

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS AGUDOS ASOCIADOS AL
CONSUMO DE METILONA**

Lourdes Poyatos Blanco

Directores de tesis:

Magí Farré Albaladejo

Clara Pérez Mañá

Esther Papaseit Fontanet



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Efectos agudos asociados al consumo de metilona

Memoria presentada por Lourdes Poyatos Blanco
para optar al título de Doctor en Medicina

Programa doctoral de Farmacología
Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología

Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)

Barcelona, 30 de marzo de 2023

Firma Directores:

Dr. Magí Farré Albaladejo, Dra. Clara Pérez Mañá y Dra. Esther Papaseit Fontanet

Firma Doctoranda: Lourdes Poyatos Blanco

Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología

Magí Farré Albaladejo, Catedrático de Farmacología del Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona, Clara Pérez Mañá, Profesora asociada del Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Esther Papaseit Fontanet, Profesora asociada del Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Hacen constar:

Que la memoria presentada por Lourdes Poyatos Blanco con título "Efectos agudos asociados al consumo de metilona", ha estado realizada bajo su dirección. La memoria reúne las condiciones para ser presentar para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Barcelona, a 30 de marzo 2023.

Prof. Magí Farré Albaladejo

Prof. Clara Pérez Mañá

Prof. Esther Papaseit Fontanet

ABREVIATURAS

α -PVP	α -Pirrolidinopentiofenona
μ M	Micromolar
4-MEC	4-Metilecatinona
5-HT	Serotonina
ARCI	Addiction Research Center Inventory o Inventario del Centro de Investigación de Adicciones
AUC	Área bajo la curva
BOE	Boletín Oficial del Estado
CAPS-5	Clinician-Administered PTSD Scale for DSM-5 o Escala para el Trastorno por estrés postraumático Administrada por el Clínico según el DSM-5
C_{max}	Concentración máxima
CV	Coefficiente de variación
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DEA	Administración de Control de Drogas
DSM-5	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 5ª edición
EAV	Escala analógica visual o Visual analog scale (VAS)
EC_{50}	Mitad de la concentración efectiva máxima
EDADES	Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España
EDRS	Australian Ecstasy and related Drugs Reporting System o Sistema de Notificación Australiano de Éxtasis y Drogas Relacionadas
EEUU	Estados Unidos de América
E_{max}	Efecto máximo
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction u Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT)

ESPAD	European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs o
ESTUDES	Encuesta sobre uso de drogas en enseñanzas secundarias en España
F	Biodisponibilidad
FC	Frecuencia cardiaca
FDA	Food and Drug Administration o Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
h	Hora
HHMA	3,4-dihidroxi metanfetamina
HHMC	3,4-Dihidroxi metcatinona
HMA	4-Hidroxi-3-metoxianfetamina
HMMA	3,4-Hihidroxi metanfetamina
HMMC	3,4-Hidroxi metoxi metcatinona
IC ₅₀	Mitad de la concentración inhibitoria máxima
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
Kg	Quilogramo
Ki	Constante de inhibición
Lpm	Latidos por minuto
LSD	Dietilamida de ácido lisérgico, lisérgida
MDA	3,4-Metilendioxi anfetamina
MDC	3,4-Metilenedioxi catinona
MDMA	3,4-Metilendioxi metanfetamina
MDPBP	Metilendioxi- α -pirrolidinobutirofenona
MDPV	Metilendioxi pirovalerona
mg	Miligramo
Min	Minuto
mL	Mililitro

mmHg	Milímetro de mercurio
NA	Noradrenalina
NET	Transportador de noradrenalina
NFLIS	National Forensic Laboratory Information System o Sistema Nacional de Información de Laboratorios Forenses
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
NSP	Nuevas sustancias psicoactivas
OEDA	Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PAS	Presión arterial sistólica
PNSD	Plan Nacional sobre Drogas
SDRQ	Sensitivity to drug reinforcement questionnaire o Cuestionario de sensibilidad al refuerzo de las drogas
SERT	Transportador de serotonina
t _{1/2}	Semivida de eliminación
TEPT	Trastorno por estrés postraumático
T _{max}	Tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime u Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODD)
VAS	Visual analog scale o Escala analógica visual (EAV)
VESSPA	Evaluation of Subjective Effects of Substances with Abuse Potential questionnaire o Cuestionario de evaluación de los efectos subjetivos de las sustancias con potencial de abuso
WHO	World Health Organization u Organización Mundial de la Salud (OMS)

RESUMEN

La metilona (3,4-metilenedioximetcatinona), también denominada "MDMC", "bk-MDMA" o "M1", es una catinona sintética popularizada inicialmente como una alternativa legal de las drogas clásicas. Los consumidores comparan sus efectos farmacológicos con los de la 3,4-metilenedioximetanfetamina (éxtasis o MDMA), con la que comparte similitud en su estructura química. Sin embargo, la información disponible sobre su farmacología humana es muy limitada y proviene principalmente de los reportes de consumidores o de informes clínicos de casos de intoxicaciones. Hasta la fecha de redacción de esta tesis, no existen datos experimentales publicados sobre la farmacocinética y los efectos farmacológicos asociados a la administración oral de metilona en humanos.

Métodos

Se diseñó un ensayo clínico de Fase I, aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo y con MDMA como comparador activo. En los estudios se incluyeron voluntarios sanos con experiencia previa en el consumo de psicoestimulantes. Inicialmente, se realizó un estudio piloto con un escalado de dosis de 50 a 200 mg de metilona que permitiera definir el diseño del estudio definitivo. En el estudio piloto se incluyeron 12 participantes masculinos que recibieron dosis de 50 (n= 3), 100 (n= 6), 150 (n= 5) y 200 mg (n= 7) de metilona en comparación con placebo (n= 12) y MDMA (n= 3). Posteriormente, se realizó el estudio definitivo en el que participaron 17 sujetos (3 mujeres, 14 hombres) que recibieron la dosis seleccionada de 200 mg de metilona en comparación con 100 mg de MDMA y placebo.

En ambos estudios se recogieron muestras de sangre, saliva, sudor y orina para el análisis de las concentraciones de metilona, MDMA y sus metabolitos.

Además, se evaluaron los efectos farmacológicos de la metilona incluyendo los efectos fisiológicos, efectos subjetivos recogidos a través de diversas escalas y cuestionarios, y el rendimiento psicomotor.

Resultados

En el compendio de artículos de la presente tesis se incluyen las publicaciones con los resultados del estudio piloto (50 a 200 mg de metilona y 100 mg de MDMA) sobre las concentraciones plasmáticas de metilona, MDMA y sus metabolitos y los resultados del estudio definitivo (200 mg de metilona, 100 mg de MDMA y placebo) sobre los efectos farmacológicos.

Tras el escalado de dosis de 50 a 200 mg, las concentraciones plasmáticas de metilona incrementaron proporcionalmente a la dosis sugiriendo un comportamiento lineal entre dichas dosis. La metilona alcanzó concentraciones máximas entre las 1,5 y 2 h, mostrando una semivida de eliminación ($t_{1/2}$) entre 6 y 7 h. Su metabolito hidrometoximetcatinona (HMMC) mostró una cinética rápida consiguiendo concentraciones máximas a las 1,5 y 2 h. En cambio, se observaron concentraciones máximas de MDMA a las 2 h con una $t_{1/2}$ de 12 h. En el estudio definitivo, la metilona a 200 mg produjo un incremento significativo de la presión arterial y la frecuencia cardíaca acompañado de efectos de estimulación, euforia, empatía y ligera alteración de la percepción. El espectro de efectos fue muy similar al producido por la MDMA, pero con un inicio y desaparición más temprana.

Conclusión

Según los resultados obtenidos, la metilona seguiría una farmacocinética lineal en humanos tras administrar dosis orales entre 50 y 200 mg a diferencia de la su análoga MDMA, de la que se conoce que exhibe una cinética no lineal. Respecto a farmacodinamia, la metilona indujo un perfil de efectos psicoestimulantes y empatogénicos prototípicos que comúnmente se asocian a la MDMA. Sin

embargo, los efectos farmacológicos de la metilona se caracterizaron por la rapidez de su aparición y corta duración respecto a la MDMA, lo que la convierte en una sustancia con potencial de redosificación.

RESUM

La metilona (3,4-metilenedioximetcatinona), també anomenada "MDMC", "bk-MDMA" o "M1", és una catinona sintètica popularitzada inicialment com una alternativa legal de les drogues clàssiques. Els consumidors comparen els seus efectes farmacològics amb els de la 3,4-metilenedioximetanfetamina (èxtasi o MDMA), amb la qual comparteix estructures químiques similars. No obstant, la informació disponible sobre la seva farmacologia humana és molt limitada i prové principalment dels reports de consumidors o d'informes clínics de casos d'intoxicacions. Fins a la data de redacció d'aquesta tesi, no hi ha dades experimentals publicades sobre la farmacocinètica i els efectes farmacològics associats al consum oral de metilona en humans.

Mètodes

Es va dissenyar un assaig clínic de Fase I, aleatoritzat, doble cec, creuat i controlat amb placebo i amb MDMA com a comparador actiu. Als estudis es van incloure voluntaris sans amb experiència prèvia en el consum de psicoestimulants. Inicialment, es va fer un estudi pilot amb un escalat de dosi de 50 a 200 mg que permetés definir el disseny de l'estudi definitiu. L'estudi pilot va incloure 12 participants masculins que van rebre dosis de 50 (n= 3), 100 (n= 6), 150 (n= 5) i 200 mg (n= 7) de metilona en comparació amb placebo (n= 12) i MDMA (n= 3). Posteriorment, es va realitzar l'estudi definitiu en què van participar 17 subjectes (3 dones, 14 homes) que van rebre la dosi seleccionada de 200 mg de metilona en comparació de 100 mg de MDMA i placebo.

