

RICCARDI L.N. (*), ROSSI F. (*), CARANO F. (*), GARAGNANI M. (*),
MAZZOTTI M.C. (*), POLI F. (*), DEL BORRELLO E. (*), PELOTTI S. (*)

Tossicogenetica Forense: un Caso di Acute Narcotism da Ecstasy (MDMA) e Considerazioni in una Prospettiva di Genere

*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, DIMEC, Istituto di Medicina Legale,
Università di Bologna

Abstract: Forensic toxicogenetics: ecstasy (MDMA) acute narcotism and gender differences' implications. Ecstasy, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), is a popular recreational drug and the physical response to MDMA is modulated not only by the quantity and the quality of the drug, but also by individual characteristics. MDMA is primarily metabolized by the enzyme CYP2D6, encoded by the highly polymorphic CYP2D6 gene, and acts as a high affinity substrate and as a potent mechanism-based inhibitor of the enzyme. CYP2D6 activity shows interindividual differences leading to four different phenotypes, namely poor (PM), intermediate (IM), extensive (EM) and ultrarapid (UM) metabolizers. It was suggested that CYP2D6 PMs are more susceptible to the acute toxicity of MDMA and unlikely to acquire drug-taking behavior. We report the case of a deceased 19-year-old Italian male admitted to the emergency room after ingestion of MDMA, showing hyperthermia, tachycardia, profuse sweating and with laboratory signs of rhabdomyolysis. Toxicological analyses revealed blood concentrations of MDMA of 2,8 mg/L, with 0,12 mg/L of MDA, whereas pharmacogenetics analysis disclosed a CYP2D6*4/*4 genotype. Even if the relation between CYP2D6 status and MDMA acute toxicity has not been properly established yet, as few data are available concerning MDMA metabolism in poor metabolizers, and considering that other enzymes of the cytochrome P450 as well as renal excretion might assume greater importance than predicted by in vitro studies, the metabolic status of the individual should be always considered in cases of acute narcotism associated to high serum levels of MDMA. In this context, focusing on gender's influence in CYP2D6 activity, females are more susceptible to the risk of acute MDMA toxicity as equal doses of MDMA produce heightened effects and they are more likely to take antidepressant which inhibit the CYP2D6 enzyme. In conclusion, even if further stratified studies based on CYP2D6 genetic polymorphism are required to clarify its clinical impact also in a gender perspective, the described case confirms that forensic pathologists can take advantage from pharmacogenetic analysis as additional interpretative tool.

Riassunto: L'ecstasy, 3,4-metilendioossimetamfetamina (MDMA), rientra tra le droghe d'abuso più diffuse e la risposta all'assunzione è modulata non solo dalla quantità assunta e dalla sua qualità, ma anche dalle caratteristiche individuali. L'MDMA viene principalmente metabolizzata dall'enzima CYP2D6, codificato dal gene CYP2D6 altamente polimorfico, mostrando un'alta affinità e azione inibitoria sullo stesso enzima. L'attività del CYP2D6 mostra variabilità interindividuale da cui derivano quattro fenotipi, definiti "poor" (PM), "intermediate" (IM), "extensive" (EM) e "ultrarapid metabolizer" (UM). È stato suggerito che i PM per il CYP2D6 sono più suscettibili alla tossicità acuta

