roset, P.N., Pizarro, N., Segura, M., Torrens, M., Ortuno, J., Pujadas, M., Cami, J. MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 61, n. 7, p. 551-554, 2005.

de la Torre, R., Farre, M., Ortuno, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P.N. Non-linear pharmacokinetics of MDMA ("ecstasy") in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 49, n. 2, p. 104-109, 2000.

de la Torre, R., Farré, M., Roset, P.N., Pizarro, N., Abanades, S., Segura, M., Segura, J., Camí, J. Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism and disposition. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 26, p.137-144, 2004a.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, v. 15, n. 4, p. 316-28, 2005.

Dykhuizen, R.S.; Brunt, P.W.; Atkinson, P.; Simpson, J.G.; Smith, C.C. Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. *Gut*, v. 36, n. 6, p. 939-941, 1995.

Ellis, A.J., Wendon, J.A., Portmann, B., Williams, R. Acute liver damage and ecstasy ingestion. *Gut*, v. 38, n. 3, p. 454-458, 1996. *Quim. Nova*, v. 29, n. 5, p. 1027-1037, 2006.

Erives, G.V., Lau, S.S., Monks, T.J. Accumulation of neurotoxic thioether metabolites of 3,4-(±)-methylenedioxymethamphetamine in rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 324, p. 284-291, 2008.

Fahal, I.H., Sallomi, D.F., Yaqoob, M., Bell, G.M. Acute renal failure after ecstasy. *BMJ*, v. 305, p. 29, 1992.

Fallon, J.K., Aandrew, T.K., Henry, J.A., Milligan, P.J., Cowan, D.A., Hutti, A.J. Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in humans. *Clinical Chemistry*, v. 45, p. 1058-1069, 1999.

Fantegrossi, W.E., Murai, N., Mathúna, B.O., Pizarro, N., de la Torre R. Discriminative stimulus effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its enantiomers in mice: pharmacokinetic considerations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 329, n.3, p. 1006-1015, 2009.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

Ferreira, F., Ferreira, R., Duarte, J.A. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Rev. Port. Cien. Desp.*, v. 7, n. 2, p. 257-275, 2007.

Fischer, C., Hatzidimitriou, G., Wlos, J., Katz, J., Ricaurtem G. Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug ($\pm$)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J. Neurosci.*, v. 15, p. 5476-5485, 1995.

Fisher, A.A., Labenski, M.T., Malladi, S., Gokhale, V., Bowen, M.E., Milleron, R.S., Bratton, S.B., Monks, T.J., Lau, S.S. Quinone electrophiles selectively adduct "electrophile binding motifs" within cytochrome c. *Biochemistry*, v. 46, n. 39, p. 11090-11100, 2007.

Fuller, R.W. & Henderson, M.G. Neurochemistry of halogenated amphetamines. In Cho, A.K. and Segal, D.S. [eds.], *Amphetamine and its analogs*. Academic Press, San Diego, 1994.

Green, A.R., Mechan, A.O., Elliot, J.M., O'Shea, E., Colado, M.I. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacological Reviews*, v. 55, p. 463-508, 2003.

Green, A.R., O'shea, E., Colado, M.I. A review of the mechanisms involved in the acute MDMA (ecstasy)-induced hyperthermic response. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 500(1-3), 3-13, 2004.

Griffith, O.W. Determinação da glutatona e glutatona dissulfeto utilizando glutatona redutase e 2-vinilpiridina. *Anal. Biochem*, v. 106, p. 207, 1980.

Grinspoon, L., Bakalar, J.B. Can drugs be used to enhance the psychotherapeutic process? *Am. J. Psychotherapy*, v. 40, p. 393-404, 1986.

Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M.F., Moro, A.M., Nascimento, P.C., Pomblum, V.J., Garcia, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 43, p. 619-624, 2007.

Gudelsky, G.A. & Nash, J.F. Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J. Neurochem.*, v. 66, p. 243-249, 1996.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press Inc., p. 187, 2007.

Halliwell, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr. Rev.* v. 57, p. 104-113, 1999.

Han, D. & Gu, H. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol.*, v. 6, n. 1, p. 6, 2006.