En tots dos estudis es van recollir mostres de sang, saliva, suor i orina per a l'anàlisi de les concentracions de metilona, MDMA i els seus metabòlits.

Addicionalment, es van avaluar els efectes farmacològics de la metilona incloent els efectes fisiològics, efectes subjectius recollits a través de diverses escales i qüestionaris, i el rendiment psicomotor.

Resultats

Al compendi d'articles de la present tesi s'inclouen les publicacions amb els resultats de l'estudi pilot (50 a 200 mg de metilona i 100 mg de MDMA) sobre les concentracions plasmàtiques de metilona, MDMA i els seus metabòlits i els resultats de l'estudi definitiu (200 mg de metilona, 100 mg de MDMA i placebo) sobre els efectes farmacològics.

Després de l'escalat de dosi de 50 a 200 mg, les concentracions plasmàtiques de metilona van incrementar proporcionalment a la dosi suggerint un comportament lineal entre aquestes dosis. La metilona va assolir concentracions màximes entre les 1,5 i 2 h, mostrant una semivida d'eliminació ($t_{1/2}$) entre 6 i 7 h. El seu metabòlit hidroximetoximetcatinona (HMMC) va mostrar una cinètica ràpida aconseguint concentracions màximes a les 1,5 i 2 h. En canvi, es van observar concentracions màximes de MDMA a les 2 h amb una $t_{1/2}$ de 12 h. A l'estudi definitiu, la metilona a 200 mg va produir un increment significatiu de la pressió arterial i la freqüència cardíaca acompanyat d'efectes d'estimulació, eufòria, empatia i lleugera alteració de la percepció. L'espectre d'efectes va ser molt semblant al produït per la MDMA, però amb un inici i una desaparició més primerenca.

Conclusió

Segons els resultats obtinguts, la metilona seguiria una farmacocinètica lineal en humans després d'administrar dosis orals entre 50 i 200 mg a diferència de la seva anàloga MDMA, de la qual es coneix que exhibeix una cinètica no lineal. Pel que fa a la farmacodinàmia, la metilona va induir un perfil d'efectes psicoestimulants i empatogènics prototípics que comunament s'associen a la MDMA. Tot i això, els efectes farmacològics de la metilona es van caracteritzar per la rapidesa de la seva aparició i curta durada respecte a la MDMA, la qual cosa la converteix en una substància amb potencial de redosificació.

ABSTRACT

Methylone (3,4-methylenedioxymethcathinone), also called "MDMC", "bk-MDMA" or "M1", is a synthetic cathinone initially popularized as a legal alternative to classic drugs. Users compare its pharmacological effects with those of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy or MDMA), which could be related to the similarity in their chemical structures. However, the available information on its human pharmacology of methylone is very limited and is mainly provided by users' experience or intoxication reports. Up to the date of writing this thesis, there are no published experimental data on the pharmacokinetics and pharmacological effects associated with oral administration of methylone in humans.

Methods

A Phase I clinical trial was designed as randomized, double-blind, crossover, placebo controlled with MDMA as active comparator. The participants were healthy volunteers with previous experience using psychostimulants. Initially, a pilot study was carried out with a dose escalation from 50 to 200 mg of methylone that allowed defining the final study design. The pilot study included 12 male participants who received doses of 50 (n= 3), 100 (n= 6), 150 (n= 5), and 200 mg (n= 7) of methylone compared to placebo (n= 12) and MDMA (n= 3). Following that, a definitive study was conducted including 17 participants (3 women, 14 men) who received the selected dose of methylone 200 mg compared to MDMA 100 mg and placebo.

In both studies, blood, oral, sweat, and urine samples were collected for analysis of concentrations of methylone, MDMA, and their metabolites.

In addition, the pharmacological effects of methylone were evaluated including physiological effects, subjective effects collected through various scales and questionnaires, and psychomotor performance.

Results

The compendium of articles of this thesis includes the publications with the results of the pilot study (50 to 200 mg of methylone and MDMA 100 mg) on the plasmatic concentrations of methylone, MDMA and their metabolites and the results of the definitive study (methylone 200 mg, MDMA 100 mg and placebo) on pharmacological effects.

After dose escalation from 50 to 200 mg, methylone plasma concentrations increased proportionally to the dose, suggesting a linear behavior between said doses. Methylone reached maximum concentrations between 1.5 and 2 h and showed an elimination half-life ($t_{1/2}$) from 6 to 7 h. Its metabolite, hydroxymethoxymethcathinone (HMMC), exhibited rapid kinetics, achieving maximum concentrations at 1.5 and 2 h. Instead, MDMA concentrations peaked at 2 h with a $t_{1/2}$ of 12 h. In the definitive study, methylone 200 mg produced a significant increase in blood pressure and heart rate accompanied by effects of stimulation, euphoria, empathy, and mild perceptual alteration. The spectrum of effects was very similar to that produced by MDMA, but with an earlier onset and disappearance.

Conclusion

The results suggest that methylone would follow linear pharmacokinetics in humans after oral doses from 50 to 200 mg, unlike its analogue MDMA, which is known to exhibit non-linear kinetics. Regarding its pharmacodynamics, methylone induced a profile of prototypical psychostimulant and empathogenic effects that are commonly associated with MDMA. However, the pharmacological effects of methylone were characterized by their rapid onset and short duration compared to MDMA, which may lead to a higher potential of redosing.

ÍNDICE

1	Introducción	23
1.1	Nuevas sustancias psicoactivas.....	23
1.2	Catinona natural y catinonas sintéticas.....	31
1.2.1	Catinona natural.....	31
1.2.2	Catinonas sintéticas.....	32
1.3	Metilona.....	35
1.3.1	Epidemiología	35
1.3.2	Estructura química	39
1.3.3	Farmacología	40
1.3.3.1	Mecanismo de acción	40
1.3.3.2	Efectos farmacológicos.....	45
1.3.3.3	Potencial de abuso y adicción	49
1.3.3.4	Farmacocinética	51
1.3.3.5	Metabolismo	57
1.3.3.6	Efectos indeseables en humanos.....	60
1.3.3.7	Intoxicación aguda en humanos.....	61
1.3.3.8	Posibles aplicaciones terapéuticas	63
2	Justificación	69
3	Hipótesis.....	73
4	Objetivos.....	77
5	Métodos y resultados	81
5.1	Methylone and MDMA Pharmacokinetics Following Controlled Administration in Humans.....	83
5.2	Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans.....	99
6	Discusión	117
6.1	Farmacocinética	117

6.2	Efectos farmacológicos.....	122
6.3	Datos integrativos de farmacocinética y efectos	126
6.4	Futuras líneas de investigación.....	132
7	Conclusiones.....	137
8	Bibliografía.....	141
9	Anexo.....	169
9.1	Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans. Supplementary material.....	169
9.2	A comparison of acute pharmacological effects of methylone and MDMA administration in humans and oral fluid concentrations as biomarkers of exposure	175

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Nuevas sustancias psicoactivas

En los últimos años, el fenómeno de las nuevas sustancias psicoactivas (NSP) se ha expandido en el mercado de las drogas de abuso como alternativas legales de las drogas clásicas (Evans-Brown y Sedefov, 2017, 2018). Estas sustancias se conocen por otros nombres como drogas emergentes, drogas de síntesis, drogas de diseño (“designer drugs”), euforizantes legales (“legal highs”), sales de baño (“bath salts”). Su creciente proliferación obligó a la Organización de las Naciones Unidas (ONU) a concretar una definición:

“Se conoce como Nueva Sustancia Psicoactiva (NSP) a aquella sustancia de abuso, ya sea en forma pura o en preparado, que no está controlada por la Convención Única de 1961 sobre Estupefacientes ni por el Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971, pero que pueden suponer una amenaza para la salud pública.”

(United Nations, 1961, 1971; United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2022).

Aunque muchas de estas sustancias fueron sintetizadas por primera vez hace décadas, se las denomina “nuevas” por su reciente aparición en el mercado (Papaseit et al., 2014; United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2022). El término NSP se asigna en el momento de aparición de la sustancia, independientemente de su posible fiscalización posterior.

De esta manera, teniendo en cuenta su definición, las NSP engloban un grupo muy heterogéneo de sustancias con diferentes estructuras químicas que les confieren gran variedad de propiedades farmacológicas y toxicológicas (Colado et al., 2018).

Entre los términos utilizados para referirse a las NSP, existen ligeras diferencias en función a la información atribuida a su definición referente a su composición, forma de consumo, o aparición en el mercado (Papaseit et al., 2023). A continuación, se presenta una tabla resumiendo los principales términos y sus respectivas definiciones (Tabla 1).

Tabla 1. Definiciones de los términos utilizados para referirse a las NSP (Tabla modificada de Papaseit et al., 2023).