da MDMA e meno inclini ad acquisire dipendenza. Il caso descritto riguarda il decesso di un ragazzo italiano di 19 anni che, come risulta dai dati circostanziali, aveva assunto una dose imprecisata di MDMA ed era giunto in ospedale in uno stato di ipertermia, tachicardia, sudorazione profusa e segni laboratoristici di rhabdomiolisi. L'analisi tossicologica ha rilevato concentrazioni ematiche di MDMA pari a 2,8 mg/L e 0,12 mg/L di MDA, mentre l'analisi farmacogenetica ha evidenziato un genotipo CYP2D6*4/*4. Pur non essendo ancora stata dimostrata con certezza l'associazione tra tossicità acuta da MDMA e genotipo, data la scarsa disponibilità di dati riguardanti il metabolismo dell'MDMA negli individui "poor metabolizer", e considerando che il ruolo di altri enzimi del citocromo P450 nonché dell'escrezione renale del tossico potrebbero rivestire un'importanza non trascurabile, lo status di metabolizzatore dovrebbe essere comunque valutato in tutti i casi di acute narcotism con elevati livelli ematici di MDMA. In questo contesto, considerando le differenze di genere riguardanti l'attività dell'enzima CYP2D6, le donne risultano particolarmente a rischio perchè mostrano, a parità di dose di MDMA assunta, una sintomatologia più intensa e sono maggiori consumatrici di farmaci antidepressivi, ad azione inibente sull'enzima CYP2D6. In conclusione, nonostante siano necessari ulteriori studi stratificati in funzione del polimorfismo genico del CYP2D6 per definirne l'impatto clinico anche di genere, il caso descritto conferma che il patologo forense può oggi avvalersi dell'analisi farmacogenetica come ulteriore strumento interpretativo.

Introduzione

L'analisi farmacogenetica associata all'analisi tossicologica nelle morti drug-related può chiarire sia la modalità della morte nella diagnosi differenziale tra morte per suicidio o per sovradosaggio accidentale, sia la causa della morte nei casi di acute narcotism da sostanze d'abuso o di una sospetta reazione avversa al farmaco (1).

L'ecstasy, 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA), è tra le droghe d'abuso più diffuse e la risposta individuale è modulata non solo dalla quantità assunta e dalla sua qualità, ma anche dalle caratteristiche individuali tra cui il sesso, lo stato di salute, i fattori genetici, la tolleranza e l'assunzione contemporanea di altre droghe o farmaci (2). L'MDMA stimola il rilascio e/o inibisce la ricaptazione della serotonina (5-HT), della dopamina (DA) e della norepinefrina (NE) e viene metabolizzata dall'enzima CYP2D6, codificato dall'omonimo gene che mostra un elevato polimorfismo (3). A seconda del grado di attività enzimatica, i diversi genotipi *CYP2D6* sono stati raggruppati in quattro classi fenotipiche: "poor metabolizer" (PM) con attività enzimatica assente,

“intermediate metabolizer” (IM) con ridotta attività enzimatica, “extensive metabolizer” (EM) con attività enzimatica normale e “ultrarapid metabolizer” (UM) con attività enzimatica aumentata (4).

Peraltro, occorre considerare che l'MDMA è in grado di convertire soggetti metabolizzatori normali per il CYP2D6 in poor metabolizer anche solo dopo una singola dose a causa dell'inibizione dell'enzima da parte dell'MDMA stessa, fenomeno conosciuto come *phenocopying* (5).

È stato ipotizzato che il fenotipo CYP2D6 sia in grado di influenzare la tossicità acuta, l'abuso, la dipendenza e la neurotossicità a lungo termine da MDMA, per cui l'attività enzimatica normale porterebbe ad un aumento del rischio di abuso e di neurotossicità, mentre l'assenza di attività, che caratterizza i soggetti “poor metabolizer”, comporterebbe una minore propensione alla dipendenza e un maggiore rischio di tossicità acuta da parte dei composti non inattivati.

Una recente review sottolinea che gli studi clinici riguardanti la relazione tra il genotipo *CYP2D6* e la tossicità acuta da MDMA si basano su campionamenti di ridotte dimensioni in cui i soggetti PM sono sotto-rappresentati od anche esclusi a priori, derivandone sia una sostanziale impossibilità di definire con certezza una correlazione, sia la necessità di considerare questo bias nell'interpretazione dei dati clinici (2, 6).

Viene di seguito illustrato un caso di decesso da acute narcotism in cui l'applicazione della tossicogenetica forense mostra la potenzialità della cosiddetta “autopsia molecolare”, sviluppando la discussione anche in una prospettiva di genere.