HastingHall, A.P. & Henry, J.A. Acute toxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. *British Journal of Anaesthesia*, v. 96, n. 6, p. 678-685, 2006.

Hastings, T.G., Lewis, D.A., Zigmond, M.J. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 93, p. 1956-1961, 1996.

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

Hiramatsu M, Cho A.K. Enantiomeric differences in the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on extracellular monoamines and metabolites in the striatum of freely-moving rats: an in vivo microdialysis study. *Neuropharmacology*, v.29, p.269-275, 1990.

Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Unger, S.E., Cho, A.K. Metabolism of Methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adducts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 254, p. 521-527, 1990b.

Hiramatsu, O., Mito, K. Kajiya, F. Evaluation of the velocity waveform in intramyocardial small vessels. *In Coronary Circulation: Basic Mechanism and Clinical Relevance*, p. 169-172, 1990.

Hong, Y.L., Yeh, S.L., Chang, S.Y., Hu, M.L. Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clinical Biochemistry*, v. 33, p. 619-625, 2000.

Huber, P.C., Almeida, W.P, Fatima, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova*, vol. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

Huether, G., Zhou, D., Rûther, E. Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its congeners. *J. Neural Transm.*, v. 104, p. 771-794, 1997.

Huot, P., Johnston, T.H., Lewis, K.D., Koprich, J.B., Reyes, M.G., Fox, S.H., Piggott, M.J., Brotchie, J.M. Characterization of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) enantiomers in vitro and in the MPTP-lesioned primate: R-MDMA reduces severity of dyskinesia, whereas S-MDMA extends duration of ON-time. *J. Neurosci.*, v. 31, n.19, p. 7190-7198, 2011.

James, R.C., Roberts, S.M., Harbison, R.D. Perturbation of hepatic glutathione by α_2 -adrenergic agonists. *Fundam. Appl. Toxicol.*, v. 3, n. 4, p. 303-308, 1983.

Johnson, E.A., O'Callaghan, J.P., Miller, D.B. Brain concentrations of d-MDMA are increased after stress. *Psychopharmacology*, v. 173, p. 278-286, 2004.

Johnson, M., Letter, A.A., Merchant, K., Hanson, G.R., Gibb, J.W. Effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine isomers on central serotonergic, dopaminergic and nigral neurotensin systems of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 244, p. 977-982, 1988.

Johnson, M.P., Hoffman, A.J., and Nichols, D.E. Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [3H]serotonin and [3H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 132, p. 269-276, 1986.

Jones, D.C., Duvauchelle, C., Ikegami, A., Olsen, C.M., Lau, S.S., De La Torre, R., MONKS, T.J. Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 313, p. 422-431, 2005.

Kalant, H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *Canadian Medical Association Journal*, v. 165, n. 7, p. 917-928, 2001.

Kish, S.J. How strong is the evidence that brain serotonin neurons are damaged in human users of ecstasy? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 71, p. 845-855, 2002.

Kuczenski, R. & Segal D.S. Neurochemistry of amphetamine. In Cho, A.K. & Segal, D.S. [eds.], *Amphetamine and its analogs*. Academic Press, 1994.

Kuypers, K. P., Samyn, N., Ramaekers, J. G. MDMA and alcohol effects, combined and alone, on objective and subjective measures of actual driving performance and psychomotor function. *Psychopharmacology*, v. 187, p. 467-475, 2006.

Kwon, C., Zaritsky, A., Dharnidharka, V.R. Transient proximal tubular renal injury following ecstasy ingestion. *Pediatric Nephrology*, v. 18, p. 820-822, 2003.

Lapachinske, S.F. Análises físicas e químicas de comprimidos de ecstasy apreendidos no município de São Paulo. Tese de doutorado defendida em 2009, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Leonardi, E.T., & Azmitia E.C. MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and MAO type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology*, v. 10, p. 231-238, 1994.

Lossner, M.R., Payen, D. Mechanisms of liver damage. *Semin. Liver Dis.*, v. 16, n. 4, p. 357-367, 1996.