Drogas emergentes
Se utiliza este término para abarcar a todas aquellas sustancias que aparecen en un momento determinado en el mercado, aunque no sean necesariamente de nuevo descubrimiento. Estas sustancias no están controladas por las listas de sustancias prohibidas.
Euforizantes legales (“legal highs”)
Son productos compuestos de una o diversas sustancias psicoactivas con el fin de emular los efectos de estimulantes o alucinógenos de drogas clásicas. Estos productos preparados en laboratorios utilizan sustancias no controladas como alternativa de las clásicas que sí están prohibidas, como la cocaína, la 3,4-metilendioximetanfetamina (éxtasis o MDMA) o la dietilamida de ácido lisérgico (LSD). En algunos países se comercializan legalmente contenidos en envases llamativos en festivales, Smart shops o por internet (Figura 1).
Sustancias químicas de investigación (“research chemicals”)
Son sustancias de origen sintético que se venden principalmente por internet bajo la premisa de ser productos de uso científico. Habitualmente se venden en bolsas de plástico con una indicación de “No para consumo humano” o “Sólo para uso de laboratorio” (Figura 1). No se encuentran generalmente en las listas de sustancias prohibidas, por lo que se consideran legales. Son sustancias que pueden ser de interés especialmente para aquellos consumidores considerados “psiconautas”, personas experimentadas sobre los efectos de gran variedad de sustancias psicoactivas que buscan nuevas experiencias y el autoconocimiento a través del consumo. La información científica disponible sobre los efectos farmacológicos y toxicología de estas sustancias es muy escasa.
Drogas de diseño (“designer drugs”)

Son sustancias sintetizadas en laboratorios clandestinos cuyas estructuras químicas varían ligeramente de aquellas drogas clásicas prohibidas que tratan de imitar.

Estos conceptos no son excluyentes, siendo posible que una sustancia pueda entrar en diversas categorías (Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (PNSD), 2011). Una sustancia, como fue el caso de la mefedrona (4-metilmetcatinona), puede emerger en el mercado combinado con otras sustancias como euforizante legal, y podría adquirirse también como sustancia química de laboratorio, etiquetado para no consumo humano (Gibbons y Zloh, 2010; González et al., 2013).



Figura 1. Formas de presentación de una NSP adquirida como euforizante legal (izquierda) y como sustancia química de investigación (derecha).

En el Informe Anual del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) de 2010 saltó la alerta sobre el incremento del consumo en Europa de nuevas drogas psicoactivas, sobre todo en población joven, sustituyendo a las feniletilaminas más conocidas como la MDMA o éxtasis (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2010). En 2013, esta tendencia al alza provocó que, por primera vez a nivel mundial, el número de NSP identificadas (n=251) superase al número de sustancias psicoactivas bajo control (n=234) (United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2013).

Desde el 2009 hasta el 2021, 134 países colaboradores a nivel global han notificado un total de 1127 de nuevas sustancias psicoactivas al Sistema de Alerta Temprana de la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) (Tabla 2). Los cannabinoides sintéticos son el grupo con mayor cantidad de sustancias vigiladas, habiendo sido detectados 324 en total. Las catinonas sintéticas constituyen el segundo puesto con un total de 201.

Tabla 2. Resumen de la cantidad de nuevas sustancias psicoactivas reportadas por primera vez a la UNODC de 2009 a 2021.

Grupos de sustancias	Ejemplos
Aminoindanos (9 sustancias)	1-aminoindano, 2-aminoindano, MDMAI.
Sustancias de origen vegetal (22 sustancias)	Ayahuasca, datura, Hawaiian baby woodrose (<i>Argyreia nervosa</i>), iboga, kava, khat, kratom, cactus de peyote, <i>Salvia divinorum</i> .
Sustancias tipo fenciclidina (26 sustancias)	Ketamina, 3-fluorofenciclidina.
Piperazinas (27 sustancias)	1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), 1-benzilpiperazina (BZP).
Nuevas benzodicepinas (30 sustancias)	Etizolam, phenazepam, pyrazolam, flualprazolam, diclazepam.
Triptaminas (60 sustancias)	5-MeO-DMT, 5-MeO-DIPT.
Análogos del fentanilo (79 sustancias)	Carfentanilo, acrilfentanilo.
Otras sustancias (173 sustancias)	Sustancias no incluidas en otras categorías, como los opioides sintéticos (U-47700).
Fenilaminas (176 sustancias)	2C-B-FLY, 2C-E, 4-FA, bromo-dragonfly, MBDB, phenethylamine, PMMA.
Catinonas sintéticas (201 sustancias)	Mefedrona, metilona, butilona, 4-fluorometcatinona, nafirona, 3-fluorometcatinona, metedrona, 3,4-dimetil-

	metcatinona, α -pirrolidinopentiofenona (α -PVP), bufedrona, pentedrona, clefedrona, N-etilhexedrona, 3-metilmecatinona (3-MMC), 3-clorometcatinona (3-CMC), metilendioxipirovalerona (MDPV).
Cannabinoides sintéticos (324 sustancias)	AM-2201, MAM-2201, UR-144, RCS-4, JWH-015, JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-210, JWH-250, CP-47,497-C8.

Según los datos de la UNODC, el número total de nuevas sustancias notificadas a nivel mundial ha experimentado un descenso notable en los últimos años, del centenar de sustancias que se notificaban en 2005 y 2006 a las 50 en 2021 (United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2022). En Europa, el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) monitorizaba a través del Sistema de Alerta Temprana un total de 914 NSP a finales de 2022, de las cuales 34 fueron detectadas por primera vez ese año (Figura 3). Hasta el 2021, las NSP con mayor cantidad de sustancias monitorizadas fueron los cannabinoides sintéticos (224), seguidos de las catinonas sintéticas (162) (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2022a).

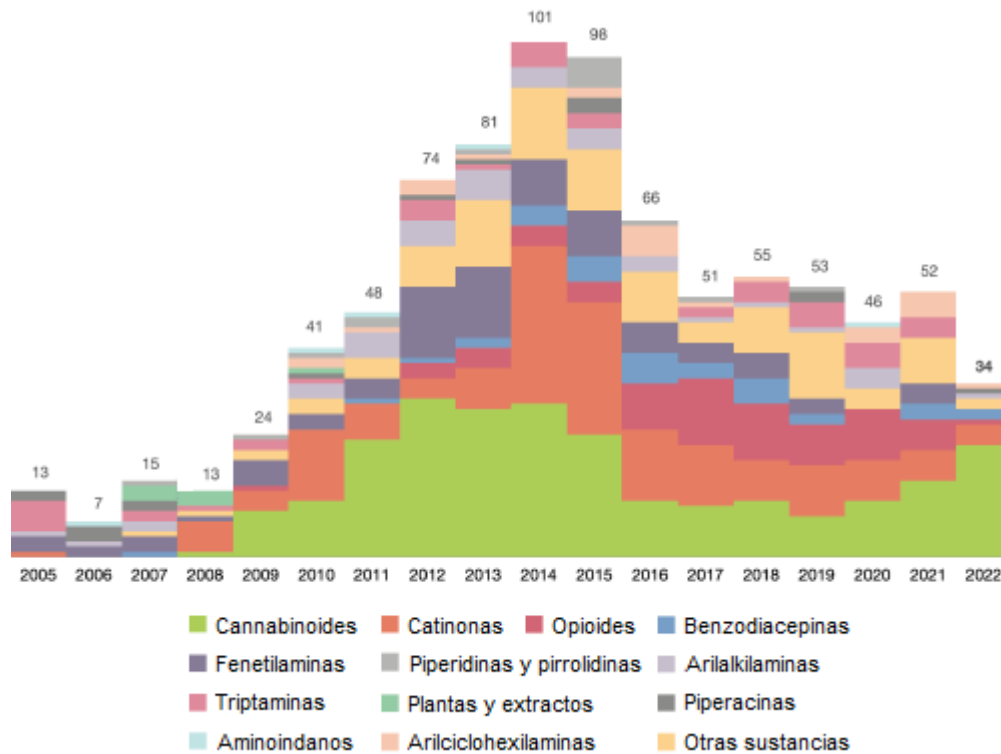


Figura 3. Nuevas sustancias psicoactivas encontradas en los mercados europeos entre 2011 y 2022. (Figura modificada de European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2022b).

Después de la expansión del mercado de las NSP entre los años 2010 y 2018, los números de estas sustancias detectadas en el mercado global parecen haberse estabilizado entorno a los 550 cada año (Figura 2). A pesar de los números estables, se mantiene como un mercado dinámico con nuevas sustancias emergentes y otras que desaparecen con el fin de adaptarse a las nuevas tendencias. También son retiradas del mercado tras su fiscalización por parte de las autoridades; por ejemplo, entre 2015 y 2021, se han incluido 68 NSP en las Convenciones de 1961 y 1971 (United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2022). Esta persistencia de las NSP en el mercado a pesar de los esfuerzos de las autoridades por controlarlas respondería a la necesidad de alternativas a las drogas actuales y del interés por los efectos psicoactivos que ofrecen (Peacock et al., 2019).

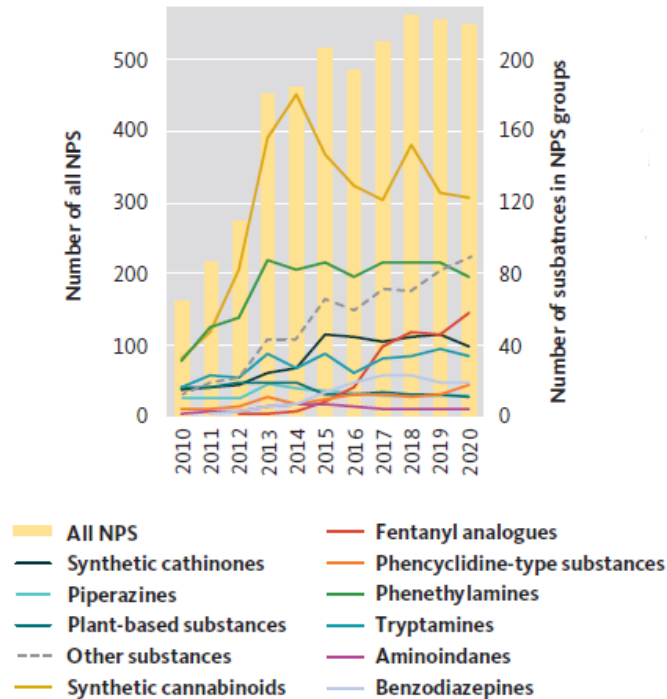


Figura 2. Número de NSP detectado en los mercados globales entre 2010 y 2020 (United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2022).