Caso

Il caso riguarda il decesso di un ragazzo italiano di 19 anni che, come risulta dai dati circostanziali, aveva assunto nelle due ore precedenti il ricovero una dose di MDMA per via orale e successivamente una ulteriore dose di MDMA disciolta in acqua. Le quantità assunte non sono quantificabili perché la dose totale era

stata condivisa da tre persone compresa la vittima. Dopo circa un'ora dalla seconda assunzione di MDMA iniziò una sintomatologia di tipo convulsivo a cui fece seguito il ricovero ospedaliero in una situazione di ipertermia, tachicardia e sudorazione profusa con livelli ematici elevati di creatinfosfochinasi (CPK) e mioglobina (Mb) a cui fece seguito il decesso il giorno seguente. L'anamnesi patologica e farmacologica remota erano sconosciute.

Materiale e metodi

Analisi tossicologica: Ad 1 mL di sangue prelevato all'ingresso in pronto soccorso sono stati aggiunti 5mL tampone fosfato monobasico 0,1 M a pH 6 e 10 µL di amfetamina deuterata (AD5) 1 mg/mL come standard interno. Successivamente è stato estratto in fase solida con colonnina Thermo Scientific™ Hypersep Verify CX 200mg/10mL (Thermo Scientific, Waltham, MA) preconditionata con 3 mL di metanolo, 3mL di acqua, 1 mL di tampone fosfato monobasico 0,1 M a pH 6. Dopo adsorbimento del campione, la colonna è stata lavata con 3mL di acqua, 1mL di acido acetico 0,1 M e 3 mL di metanolo. L'amfetamina eluita con miscela di diclorometano/alcol isopropilico 80:20 con il 2% di ammoniaca concentrata. L'eluato, essiccato a 45°C sotto azoto, è stato ricostituito con 50 µL di anidride pentafluoropropionica e 50 µL di etilacetato e posto in stufa a 78°C per 20 min; successivamente riseccato sotto azoto e ripreso con 50 µL di etilacetato. La soluzione ottenuta è stata iniettata due volte, una iniezione qualitativa ed una quantitativa, ciascuna da 1µL nel gascromatografo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Milano, Italia) equipaggiato con colonna Supelco LB-5MS (Sigma-Aldrich S.r.l., Milano, Italia) (lunghezza 30m diametro interno 0,25 mm e spessore del film 0,25 µM). Il gascromatografo era in linea con uno spettrometro di massa Shimadzu QP2010plus (Shimadzu, Milano, Italia) dotato di sorgente a ionizzazione elettronica. Le condizioni operative erano le seguenti: iniezione in split 1:5 con temperatura iniziale di 60°C per 1 min, rampa di 10°C/min fino a 300°C, isoterma finale di 4 min;

temperatura iniettore 290°C, interfaccia 270°C, temperatura sorgente ionizzazione 260°C e velocità lineare costante a 38 cm/s.

Con la stessa metodica sono stati analizzati 5 mL di urina prelevata al ricovero in pronto soccorso e 1 mL di sangue prelevato in sede autoptica. Su quest'ultimo è stata condotta la ricerca qualitativa di MDMA iniettando 1 ul di campione.

Analisi farmacogenetica: da un campione di sangue prelevato post-mortem è stato estratto DNA mediante QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany). L'amplificazione e l'analisi dei polimorfismi del gene *CYP2D6* e' stata eseguita come descritto da Riccardi et al. (7).

Risultati

L'analisi tossicologica sul sangue prelevato al ricovero ha rilevato la presenza di 2,8 mg/L di 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA), 0,12 mg/L di 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA). Nelle urine si riscontravano 234 mg/L di MDMA e 0,023 mg/L di MDA.

L'analisi farmacogenetica di 11 posizioni polimorfiche (100C>T, 1023C>T, 1661G>C, 1707delT, 1846G>A, 2549delA, 2613-15delAGA, 2850C>T, 2988G>A, 3183G>A, 4180 G>C) del gene *CYP2D6* ha mostrato mutazioni a carico delle posizioni 100, 1661, 1846, 4180 corrispondenti al genotipo *CYP2D6* *4/*4.