Lourenço, T.C., Cassiano, N.M., Cass, Q.B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova*, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

Lyon, R.A., Glennon, R.A., Titeler, M. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA): stereoselective interactions at brain 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 88, p. 525-526, 1986.

Matsushima, K., Nagai, T., Kamiyama, S. Optical isomer analysis of 3,4-methylene-dioxyamphetamine analogues and their stereoselective disposition in rats. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 22, p. 33-39, 1998.

Maurer, H.H., Bickeboeller-Friedrich, J., Kraemer, T., Peters, F.T. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ("Ecstasy"). *Toxicol. Lett.*, v. 112, p. 133-142, 2000.

McClung, J., Fantegrossi, W., Howell, L.L. Reinstatement of extinguished amphetamine self-administration by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its enantiomers in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 210, n.1, p.75-83, 2010.

Meyer, M.R., Peters, F.T., Maurer, H.H. The role of human hepatic cytochrome P450 isozymes in the metabolism of racemic 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its enantiomers. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 36, p. 2345-2354, 2008.

Miller, L. & Potter, M. Preparative chromatographic resolution of racemates using HPLC and SFC in a pharmaceutical discovery environment. *Journal of Chromatography B*, v. 875, p. 230-236, 2008.

Miller, R.T., Lau, S.S., Monks, T.J. 2,5-bis-(Glutathion-S-yl)- α -methyldopamine, a putative metabolite of ($\pm$)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. *European Journal of Pharmacology*, v. 323, p. 173-180, 1997.

Milroy, C.M., Clark, J.C., Forrest, A.R.W. Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *J. Clin. Pathol.*, v. 49, n. 2, p. 149-153, 1996.

Molero-Chamizo, A. 3,4-metilenodioximetanfetamina ('éxtasis'): efectos emocionales y cognitivos a largo plazo y depleción serotoninérgica. *Revista de Neurología*, v. 41, p.108-114, 2005.

Molliver, M.E., Berger, U.V., Mamounas, L.A., Molliver, D.C., O'Hearn, E., Wilson, MA. Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann. N. YAcadSci.*, v. 600, p. 661-664, 1990.

Monks, T.J. & Lau, S.S. Biological reactivity of polyphenolic glutathione conjugates. *Chemical Research in Toxicology*, v. 10, p. 1296-1313, 1997.

Monks, T.J. & Lau, S.S. The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 38, p. 229-255, 1998.

Monks, T.J. Modulation of quinol/quinone-thioether toxicity by intramolecular detoxication. *Drug Metabolism Reviews*, v. 27, p. 93-106, 1995.

Monks, T.J., Jones, D.C., Bai, F., Lau, B.S.S. The role of metabolism in 3,4-(+/-)-methylenedioxyamphetamine and 3,4-(+/-)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) toxicity. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 6, p. 132-136, 2004.

Montgomery, T., Buon, C., Eibauer, S., Guiry, P.J., Keenan, A.K., McBean, G.J. Comparative potencies of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) analogues as inhibitors of [3H]noradrenaline and [3H]5-HT transport in mammalian cell lines. *Br. J. Pharmacol.*, v. 152, n. 7, p.1121-1130, 2007.

Montiel-Duarte, C., Ansorena, E., Lopez-Zabalza, M.J., Cenarruzabeitia, E., Iraburu, M.J. Role of reactive oxygen species, glutathione and NF-kappa B in apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') on hepatic stellate cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 67, p. 1025-1033, 2004.

Montiel-Duarte, C., Varela-Rey, M., Osés-Prieto, J.A., López-Zabalza, M.J., Beitia, G., Cenarruzabeitia, E., Iraburu, M.J. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1588, n. 1, p. 26-32, 2002.

Moon, K.H., Upreti, V.V., YU, L.R., Lee, I.J., Ye, X., Eddington, N.D., Veenstra, T.D., Song, B.J. Mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-mediated mitochondrial dysfunction in rat liver. *Proteomics*, v. 8, p. 3906 - 3918, 2008.

Mueller, M., Yuan, J., Adrian, C.M., MCCann, U.D., Ricaurte, G.A. Inhibition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine metabolism leads to marked decrease in 3,4-

dihydroxymethamphetamine formation but no change in serotonin neurotoxicity: implications for mechanisms of neurotoxicity. *Synapse*, v. 65, p. 983-990, 2011.