Otra fuente de información útil para conocer el consumo y el mercado de las NSP serían las incautaciones realizadas por las fuerzas de seguridad. Según los datos aportados por la UNODC, la cantidad de NSP incautadas ha disminuido en los últimos años de forma significativa a nivel global, especialmente de cannabinoides y catinonas sintéticas. Entre el 2016 y 2020, las NSP sintéticas con mayores cantidades incautadas son la ketamina (51%), seguido de los cannabinoides sintéticos (41%) y las catinonas sintéticas (6%) (United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2022). Sin embargo, según la EMMCDA, a nivel europeo las incautaciones de catinonas sintéticas han incrementado en los últimos años, de 0,75 toneladas en 2019 a 3,3 en 2020. Las principales protagonistas de estas incautaciones fueron la N-etilhexedrona, 3-MMC y 3-CMC (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2022a).

A pesar de ser un grupo muy amplio, la incidencia de consumo de las NSP es baja en comparación a otras drogas clásicas. En la encuesta European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs (ESPAD) realizada a aproximadamente 100.000 estudiantes de 35 países europeos se obtuvo que el 3,4% de los encuestados había consumido alguna vez en su vida alguna NSP. Los países con mayor prevalencia de consumo fueron Estonia (6,6 %) y Letonia (6,4%) (ESPAD Group, 2019).

La Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España (EDADES) que recoge los datos de consumo de la población de entre 15 y 64 años reportó que un 1,7% de los 17.899 encuestados admitió haber consumido alguna NSP en su vida. El grupo con una mayor prevalencia de consumo fue el de hombres jóvenes de entre 25 y 34 años con un 4,0%. Sin embargo, sigue siendo un grupo de sustancias desconocido por la mayoría de la población, puesto que el 81,1% de los encuestados admitió no haber oído nunca hablar de estas sustancias (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), 2021b). En la encuesta sobre uso de drogas en enseñanza secundaria en España (ESTUDES) a estudiantes de entre 14 y 18 años, detectó una prevalencia de NSP alguna vez en la vida del 2,0% (2,3% en hombres y 1,6% en mujeres) (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), 2021a).

Cabe señalar, que las NSP suelen venderse en muchas ocasiones como adulterantes de otras sustancias ilícitas o medicamentos de prescripción falsificados, por lo que es habitual que los consumidores (y en ocasiones también los distribuidores) sean desconocedores de la composición real del producto (Giné et al., 2014; Evans-Brown y Sedefov, 2017).

Para muchas de estas drogas no se dispone de datos publicados en revistas científicas sobre su mecanismo de acción, efectos farmacológicos, metabolismo y farmacocinética en humanos. La información inicial sobre la vía de administración, las dosis que se consumen, los efectos principales y su duración

o sus reacciones adversas, se conocen por las descripciones que aportan los consumidores en páginas web o foros especializados. Los primeros datos toxicológicos se obtienen, a menudo, de casos de intoxicación severa entre los jóvenes consumidores. El desconocimiento de su farmacología humana y potencial de abuso supone un desafío para el tratamiento agudo (intoxicación aguda), efectos tóxicos a largo plazo, así como para difundir medidas para la reducción de riesgos asociado a su consumo (Grupo de expertos Neptune, 2015).

La rápida aparición de muchas de estas sustancias dificulta la tarea de los organismos de control y los observatorios de drogas, tanto nacionales como internacionales (Peacock et al., 2019). Si bien es cierto que en algunos casos las intoxicaciones y los decomisos policiales permiten una reacción tardía de los gobiernos y autoridades, son las herramientas de escaneado de páginas web y foros especializados, tales como los proyectos Psychonaut o Rednet y el rastreador web NPSfinder, los que permiten dar alarma con mayor precocidad y obtener conocimiento actual de los nuevos consumos (Deluca et al., 2012; Corazza et al., 2013; Napoletano et al., 2020; Schifano et al., 2020; Zangani et al., 2020). Su continua introducción al mercado bajo diferentes marcas y mezclas y el hecho de que algunos se vendan en forma de ambientadores, inciensos de hierbas, sales de baño o fertilizantes, aunque tengan un uso muy diferente, ha propiciado esta dificultad en identificarlas, localizarlas y estimar realmente la extensión de su consumo (Kinyua et al., 2016).

1.2 Catinona natural y catinonas sintéticas

1.2.1 CATINONA NATURAL

La catinona es un alcaloide con propiedades psicoestimulantes presente en las hojas del arbusto *Catha edulis* (khat, qat o cat) (Figura 4) (World Health

Organization (WHO), 2006). La planta del khat tiene origen en Etiopía, aunque su cultivo y consumo se ha extendido a otras partes del mundo, especialmente a África Oriental y la Península Arábiga (Abebe, 2018). Se estima que su consumo regular oscila entre 10 y 20 millones. La forma de consumo habitual de este estimulante vegetal es a través de la masticación de las hojas frescas durante sesiones sociales, aunque también se ha descrito su ingestión a partir de infusiones con hojas secas o, raramente, fumándolas (Engidawork, 2017). La catinona de origen natural es conocida por producir efectos subjetivos relacionados con la euforia, incremento de energía y estimulación motora (Engidawork, 2017).



Figura 4. Fotografía de las hojas frescas del arbusto *Catha edulis* (khat, qat o cat).

1.2.2 CATINONAS SINTÉTICAS

Las catinonas sintéticas son derivados de origen sintético de la catinona natural y se consideran uno de los grupos más importantes dentro de las NSP (Valente et al., 2014). A mediados del 2000, emergieron en el mercado en forma de "legal highs", "sales de baño-bath salts", "abono para plantas" y "ambientadores" como consecuencia de la disminución de la disponibilidad y de la pureza de las metanfetaminas, 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA o éxtasis) y cocaína. Se denominaron "euforizantes legales" o "colocones legales" debido a su aparición como sustancias que evadían los controles internacionales y por sus efectos psicoestimulantes (Banks et al., 2014).

Las catinonas sintéticas comparten una estructura química de feniletilamina con la adición de un grupo cetónico (De Felice et al., 2014). Según la experiencia de los consumidores, las catinonas sintéticas tienen generalmente propiedades psicoestimulantes y/o empatógenas (Iversen et al., 2014). Sin embargo, este grupo de sustancias incluye un amplio espectro de productos cuyas propiedades toxicológicas y efectos farmacológicos pueden variar según sus modificaciones químicas (Calinski et al., 2019). Entre las catinonas sintéticas más conocidas en el mercado de sustancias de abuso se encuentran la mefedrona, metilona, metilendioxipirovalerona (MDPV), α -pirrolidinopentiofenona (α -PVP), 4-metiletcatinona (4-MEC), metilendioxi- α -pirrolidinobutirofenona (MDPBP), eutilona y otros derivados. (Ver apartado 1.3.2. Estructura química, donde se muestran las fórmulas de las catinonas en la Figura 6).

El uso indebido de NSP llevó inicialmente a las agencias y los gobiernos a prohibir a las catinonas sintéticas como sustancias únicas, pero una vez que estas drogas eran prohibidas, se alteraba ligeramente su estructura química para crear nuevas drogas legales (o no ilegales) con propiedades similares. Actualmente, aunque la mayoría de las sustancias mantiene su actividad principal como estimulante del sistema nervioso central, su estructura química presenta diferentes formas que modulan la intensidad, la duración y los efectos secundarios (Calinski et al., 2019).

A pesar de ser un grupo muy amplio, el consumo de catinonas sintéticas global es bajo. Según datos de consumo de estudiantes europeos, de 35 países encuestados solo en 19 se reportó consumo de catinonas sintéticas alguna vez en la vida con un promedio de 1,1%. Los países en los que se registró una prevalencia de consumo mayor fueron Irlanda (2,5%) y Chipre (2,4%). En general, las catinonas sintéticas se consumen más entre hombres que entre mujeres, con prevalencias de 1,4 y 0,8%, respectivamente. Concretamente en España, la encuesta detectó una prevalencia de consumo del 0,6%, con un 0,9%

entre los hombres y un 0,4% entre las mujeres (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2022a).

Debido al escaso consumo, es difícil detectar el consumo de ciertas catinonas sintéticas a través de encuestas epidemiológicas. Hasta la fecha, la mefedrona es la única catinona sintética incluida en el módulo específico sobre el consumo de NSP de las encuestas españolas EDADES y ESTUDES. En la encuesta EDADES detectaron una prevalencia de consumo de mefedrona del 0,2%, siendo el grupo de los hombres de entre 35 y 44 años el que reportó una mayor prevalencia (0,5%) (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), 2021a). Entre estudiantes de secundaria, el 0,3% de los encuestados reportó haber consumido alguna vez en su vida mefedrona (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), 2021b).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la veracidad de los resultados de cuestionarios reportados por consumidores puede estar comprometida debido a la frecuente modificación del nombre y las etiquetas de las catinonas sintéticas, llegando a confundir u ocultar el verdadero contenido para el consumidor (Madras, 2017; Palamar et al., 2017a).