Discussione

Nei casi di morte drug-related, l'indagine genetica post-mortem può consentire l'interpretazione dei risultati tossicologici fornendo informazioni sul polimorfismo dei geni deputati al metabolismo di xenobiotici e sulle interazioni tra enzima e xenobiotici.

Nel caso presentato, i segni clinici indirizzavano verso la sindrome acuta da MDMA con ipertermia e raddomiolisi. La concentrazione ematica di MDMA nel campione prelevato al momento del ricovero si situava nei range descritti nei casi di intossicazione fatale (8, 9), superando la concentrazione di 1,5 mg/L riportata nel 90% dei casi di morte dovuti a MDMA (9). Anche il dosaggio dell'MDMA riscontrato nelle urine indirizzava verso la sindrome acuta da MDMA.

L'analisi farmacogenetica ha mostrato il genotipo *CYP2D6**4/*4 costituito da due alleli non funzionanti e corrispondente al fenotipo "poor metabolizer" che rende gli individui incapaci di metabolizzare gli xenobiotici substrato dell'enzima esponendoli potenzialmente, unitamente a fattori ambientali, ad un più alto rischio di tossicità acuta (6) caratterizzata da ipertermia, ipertensione, tachicardia, convulsioni, emorragia intracerebrale, raddomiolisi, coagulazione intravasale disseminata, insufficienza renale acuta (10, 11).

Inoltre, considerando la funzione inibente dell'MDMA sul *CYP2D6* (4), responsabile del *phenocopying* che trasforma il metabolizzatore normale in "poor metabolizer", l'effetto dell'assente o indebolita attività dell'enzima viene amplificato. Questo fenomeno, indipendentemente dal genotipo, aumenta la probabilità di acute narcotism e il rischio di intossicazione acuta derivante anche dal concomitante utilizzo di altre droghe d'abuso o di farmaci antidepressivi e ansiolitici che, nel rinforzare gli effetti dell'MDMA, interferiscono col suo metabolismo inibendo a loro volta il *CYP2D6* (12). Ad oggi, peraltro, i pochi dati riguardanti il metabolismo dell'MDMA nei "poor metabolizer" non consentono di correlare con certezza lo status di metabolizzatore con la tossicità acuta dell'MDMA (2). Anche se uno studio ha riportato che soggetti omozigoti *4/*4 mostrano livelli ematici di MDMA aumentati e un maggior rischio di ipertermia dopo una singola dose (13), il ruolo di altri enzimi del citocromo P450 e l'escrezione renale del tossico potrebbero rivestire un'importanza maggiore di quanto in precedenza ipotizzato sulla base di studi in vitro (6).

Più in generale e con riferimento al genere, studi recenti hanno dimostrato che, sebbene i fenotipi metabolizzatori del *CYP2D6* siano ugualmente distribuiti fra

uomini e donne, il maggior effetto in acuto dell'MDMA descritto nelle donne sia attribuibile ad un'attività di base del CYP2D6 e ad una clearance dell'MDMA diminuite (14). Inoltre, il *phenocopying* indotto dall'MDMA si verifica nel 100% delle donne, ma solo nel 67% degli uomini (15, 16).

In questo scenario, le donne che consumano MDMA risultano particolarmente a rischio perché mostrano, a parità di dose, un incremento maggiore di pressione arteriosa, frequenza cardiaca, tono ortosimpatico, ansia, effetti allucinogeni e risposte avverse. A ciò si aggiunga che da quanto emerso dal rapporto OsMed (17), la prevalenza del trattamento con farmaci antidepressivi, ad azione inibente sul CYP2D6, è superiore nel genere femminile con la conseguente maggiore esposizione delle donne ad un maggior rischio di effetti avversi anche fatali.