Murnane, K.S., Fantegrossi, W.E., Godfrey, J.R., Banks, M.L., Howell, L.L. Endocrine and neurochemical effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its stereoisomers in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 334, n.2, p. 642-650, 2010.

Murnane, K.S., Murai, N., Howell, L.L., Fantegrossi, W.E. Discriminative stimulus effects of psychostimulants and hallucinogens in S(+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and R(-)-MDMA trained mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 331, p. 717-723, 2009.

Nakagawa, Y., Suzuki, T., Tayama, S., Ishii, H., Ogata, A. Cytotoxic effects of 3,4-methylenedioxy-N-alkylamphetamines, MDMA and its analogues, on isolated rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.*, v. 83, n.1, p. 69-80, 2009.

Nash, J.F. & Brodtkin, J. Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 259, p. 820-825, 1991.

Nash, J.F., Meltzer, H.Y., Gudelsky, G.A. Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, v. 54, p. 1062-1067, 1990.

Nichols, D.E., Lloyd, D.H., Hoffman, A.J., Nichols, M.B., Yim, G.K. Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [3H]serotonin from rat brain synaptosomes. *J. Med. Chem.*, v. 25, p. 530-535, 1982.

Ninkovic', M., Selakovix', V., Dukic', M., Milosavljevic', P., Vasiljevic', I., Jovanovic', M., Evic', Z.M. Oxidative stress in rat kidneys due to 3,4-methylenedioxymetamphetamine (ecstasy) toxicity. *Nephrology*, v. 13, p. 33-37, 2008.

Nixdorf, W.L., Burrows, K.B., Gudelsky, G.A., Yamamoto, B.K. Enhancement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity by the energy inhibitor malonate. *J. Neurochem.*, v. 77, p. 647-654, 2001.

Partilla, J.S., Dempsey, A.G., Nagpal, A.S., Blough, B.E., Baumann, M.H., Rothman, R.B. Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 319, p. 237-246, 2006.

Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M. A detailed interpretation of HO radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. *J. Mol. Biol.*, v. 304, p. 55-68, 2000.

Pizarro, N., de la Torre, R., Joglar, J., Okumura, N., Perfetti, X., Lau, S.S., Monks, T.J. Serotonergic neurotoxic thioether metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"): synthesis, isolation, and characterization of diastereoisomers. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 21, n. 12, p. 2272-2279, 2008.

Pizarro, N., Farré, M., Pujadas, M., Peiró, A.M., Roset, P.N., Joglar, J., De La Torre, R. Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihidroxymethamphetamine). *Drug Metabolism and Disposition*, v. 32, p. 1001-1007, 2004.

Ploemen, J.H., Ommen, B.V., Bladeren, P.J.V. Irreversible inhibition of human glutathione S-transferase isoenzymes by tetrachloro-1,4-benzoquinone and its glutathione conjugate. *Biochem. Pharmacol.*, v. 41, p. 1665-1669, 1991.

Pontes, H., Duarte, J.A., de Pinho, P.G., Soares, M.E., Fernandes, E., Dinis-Oliveira, R.J., Sousa, C., Silva, R., Carmo, H., Casal, S., Remião, F., Carvalho, F., Bastos, M.L. Chronic exposure to ethanol exacerbates MDMA-induced hyperthermia and exposes liver to severe MDMA-induced toxicity in CD1 mice. *Toxicology*, v. 252, p. 64-71, 2008.

Puerta, E., Hervias, I., Aguirre, N. On the Mechanisms Underlying 3,4-Methylenedioxymethamphetamine Toxicity: The Dilemma of the Chicken and the Egg. *Neuropsychobiology*, v. 60, p. 119-129, 2009.

Ramcharam, S., Meenhorst, P. L., Otten, J. M. M. B., Koks, C. H. W., Boer, D., Maes, R. A. A., Beijnen, J. H. Survival after ecstasy overdose. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v. 36, n. 7, p. 727(1), 1998.

Ricaurte, G.A., Yuan, J., McCann, U. D. ($\pm$) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology*, v. 42, p. 5-10, 2000.