Por otro lado, a pesar de que la mayoría de catinonas sintéticas se consideran sustancias de abuso debido a sus efectos psicoactivos, no todas se consumen con ese objetivo (Baumann et al., 2018). Por ejemplo, el dietilpropión (o anfepramona), incluido en la lista IV de sustancias controladas, se comercializó como supresor del apetito debido a su eficacia en el tratamiento a corto plazo de la obesidad (Cercato et al., 2009; Suplicy et al., 2014). Aunque el caso más conocido sería el del bupropión, una catinona sintética no controlada que se prescribe como antidepresivo y tratamiento farmacológico del tabaquismo (Wilkes, 2008; Patel et al., 2016).

1.3 Metilona

La metilona (3,4-metilendioxi-N-metilcatinona), es un análogo sintético de la catinona, conocida popularmente como "MDMC", "bk-MDMA" o "M1" por sus propiedades psicoestimulantes (World Health Organization (WHO), 2014).

Los químicos Peyton Jacob III y Alexander Shulgin sintetizaron por primera vez esta molécula en el año 1996 (Jacob y Shulgin, 1996; Heather et al., 2017). Inicialmente, se planteó su posible uso terapéutico como antidepresivo y potencial tratamiento para la enfermedad del Parkinson, aunque finalmente no llegó a estudiarse ni comercializarse con ese fin. En 2004 fue redescubierta y comercializada como un líquido ambientador en Smart shops de Holanda hasta su prohibición en 2005 (Karila et al., 2016).

Químicamente posee una gran similitud estructural con la MDMA (o éxtasis) de la cual solo difiere por la presencia de un grupo cetona en la posición β del anillo de fenetilamina. Actualmente, la metilona se vende como sustituto de la MDMA, falsamente etiquetada como MDMA o adulterante de otras drogas.

1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA

A finales de 2004 apareció en Holanda como constituyente principal de un producto llamado "Explosion" (Figura 5), el cual se podía obtener vía internet o en Smart shops. El producto se presentaba como un ambientador de habitaciones cuya etiqueta no describía sus ingredientes, aunque sí indicaba que no era para consumo humano para evadir las regulaciones de sustancias psicoactivas. A pesar de especificar que no era comestible, los usuarios reportaban el consumo del líquido con el fin de conseguir los efectos psicoactivos deseados. Su aumento de popularidad como catinona de primera generación se debió a ser considerada un sustituto a la MDMA por la similitud de sus efectos (Bossong et al., 2005).



Figura 5. Producto vendido como ambientador bajo el nombre de "Explosion" con contenido de metilona.

En 2011, la Administración de Control de Drogas (DEA) de los Estados Unidos la catalogó temporalmente dentro del control de emergencia de la Lista I, hasta que su inclusión fue permanente en 2013 (78 FR 21818) (Drug Enforcement Administration (DEA), 2013). La comisión de las Naciones Unidas introdujo a la metilona en la lista II del Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971 en la revisión realizada el 4 de noviembre de 2015 (United Nations, 2015). En esta lista se incluyen aquellas sustancias que presenten riesgo de abuso, que supongan una amenaza grave para la salud pública y su valor terapéutico sea bajo o moderado. En España, el Boletín Oficial del Estado (BOE) publicado el 18 de mayo de 2016 anunció la introducción de la metilona en la lista II anexo I del Real Decreto 2829/1977 (Boletín Oficial del Estado, 2016).

Los resultados aportados en 2013 por la Encuesta Mundial sobre Drogas (Global Drug Survey) revelaban que de los 2822 encuestados, el 7,76% había consumido metilona alguna vez en la vida (Palamar et al., 2017a). A nivel mundial, durante los años de mayor auge de la metilona, su consumo recreativo se extendió por Japón, Estados Unidos y Europa (World Health Organization (WHO), 2014).

El programa de la DEA dirigido a la recopilación sistemática de datos asociados a drogas conocido como Sistema Nacional de Información de Laboratorios

Forenses (NFLIS) notificó por primera vez el consumo de metilona en 2011. El incremento de popularidad la posicionó dentro de sus 25 drogas más reportadas al año siguiente. A pesar de los esfuerzos legislativos, los datos aportados por NFLIS revelaron que la metilona (33,35%) fue la catinona sintética más reportada en los Estados Unidos (EEUU) en el periodo comprendido entre 2013 y 2015 (U.S. Drug Enforcement Administration Diversion Control Division, 2016). Entre el 2013 y 2014, la metilona se encontraba en clubs tan frecuentemente como la MDMA (U.S. Drug Enforcement Administration Diversion Control Division, 2015). En esos años la metilona fue reportada 12.067 y 4.768 veces respectivamente, en comparación de la MDMA cuyo consumo se reportó 4.798 y 4.902 veces (U.S. Drug Enforcement Administration Diversion Control Division, 2014, 2016).

Existe poca información sobre su consumo en España. En un estudio realizado entre 2010 y 2011 se recogieron un total de 230 encuestas de consumidores de "research chemicals" reclutados en festivales musicales, el programa de reducción de riesgos por consumo de sustancias recreativas Energy Control y un foro online específico de drogas (González et al., 2013). Las catinonas sintéticas como la mefedrona y la metilona (n=134) se consumían sobretodo en clubs y bares (34%), en un ambiente privado como su propia casa (29,9%) y en el exterior como festivales, la playa o el campo (25,4%). La metilona (40,1%) fue la segunda sustancia más consumida después del cannabinoide sintético 2C-B (80%). Respecto al consumo combinado de dos o más "research chemicals", la metilona fue la sustancia más combinada. En este aspecto, la metilona se parecería a su análoga MDMA, la cual es conocida como una de las drogas más consumidas en combinación (Schifano et al., 1998; Grov et al., 2009; Chary et al., 2018).

Actualmente, se utilizan técnicas de análisis de diversas matrices biológicas para conocer el patrón de consumo y detectar casos de consumo de la metilona.

Hasta la fecha, la metilona ha sido detectada en diversas matrices biológicas como saliva (Krotulski et al., 2018; Richeval et al., 2018; Axelsson et al., 2022), orina (Mohr et al., 2018; Gomila et al., 2022), pelo (Palamar et al., 2016, 2017b; Salomone et al., 2017) y uñas (Busardò et al., 2020).

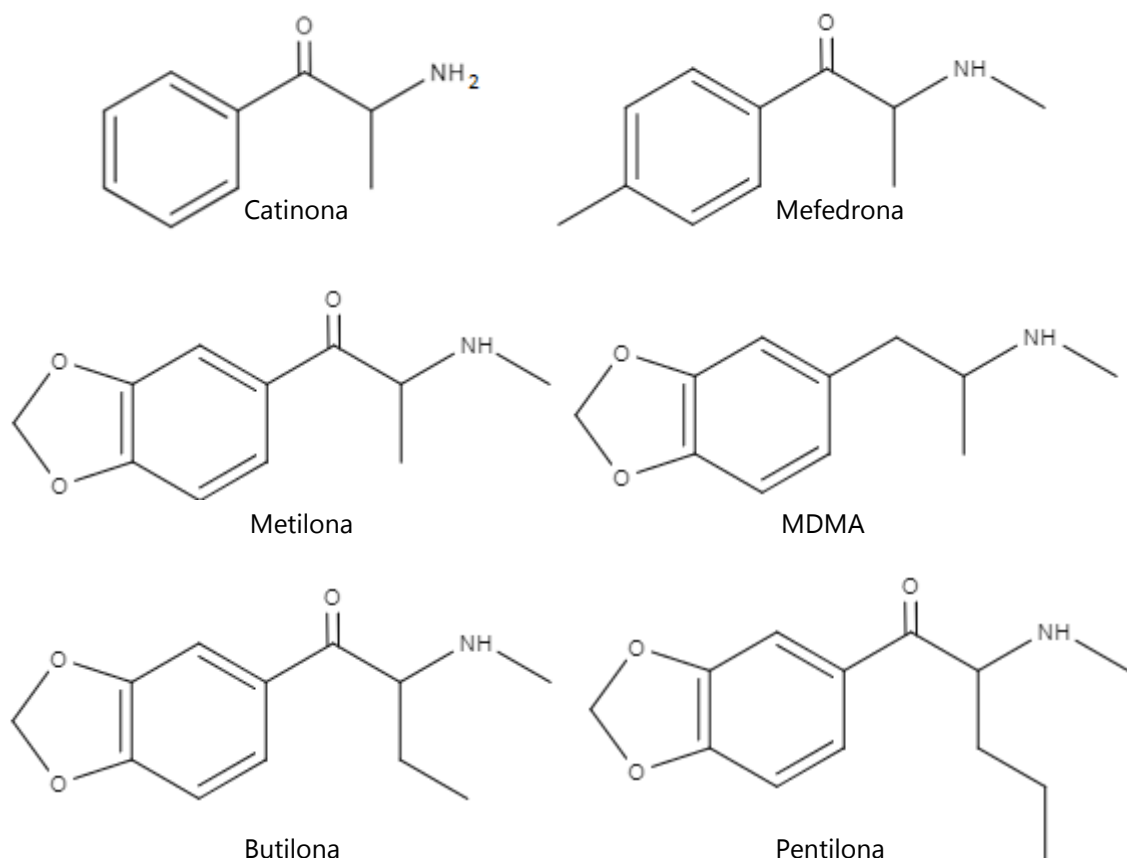
Además, el muestreo de las aguas residuales de las ciudades es de gran utilidad para establecer patrones de consumo de las sustancias de abuso. A raíz de un programa de monitoreo de las aguas residuales se detectaron niveles variables de metilona y mefedrona, especialmente durante los fines de semana (Australian Criminal Intelligence Commission, 2020). Este patrón era consistente con el de otras sustancias como la cocaína y la MDMA. También se han analizado las aguas residuales obtenidas de festivales, en los que la metilona fue la NSP más comúnmente detectada (Brett et al., 2022).