In conclusione, nonostante siano necessari ulteriori studi stratificati in funzione del polimorfismo genico del *CYP2D6* per definirne l'impatto clinico anche di genere, il caso descritto conferma che il patologo forense può oggi avvalersi dell'analisi farmacogenetica come ulteriore strumento interpretativo.

Bibliografia

Sajantila A, Palo JU, Ojanperä I, Davis C, Budowle B (2010) Pharmacogenetics in medico-legal context. *Forensic Sci Int* 203:44-52.

1. Rietjens SJ, Hondebrink L, Westerink RH, Meulenbelt J (2012) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): interindividual differences due to polymorphisms and drug-drug interactions. *Crit Rev Toxicol* 42:854-76. doi: 10.3109/10408444.2012.725029.
2. de la Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, Segura J, Camí J (2004) Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. *Ther Drug Monit* 26:137-144.
3. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 116:496-526.
4. Antolino-Lobo I, Meulenbelt J, Nijmeijer SM, Scherpenisse P, van den Berg M, van Duursen MB (2010) Differential roles of phase I and phase II enzymes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced cytotoxicity. *Drug Metab Dispos* 38:1105-1112.

5. de la Torre R, Yubero-Lahoz S, Pardo-Lozano R, Farré M (2012) MDMA, methamphetamine, and CYP2D6 pharmacogenetics: what is clinically relevant? *Front Genet* 3:235.
6. Riccardi LN, Lanzelotto R, Luiselli D, Ceccardi S, Falconi M, Bini C, Pelotti S (2011) CYP2D6 genotyping in natives and immigrants from the Emilia-Romagna Region (Italy). *Genet Test Mol Biomarkers* 15:801-806.
7. Milroy CM (2011) "Ecstasy" associated deaths: what is a fatal concentration ? Analysis of a case series. *Forensic Sci Med Pathol* 7:248-252.
8. Verschraagen M, Maes A, Ruiters B, Bosman IJ, Smink BE, Lushof KJ (2007) Post-mortem cases involving amphetamine-based drugs in The Netherlands. Comparison with driving under the influence cases. *Forensic Sci Int* 170:163-170.
9. Devlin RJ, Henry JA (2008) Clinical review: Major consequences of illicit drug consumption. *Crit Care* 12:202.
10. Green AR, Mehan AO, Elliot JM, O'Shea E, Colado MI (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") *Pharmacol Rev* 55:463-508
11. Pilgrim JL, Gerostamoulos D, Drummer OH (2011) Deaths involving MDMA and the concomitant use of pharmaceutical drugs. *J Anal Toxicol* 35:219-226.
12. de la Torre R, Farré M, Mathúna BO, Roset PN, Pizarro N, Segura M, Torrens M, Ortuño J, Pujadas M, Camí J (2005) MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. *Eur J Clin Pharmacol* 61:551-554.
13. Pardo-Lozano R, Farré M, Yubero-Lahoz S, O'Mathúna B, Torrens M, Mustata C, Pérez-Mañá C, Langohr K, Cuyàs E, Carbó ML, de la Torre R (2012) Clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"): the influence of gender and genetics (CYP2D6, COMT, 5-HTT). *PLoS One* 7(10):e47599. doi:10.1371/journal.pone.0047599.
14. Yubero-Lahoz S, Pardo R, Farré M, O'Mahony B, Torrens M, Mustata C, Pérez-Mañá C, Carbó ML, de la Torre R (2011) Sex Differences in 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; Ecstasy)-Induced cytochrome P450 2D6 Inhibition in Humans. *Clin Pharmacokinet* 50:319-329.
15. O'Mathúna B, Farré M, Rostami-Hodjegan A, Yang J, Cuyàs E, Torrens M, Pardo R, Abanades S, Maluf S, Tucker GT, de la Torre R (2008) The consequences of 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced CYP2D6 inhibition in humans. *J Clin Psychopharmacol* 28:523-529.
16. AIFA (2012) Rapporti OsMed — L'uso dei farmaci in Italia. <http://www.agenziafarmaco.gov.it/it/content/rapporti-osmed-luso-dei-farmaci-italia>