Rothman, R.B., Baumann, M.H., Dersch, C.M., Romero, D.V., Rice, K.C., Carroll, F.I., Rudnick, G., Wall, S.C. The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 1817-1821, 1992.

Rothman, R.B., Baumann, M.H., Dersch, C.M., Romero, D.V., Rice, K.C., Carroll, F.I., Partilla, J.S. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *SYNAPSE*, v. 39, p. 32-41, 2001.

Santos-Marques, M.J., Carvalho, F., Sousa, C., Remião, F., Vitorino, R., Amado, F., Ferreira, R., Duarte, J.A., Bastos, M.L., Cytotoxicity and cell signaling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes. *Toxicology*, v. 224, p. 210–218, 2006.

Schmidt, C.J. & Taylor, V.L. Direct central effects of acutemethylenedioxymethamphetamine on serotonergic neurons. *European Journal of Pharmacology*, v. 156, p. 121-131, 1988.

Schmidt, C.J. Neurochemistry of ring-substituted amphetamine analogs. In: Cho, A.K., Segal, D.S. (Eds.), *Amphetamine and its Anlogs: Psychopharmacology, Toxicology, and Abuse*. Academic Press, San Diego, CA, p. 151-175, 1994.

Schmidt, C.J., Levin, J.A., Lounberg, W. In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, v. 36, p. 747-755, 1987.

Shaik, I.H. & Mehvar, R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 385, n. 1, p. 105-113, 2006.

Shenouda, S.K., Lord, K.C., McIlwain, E., Lucchesi, P.A., Varner, K.J. Ecstasy produces left ventricular dysfunction and oxidative stress in rats. *Cardiovascular Research*, v. 79, p. 662-670, 2008.

Silva-Júnior, I.J.S., Veredas, V., dos Santos, M.A.G., Santana, C.C., Carpes, M.J.S., Correia, C.R.D. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. *Quim. Nova*, v. 29, n. 5, p. 1027-1037, 2006.

Simic *et al.* The acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on oxidative stress in rat brain. *Med. Pregl.*, v. 61, n. 5-6, p. 222-5, 2008.

Smythies, J. & Galzigna, L. The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1380, p. 159-162, 1998.

Sprague, J.E., Everman, S.L., Nichols, D.E. An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology*, v. 19, p. 427-442, 1998.

Stadtman, E. R. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.*, v. 11, p. 1105-1112, 2004.

Steranka, L.R. & Sanders-Bush E. Long-term effects of continuous exposure to amphetamine on brain dopamine concentration and synaptosomal uptake in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 65, p. 439-443, 1980.

Taylor, W.M., Reinhart, P.H., Bygrave, F.L. Stimulation by α -adrenergic agonists of Ca^{2+} fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem. J.*, v. 212, n. 3, p. 555-565, 1983.

Templar, J., Kon, S.P., Milligan, T.P., Newman, D.J., Raftery, M.J. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 14, p. 946-951, 1999.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, v. 27, p. 502, 1969.

Torres, M.C.L., Soares, N.F.F., Perreira, J.A.M. Parâmetros cinéticos da glutathione-S-transferase e sua ativação por extratos vegetais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, n. 2, p. 243-248, 2004.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. Illicit drugs. World Drug Report 2009. Disponível em: <http://www.unodc.org/unodc/world-drug-report.html>

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 44-84, 2007.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, v. 160, p. 1-40, 2006.

van Bladeren, P.J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions*, v. 129, p. 61-76, 2000.

Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.F., Manfredini, V., Benfato, M.S., Kubota, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

Verrico, C.D., Miller, G.M., Madras, B.K. MDMA (ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 189, p. 489-503, 2007.

von Ameln, N., von Ameln-Mayerhofer, A. Atypical development of behavioural sensitization to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy') in

adolescent rats and its expression in adulthood: role of the MDMA chirality. *Addict Biol.*, v. 15, n.1, p. 35-44, 2010.

Wink, D.A., Nims, R.W., Saavedra, J.E., Utermahlen, W.E., Ford, P.C. The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 91, p. 6604-6608, 1994.