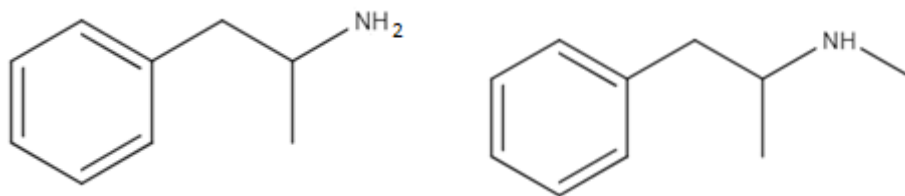
Como se ha mencionado anteriormente, el grupo de catinonas sintéticas es muy diverso y, aunque la metilona sea una de las más populares, su consumo en la actualidad es escaso en comparación con otras drogas clásicas como la MDMA. En este sentido, se estima que en Europa hay 1,9 millones de jóvenes adultos de entre 15 y 34 años y 3,7 millones de personas entre 15 y 64 años que consumieron MDMA en el último año entre 2015 y 2021 (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2022a). Según los datos más recientes de EDADES, en España un 5,0% de los encuestados entre 15 y 64 años admitieron haber consumido MDMA alguna vez en su vida, mientras que un 0,9% y un 0,3% reportaron consumo en el último año y mes, respectivamente (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), 2021b). Entre los estudiantes de secundaria españoles, un 3,1% ha consumido MDMA alguna vez en la vida, con una incidencia de consumo del último año del 1,8% y del último mes del 0,6% (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), 2021a).

1.3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA

La nomenclatura sistémica recomendada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) asignada a la metilona es 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)propan-1-one. Su fórmula molecular es $C_{11}H_{13}NO_3$, correspondiendo una masa molecular de 207,229 g/mol.

La metilona es una catinona sintética cuya principal diferencia sobre la molécula de la catinona es la sustitución de un anillo metilenedioxibenzil (dioxolano), el cual la aproxima estructuralmente a la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). La metilona es considerada el análogo metcatinona y β -cetona de la MDMA, ya que su estructura únicamente difiere por la presencia de una cetona en la posición β del grupo bencilo –de ahí que se la conozca también como β queto-MDMA– (Miner et al., 2017; Štefková et al., 2017). En la siguiente Figura 6 se muestran las estructuras químicas de la metilona y otras catinonas sintéticas y sustancias de abuso con estructuras químicas similares.





Anfetamina

Metanfetamina

Figura 6. Estructura química de la catinona, mefedrona, metilona, MDMA, butilona, pentilona, anfetamina y metanfetamina.

La molécula de la metilona tiene un centro quiral en el carbono C-2 de la cadena lateral de propano, resultando en la existencia de dos enantiómeros: R-metilona y S-metilona. Debido a su similitud estructural y funcional con la MDMA, se piensa que al igual que ésta, su enantiómero S podría ser más activo que la forma R (World Health Organization (WHO), 2014).

En comparación con otras catinonas sintéticas, la metilona tiene un anillo metilenodioxi (dioxolano) que lo diferencia de la mefedrona, la cual solo tiene un grupo metilo en la posición 4' del anillo fenilo (Calinski et al., 2019). Otras catinonas que contienen un anillo de metilenodiaoxi (dioxolano) en su estructura son la butilona y pentilona.

La metilona contiene un metilo en el grupo amino y en el carbón α del esqueleto β -quetofenetilamina. La cadena α -alquil difiere en la cantidad de metilos en las diversas catinonas, confiriendo más propiedades lipofílicas a medida que asciende el número de metilaciones (Grecco et al., 2017). Por ese motivo, la metilona es menos lipofílica que la butilona y la pentilona –con 2 y 3 metilos respectivamente–(Calinski et al., 2019).

1.3.3 FARMACOLOGÍA

1.3.3.1 Mecanismo de acción

La metilona, al igual que otros psicoestimulantes, ejerce sus efectos sobre el sistema nervioso central modulando las concentraciones de monoaminas – serotonina (5-HT), dopamina (DA) y noradrenalina (NA)– gracias a su capacidad

de interactuar con los transportadores de recaptación (Colado et al., 2018). Estos transportadores se ubican en la membrana celular de las neuronas serotoninérgicas, dopaminérgicas y noradrenérgicas por lo que se denominan transportadores de 5-HT (SERT), transportadores de DA (DAT) y transportadores de NE (NET), respectivamente (Flórez Beledo et al., 2014).

Las sustancias que interactúan con estos transportadores pueden clasificarse en inhibidores y sustratos. Los inhibidores, como la cocaína, son aquellos que provocan una acumulación de las monoaminas extracelulares a partir del bloqueo competitivo del transportador de recaptación de las propias monoaminas. En cambio, los sustratos pueden inducir la acumulación de monoaminas a partir del bloqueo del transportador de recaptación y a través de la reversión del flujo normal de estos transportadores, ocasionando la liberación (*release*) de monoaminas al espacio extracelular (Sandtner et al., 2016; Baumann et al., 2018) (Figura 7).

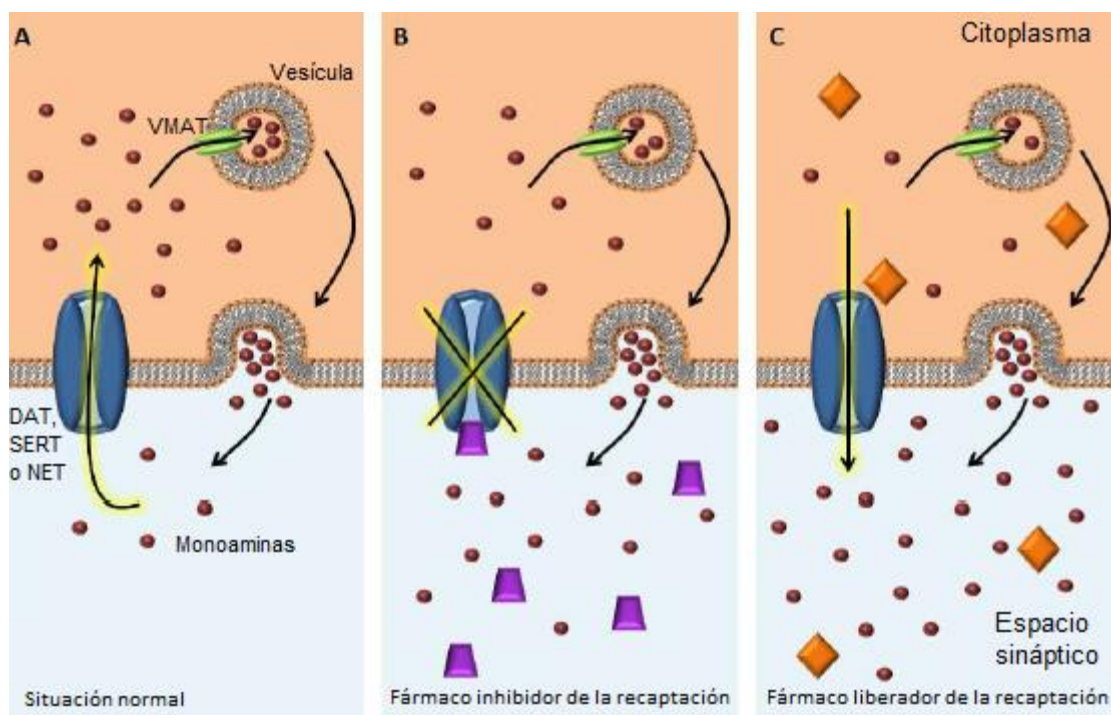


Figura 7. Mecanismo de acción de los fármacos inhibidores y liberadores sobre los transportadores de recaptación de monoaminas de la membrana plasmática neuronal. (Figura modificada de Hondebrink et al., 2018).

La metilona interacciona con estos transportadores como un sustrato, de igual forma que las anfetaminas, la MDMA y la mefedrona (Gutiérrez-López et al., 2023; O’Shea et al., 2023). Este mecanismo de acción estaría en parte relacionado la estructura química de estas sustancias; las catinonas con sustituciones en anillo, tales como la metilona y la mefedrona, tienden a funcionar como sustrato mientras que las pirrolidinofenonas, como la MDPV y α -PVP, muestran mayor potencia en la inhibición de la recaptación (Calinski et al., 2019).

INHIBICIÓN DE LA RECAPTACIÓN

La capacidad de inhibición de la metilona sobre los transportadores de recaptación de monoaminas se ha evaluado y demostrado en múltiples estudios *in vitro* (Cozzi et al., 1999; Nagai et al., 2007; Sogawa et al., 2011; López-Arnau et al., 2012; Simmler et al., 2013; Luethi et al., 2019). En la siguiente Tabla 3 se muestran los valores de IC₅₀, la mitad de la concentración inhibitoria máxima, de la metilona sobre los transportadores de recaptación obtenidos en estudios *in vitro* con sinaptosomas cerebrales en rata. Según estos resultados, la metilona actúa como un inhibidor no selectivo de DAT, NET y SERT con valores de IC₅₀ similares para los tres transportadores. A pesar de no ser selectiva, el orden de potencia sería SERT>NET>DAT, coincidiendo con la mefedrona y la MDMA, aunque esta última sí se consideraría selectiva con preferencia por SERT.

Tabla 3. Efectos en la inhibición de la recaptación de neurotransmisores por el transportador DAT, NET y SERT en los sinaptosomas cerebrales.

Fármaco	IC ₅₀ (nM)		
	Recaptación DAT	Recaptación NET	Recaptación SERT
Metilona	1232 ± 133	1031 ± 162	1017 ± 59
Mefedrona	762 ± 79	487 ± 66	422 ± 26
MDMA	1009 ± 39	450 ± 30	125 ± 11
Anfetamina	93 ± 17	67 ± 16	3418 ± 314

Cocaína	211 ± 19	292 ± 34	313 ± 17
MDPV	4,1 ± 0,5	26 ± 8	3349 ± 305

Datos extraídos de Baumann et al., 2013.

Un estudio describió una inhibición prolongada de la recaptación de 5-HT que podría suponer una alteración compleja en la funcionalidad del transportador en lugar de un simple bloqueo (López-Arnau et al., 2012).

Respecto a la razón DAT/SERT en los efectos de inhibición ($1/\text{DAT IC}_{50} : 1/\text{SERT IC}_{50}$), se obtuvo una razón de 2,7 (1,9-3,8) para la metilona, un valor superior en comparación a la MDMA, con razón de 0,12 (0,07-0,21) (Luethi et al., 2019). Esta diferencia de razones concuerda con otro estudio en el que se obtuvo una razón de 3,3 (1,5-6,8) para la metilona y de 0,08 (0,04-0,16) para la MDMA, lo que demuestra la mayor selectividad de la MDMA sobre SERT en comparación con la metilona (Simmler et al., 2013).

LIBERACIÓN

En estudios *in vitro*, la metilona ha demostrado actividad como sustrato no selectivo de los transportadores de monoaminas con un perfil comparable al de la MDMA (Nagai et al., 2007; Baumann et al., 2012, 2013; Simmler et al., 2014; Elmore et al., 2017). En la Tabla 4 se resumen los valores de EC_{50} , mitad de la concentración efectiva máxima, de la metilona sobre los transportadores de recaptación obtenidos en estudios *in vitro* con sinaptosomas cerebrales en rata. En cuanto a la selectividad, la metilona tiene un orden de potencia de liberación de $DA > NE > 5\text{-HT}$, coincidente con el de la mefedrona, pero de menor potencia. En cambio, la MDMA es más específica sobre SERT en comparación a las dos catinonas.

Tabla 4. Efectos en la liberación de neurotransmisores por el transportador DAT, NET y SERT en los sinaptosomas cerebrales.

Fármaco	EC ₅₀ (nM)		
	Liberación DAT	Liberación NET	Liberación SERT
Metilona*	117 ± 12	140 ± 17	234 ± 35
Mefedrona*	51 ± 5	58 ± 11	122 ± 10
MDMA*	42 ± 2	53 ± 7	39 ± 5
Anfetamina**	5,8 ± 0,4	6,6 ± 0,7	698 ± 71
Cocaína**	Inactivo	Inactivo	Inactivo
MDPV**	Inactivo	Inactivo	Inactivo

Datos extraídos de Baumann et al., 2013.

A la hora de evaluar los cocientes NET/DAT y DAT/SERT, los cocientes de la metilona (0,87 y 1,82) y la mefedrona (0,78 y 2,41) resultan cercanos a la unidad, de forma similar a la MDMA (0,95 y 0,97) (Baumann et al., 2012). De esta manera, el perfil de selectividad de las dos catinonas se asemejaría a la MDMA y, por lo tanto, diferiría del de las anfetaminas, cuya selectividad y potencia se centran especialmente en DAT y NET.

Resultados *in vivo* obtenidos mediante microdiálisis revelaron que la metilona produjo una elevación concurrente de DA y 5-HT extracelular, con efectos preferentes sobre 5-HT (Baumann et al., 2012).

Se ha determinado la afinidad de la metilona sobre ciertos transportadores con unos valores de la constante de inhibición (K_i) similares a la mefedrona. La metilona presenta una afinidad sobre los transportadores monoaminérgicos con valores de K_i de >30 μM para SERT, >25 μM para NET y 2,73 μM para DAT. Únicamente difiere en la afinidad con DAT en comparación a la mefedrona, la cual muestra una K_i de 3,4 μM. También se ha evaluado la afinidad de la metilona con otros receptores como 5-HT_{1A} (K_i>20 μM), 5-HT_{2A} (K_i>13 μM), 5-HT_{2C} (K_i>13 μM), receptores α-1-adrenérgicos (>6 μM), α-2-adrenérgicos (>20

μM), dopaminérgico-1 ($>13,6 \mu\text{M}$), dopaminérgico-2 ($>30 \mu\text{M}$) e histamínico ($>14,4 \mu\text{M}$) (Simmler et al., 2013).

Respecto a sus metabolitos, se analizó la actividad sobre los transportadores de la metilenedioxycatinona (MDC), 3,4-dihidroxi metcatinona (HHMC) y la 3,4-hidrometoximetcatinona (HMMC). Únicamente la MDC y la HHMC demostraron actividad como sustratos de los transportadores liberadores de monoaminas *in vitro*. Sin embargo, parece ser que la MDC es el único que ha mostrado capacidad de producir respuestas neuroquímicas y de comportamiento en situación *in vivo* (Elmore et al., 2017).

En un experimento con microdiálisis en núcleo accumbens de rata se evaluó la capacidad de modificar los niveles extracelulares de monoaminas de la metilona y sus metabolitos *in vivo*. La metilona y la MDC produjeron un aumento de DA y, especialmente, de 5-HT. Aunque MDC produjo efectos menores que la metilona, fue el único metabolito que alteró los niveles de monoaminas *in vivo* (Elmore et al., 2017). En otro estudio con células embrionarias humanas, se observó una actividad inhibidora de la MDC sobre la recaptación de 5-HT similar a la de la metilona, pero con menos potencia sobre NE y DA, lo que sugeriría menor contribución en los efectos psicotrópicos en comparación con la metilona (Luethi et al., 2019).

1.3.3.2 Efectos farmacológicos

EFFECTOS EN HUMANOS

La metilona se consume principalmente por vía oral mediante la ingestión de pastillas o cápsulas. Sin embargo, también se han descrito vías de administración alternativas tales como la intranasal (esnifada), intravenosa, sublingual o rectal (Karila et al., 2016).

Según los usuarios, las dosis orales habituales de metilona se encuentran entorno los 100 y 250 mg, considerándose dosis bajas aquellas entre 100 y 150

mg, dosis altas entre 160 y 270 mg y dosis muy altas las que superen los 250 mg (World Health Organization (WHO), 2014).

Los efectos de la metilona aparecen entre los 15 y 60 min tras su administración oral, alcanzando efectos máximos entre los 60 y 90 min. Según la experiencia de los consumidores, sus efectos tienen una duración total aproximada de entre 3 y 5 h (World Health Organization (WHO), 2014; Karila et al., 2016). En comparación con otras sustancias similares, la mefedrona produce unos efectos que aparecen rápidamente a los 15 min, obteniendo los efectos máximos a los 45 min, hasta que desaparecen a las 2-3 h. Los efectos subjetivos de la MDMA aparecen más tarde, aproximadamente a los 45 min alcanzando el máximo entre 1 y 1,5 horas tras la administración. Estos efectos perduran hasta desaparecer a las 4 horas (Papaseit et al., 2016).

Dada la corta duración de los efectos de la metilona, la re-dosificación es habitual entre los consumidores con el fin de prolongar sus efectos deseados. Este patrón de consumo también utilizado con la MDMA consiste en impulsar el inicio de los efectos con una dosis inicial alta ("boosting") seguida de dosis más bajas ("bumping") de entre 30 y 100 mg para mantenerlos (Hassan et al., 2017).

Los efectos deseados de la metilona descritos por los consumidores incluyen euforia, sensación de placer y bienestar, pensamiento acelerado, estado de alerta, fatiga reducida, aumento de la actividad locomotora y de la empatía. No obstante, estos efectos deseables pueden aparecer acompañados de ciertos efectos adversos como hipertensión, palpitaciones, mareo, paranoia, confusión, ansiedad, miedo, fatiga, pérdida de apetito, náusea, vómitos, molestias gastrointestinales, tensión y dolor muscular (Karila et al., 2016).

Hasta la fecha de realización del estudio experimental que se presenta en esta tesis doctoral, los efectos de la metilona en humanos únicamente se habían evaluado en un estudio observacional. La publicación relacionada a esos resultados no se incluye en el compendio de artículos de la presente tesis, pero

está adjuntada en el anexo 9.2. En dicho estudio observacional realizado en un ambiente natural, los participantes reportaron efectos estimulantes y empatogénicos que siguen el prototipo de sustancias como la MDMA, pero con menor intensidad (Poyatos et al., 2021). Este perfil farmacológico de la metilona sería muy similar al de la mefedrona, caracterizada por estimulación, euforia, sensación de bienestar y efectos leves de cambios en la percepción (Papaseit et al., 2016). Aunque estos efectos deseables de la metilona conducen a una sensación de refuerzo que, por lo tanto, sugiere un potencial de abuso, aún son necesarios datos adicionales que lo confirmen (Poyatos et al., 2022).

EFFECTOS EN ANIMALES

En estudios en rata en los que se evaluaba la farmacodinamia de la metilona se comprobó que produce un aumento de la capacidad de exploración, la actividad locomotora a la vez que se observaba un descenso de la ansiedad en pruebas de campo abierto (López-Arnau et al., 2013; Štefková et al., 2017; Centazzo et al., 2021; Warner-Schmidt et al., 2023). Los efectos farmacodinámicos máximos coincidían en el tiempo con el momento en el que las concentraciones de metilona en el cerebro alcanzaban su máximo (López-Arnau et al., 2013; Štefková et al., 2017).