Wolff, J.E.A., Belloni-Olivi, L., Bressler, J.P., Goldstein, G.W. γ -Glutamyl-transpeptidase activity in brain microvessels exhibits regional heterogeneity. *Journal of Neurochemistry*, v. 58, p. 909-915, 1992.

Yamamoto, B.K. and Raudensky, J. The Role of Oxidative Stress, Metabolic Compromise, and Inflammation in Neuronal Injury Produced by Amphetamine-Related Drugs of Abuse. *J. Neuroimmune Pharmacol.* (DOI 10.1007/s11481-008-9121-7), 2008.

Yamamoto, B.K., Nash, J.F., Gudelsky, G.A. Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 273, p. 1063-1070, 1995.

Yuan, J., Cord, B.J., McCann, U.D., Callahan, B.T., Ricaurte, G. A. Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, v. 80, p. 960-969, 2002.

Zhang, Y., Wu, D.R., Iverson, D.B.W., Tymiak, A.A. Enantioselective chromatography in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 10, p. 571-577, 2005.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/46/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**Avaliação do estresse oxidativo em tecidos de ratos induzido pela toxicidade aguda de (R,S) 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e seus enantiômeros**" (Protocolo nº 220), de responsabilidade da pesquisadora **Graziela Costa Bósio** sob a orientação da Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 8 de junho de 2009.

São Paulo, 9 de junho de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

**SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA
CEAP – Centro de Exames, Análises e Pesquisas**

Of. CEAP – 0413/08 – **DIR**

São Paulo, 20 de agosto de 2008.

Ref.: Projeto de pesquisas em drogas

Meritíssimo Juiz

Na qualidade de Diretor do Centro de Exames, Análises e Pesquisas – CEAP - da Polícia Técnico-Científica de São Paulo, e Coordenador do Projeto de Pesquisas sobre Rastreo de Substâncias Entorpecentes, venho, repetidamente à presença de Vossa Excelência para expor e, ao final, solicitar o que segue:

1. O Projeto acima aludido tem se desenvolvido pelos últimos seis anos com grande sucesso, com a devida autorização do DIPO. Seus resultados permitiram à Polícia Civil um aumento no número de apreensões de drogas – notadamente a maconha – e uma conscientização da população em geral sobre os perigos representados pelo consumo destas substâncias. Rastreamos a origem da maconha, estabelecemos cientificamente que a droga aqui consumida (no Estado) procede, quase que na totalidade, do Paraguai. Sobre a cocaína, descobrimos que a droga oferecida pelos

SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA
CEAP – Centro de Exames, Análises e Pesquisas

marginais, além dos males conhecidos que causa, tem seus efeitos agravados pela inserção de diversas substâncias adulterantes, como lidocaína, cafeína, etc., cujos efeitos pela aspiração são ainda desconhecidos.

2. Entramos agora numa nova fase do Projeto. Nos últimos anos, tem sido uma constante a apreensão de ecstasy – metilenodioximetanfetamina (MDMA) – principalmente entre os jovens, indicando que esta poderosa droga veio para ficar. Em estudos preliminares que realizamos com amostras mínimas de contra-provas, percebemos que também o ecstasy tem sido adulterado, com a inclusão de efedrina, aspirina, cafeína, etc. Como no caso da cocaína, isto é feito, presume-se, para aumentar o lucro dos traficantes, pois os produtos adicionados são bem mais baratos e comercialmente acessíveis por meios legais, ou através de fraudes fiscais. Assim, nossa nova pesquisa procura rastrear as origens do ecstasy através de seus adulterantes. As pesquisas até aqui elaboradas, renderam prêmios estaduais a este Diretor, publicações internacionais - pela primeira vez a Polícia Científica publicou em revistas científicas de repercussão internacional – e uma série de apreensões de drogas pelo DENARC, que, aliás, colaborou nas informações sobre locais de apreensões.

3. O ecstasy é tido como droga estrangeira. No entanto, nossas observações tem mostrado que as apreensões em portos e aeroportos tem diminuído, enquanto que as urbanas aumentaram muito. Isto nos parece um indício seguro de sua produção interna. Na realidade, o Brasil é grande produtor do insumo básico desta droga, que é extraído da pimenta vermelha, do açafrão e da noz moscada. Trata-se do safrol. Portanto, há base para que o ecstasy seja produzido no país, mas não sem

**SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO DE CRIMINALÍSTICA
CEAP – Centro de Exames, Análises e Pesquisas**

conhecimentos especializados de química. Mesmo para a simples adulteração da droga, é necessário conhecer técnicas de liofilização, prensagem, etc., próprias de farmacêuticos e químicos.

4. Cumpre-nos informar que esta pesquisa exige grande diversidade de lotes de drogas apreendidas, mas, de cada comprimido, apenas uma vigésima parte seria utilizada. Ou seja, podemos retirar amostras de nossas próprias contra-provas – as quais somos obrigados por força processual a manter indefinidamente – sem que sequer uma única seja prejudicada legalmente. Além disso, teríamos informações fidedignas das amostras de rua, coisa que nenhuma universidade tem. Daí nosso Projeto estar associado à pesquisa conjunta com a Universidade de São Paulo e o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Isto posto, solicito se digne Vossa Excelência renovar autorização para a coleta de material de amostras na forma proposta no item 4, para que possamos dar continuidade a nossas pesquisas.

No aguardo das deliberações de Vossa Excelência, permaneço,

Respeitosamente,

OSVALDO NEGRINI NETO
Perito Criminal Diretor

PODER JUDICIÁRIO

São Paulo

DEPARTAMENTO DE INQUÉRITOS E POLÍCIA JUDICIÁRIA
DIVISÃO DE EXPEDIENTE DA POLÍCIA JUDICIÁRIA - DIPO 5

Av. Dr. Abrahão Ribeiro, nº 313, 2º Pavimento - Rua 7 - sala 463 - Barra Funda - CEP.: 01133-020 - tels. 2127-9620/9621/9622

Processo nº 675/2008 – 18/09/2008

DIPO 5.1.1 - jms

São Paulo, 18 de setembro de 2008.

Senhor Diretor:

Acusando recebimento de vosso ofício nº CEAP – 0413-DIR (20-08-2008), comunico a Vossa Senhoria que este Juízo autorizou a renovação da autorização para a coleta de material de amostras, proposta no item 4 de vosso ofício.

Ao ensejo, apresento a Vossa Senhoria os meus protestos de elevada estima e distinta consideração.

ALEX TADEU MONTEIRO ZILENOVSKI
Juiz de Direito Corregedor

Ilustríssimo Senhor

Osvaldo Negrini Neto

DD. Perito Criminal Diretor do Instituto de Criminalística

(Transmissão via FAX).

PODER JUDICIÁRIO

São Paulo

DEPARTAMENTO DE INQUÉRITOS E POLÍCIA JUDICIÁRIA DIVISÃO DE EXPEDIENTE DA POLÍCIA JUDICIÁRIA - DIPO 5

Av. Dr. Abrahão Ribeiro, nº 313, 2º Pavimento - Rua 7 - sala 463 - Barra Funda - CEP.: 01133-020 - tels. 2127-9620/9621/9622

Processo nº 675/2008 – 25-ago-10

DIPO 5.1.1 - jms

São Paulo, 25 de agosto de 2010.

Senhor Diretor:

Acusando recebimento de vosso ofício nº 304/10 – Diretoria do CEAP (10/8/2010), comunico a Vossa Senhoria que este Juízo autoriza a Professora Doutora Regina Lúcia de Moraes Moreau, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas /USP, a transportar até a Universidade Federal de São Carlos, a quantidade de 1g ($\pm$ 0,002g) de cloridrato de metilenodioximetanfetamina.

Ao ensejo, apresento a Vossa Senhoria os meus protestos de elevada estima e distinta consideração.

ALEX TADEU MONTEIRO ZILENOVSKI
Juiz de Direito Corregedor

Ilustríssimo Senhor

Adílson Pereira

DD. Perito Criminal Diretor do Centro de Exames, Análises e Pesquisas do
Instituto de Criminalística

Rua Moncorvo Filho, n.º 410, Butantã

CEP.: 05507-060 - SÃO PAULO.