La administración de metilona en animales se ha relacionado con un incremento modesto de la temperatura e hipertermia en función de la dosis (Piao et al., 2015; Elmore et al., 2017; Štefková et al., 2017; Javadi-Paydar et al., 2018; Centazzo et al., 2021). Este efecto de la metilona sobre la temperatura podría atribuirse al aumento de las concentraciones de 5-HT, considerado un neuromodulador crítico involucrado en termorregulación. La metilona estimularía el receptor 5-HT_{2A}, responsable de la hipertermia, a partir del incremento del tono serotoninérgico (Štefková et al., 2017).

La metilona incrementa significativamente la actividad locomotora en modelos animales, siendo este un efecto típico de los psicoestimulantes anfetamínicos (Gatch et al., 2013; López-Arnau et al., 2013; Štefková et al., 2017; Javadi-Paydar et al., 2018). En un estudio en el que se evaluaban los efectos locomotores y de refuerzo de la metilona, ésta exhibió un umbral de 1,0 mg/kg a partir del cual el aumento de la actividad motora comenzaba a ser significativo. A partir de dosis mayores de 10,0 mg/kg, el incremento sucedía de forma esencialmente lineal, sugiriendo una menor potencia como estimulante motor que otras catinonas sintéticas como las pirovalerona, α -PVP y MDPV, y mayor similitud con la mefedrona o el MDMA que con los derivados de la pirovalerona (Javadi-Paydar et al., 2018). Aunque ese estudio evidenció un incremento de la actividad locomotora dosis-dependiente (Javadi-Paydar et al., 2018), en otros estudios se obtuvo una disminución en las dosis más altas, quizás debido a un comportamiento estereotipado, como deambular en círculos (Gatch et al., 2013; Štefková et al., 2017).

Datos previos revelaron que la estimulación motora podría deberse a un incremento de DA en el núcleo accumbens, ya que la elevación de 5-HT no sería suficiente para producirla (Cozzi et al., 2013). Tras la administración endovenosa de 0,3 mg/kg de MDPV y 3,0 mg/kg de metilona se consiguieron similares elevaciones de DA extracelular pero acompañado de una gran elevación en la 5-HT extracelular en el caso de la metilona. Aunque las dos sustancias indujeron hiperactividad motora, fue significativamente mayor en el caso de la MDPV (Schindler et al., 2016). Estos resultados sugerirían que la elevación concurrente de los niveles de 5-HT y DA producidos por la metilona provocarían efectos sobre la actividad locomotora más atenuados en comparación con otras sustancias más selectivas de la DA.

Respecto a los metabolitos, como se ha comentado con anterioridad, la MDC y la HHMC han demostrado ejercer una potente actividad como sustratos con

afinidad por transportadores liberadores de monoaminas *in vitro*. En un experimento de microdiálisis en el núcleo accumbens de rata se evaluó la actividad *in vivo* de la metilona y los metabolitos MDC, HHMC y HMMC sobre los niveles extracelulares de monoaminas y la actividad motora. La metilona y la MDC produjeron un aumento de DA y, especialmente, de 5-HT que se tradujeron en efectos sobre la actividad locomotora. De esta manera, la MDC es el único metabolito que ha mostrado evidencias de afectar a la neuroquímica cerebral y al comportamiento locomotor cuando es administrado *in vivo*. Este hecho podría deberse a que la MDC es el único metabolito capaz de penetrar eficazmente en el sistema nervioso central. Estos resultados indicarían que la MDC contribuiría en los efectos psicoactivos aunque menores que los de la metilona (Elmore et al., 2017; Luethi et al., 2019).

1.3.3.3 Potencial de abuso y adicción

Hasta la fecha, no había estudios disponibles que evaluaran el potencial de abuso de la metilona en humanos. Como sucede con la mayoría de NSP, la información al respecto procede principalmente de las experiencias de los consumidores y, en este caso, de estudios en modelos animales principalmente dirigidos a evaluar el potencial de abuso, como los experimentos de auto-administración, discriminación y de preferencia de lugar en modelos animales.

El Sistema de Notificación Australiano de Éxtasis y Drogas Relacionadas (Australian Ecstasy and related Drugs Reporting System, EDRS) entrevistó a 1260 consumidores de las 3 clases de NSP más comunes en Australia (catinonas sintéticas, fenetilaminas alucinógenas y triptaminas alucinógenas). El 4% (n=50) de los encuestados admitió haber tomado metilona en los últimos 6 meses, y casi la totalidad de estos (n=46) habían consumido también MDMA durante ese periodo. Este grupo de personas valoró más positivamente la MDMA que la metilona en términos de efectos placenteros y en probabilidad de repetir

consumo. Entre las personas que habían consumido en los últimos 6 meses metilona y cocaína (n=25), la cocaína fue también mejor valorada en esos dos aspectos. Estos resultados sugieren que es poco probable que sus efectos sean la única razón por la que la metilona superase la popularidad de la cocaína y el éxtasis (Matthews et al., 2017).

En estudios preclínicos con roedores, la metilona produce efectos de auto-administración (*self-administration*) por vía intravenosa, demostrando su capacidad reforzadora en relación con la dosis (Watterson et al., 2012; Bonano et al., 2014; Creehan et al., 2015; Vandewater et al., 2015; Nguyen et al., 2017; Gannon et al., 2018; Khom et al., 2021). La metilona mostraría un potencial de abuso medio, similar o superior que el de la MDMA (Creehan et al., 2015; Vandewater et al., 2015; Aarde y Taffe, 2017; Khom et al., 2021). En cambio, los resultados de auto-administración posicionarían a la metilona como un reforzador menos potente que la MDPV, la metcatinona y la mefedrona (Watterson et al., 2012; Watterson y Olive, 2014; Creehan et al., 2015; Vandewater et al., 2015; Nguyen et al., 2017; Gannon et al., 2018).

Además, existen datos de estudios de discriminación (*drug discrimination*) que evaluaban, entre otras cosas, si la metilona producía efectos conductuales similares a otra sustancia a la que el animal había sido enseñado. En estos estudios se observó que la metilona sustituyó completamente a la MDMA en animales enseñados al consumo de esta última (Dal Cason et al., 1997; Gatch et al., 2013; Dolan et al., 2018). Se cree que este hecho podría deberse a la inducción por parte de la metilona de un estímulo discriminativo complejo mediado por los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos (Dolan et al., 2018). En otro estudio, en el grupo de ratas habituadas a la cocaína, todas las catinonas estudiadas sustituyeron completamente los efectos estimulantes discriminativos de esta con un orden de potencia de MDPV \geq metilona = mefedrona > nafirona = flefedrona > butilona. Mientras que en el grupo de

ratas entrenadas con metanfetamina, todas las catinonas también sustituyeron completamente la anfetamina pero con un orden de potencia de MDPV = mefedrona > butilona = metilona = flefedrona = nafirona (Gatch et al., 2013).

También se han investigado sus efectos de refuerzo en experimentos de preferencia de lugar condicionada en ratones (*conditioned place preference*). En esta prueba la metilona produjo unos efectos de recompensa comparables o mayores a los de la anfetamina, una sustancia conocida por exhibir propiedades adictivas. Los datos sugieren que la metilona y el MDPV muestran efectos parcialmente dosis-dependientes pero con menos indicadores de recompensa a dosis más altas (Karlsson et al., 2014).

Los resultados disponibles hasta el momento confirmarían el potencial de abuso de la metilona y lo compararían al de la MDMA. Hasta la fecha, no se ha descrito un síndrome de abstinencia relacionado con el cese de consumo de la metilona. Tampoco se han reportado casos de adicción a la metilona, posiblemente porque el consumo repetido conlleva a un cambio a una sustancia más abundante en el mercado como la MDMA, la metanfetamina o la cocaína. Por este motivo, cabe suponer que para el diagnóstico de síndrome de abstinencia o de trastorno por consumo de metilona aplicarían los criterios del trastorno por consumo de otros psicoestimulantes descritos en el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, 5ª edición (DSM-5) (American Psychiatric Association, 2013; Ianucci y Weiss, 2022; Konradi y Hurd, 2023).

1.3.3.4 Farmacocinética

Hasta la fecha, los datos disponibles sobre la farmacocinética de la metilona provenían principalmente de estudios en animales (López-Arnau et al., 2013; Elmore et al., 2017; Štefková et al., 2017; Grecco et al., 2018). No había datos experimentales publicados sobre su cinética en humanos y la escasa

información al respecto procedía de relatos de los consumidores recreativos e informes clínicos de los casos de intoxicación.

La metilona presenta una alta lipofilidad conferida por la cadena α -alquil, de manera que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica con rapidez alcanzando concentraciones hasta 5 veces superiores en el cerebro que en el plasma (Grecco et al., 2017; Štefková et al., 2017). También se ha demostrado la influencia de la cantidad de alquilos en la cadena sobre la cinética de la sustancia. La catinona pentilona, más lipofílica debido a una cadena más larga, consigue mayores valores de concentraciones máximas (C_{max}) y áreas bajo la curva (AUC) y tiene una semivida de eliminación ($t_{1/2}$) mayor que otras catinonas con cadenas más cortas, como la metilona y la butilona (Grecco et al., 2017).

En la Tabla 5 se resumen los resultados de los estudios sobre la farmacocinética de la metilona en modelos animales. La farmacocinética de la metilona se ha evaluado tras su administración oral, subcutánea e intraperitoneal (López-Arnau et al., 2013; Elmore et al., 2017; Štefková et al., 2017; Grecco et al., 2018; Gearlds et al., 2021).

La metilona administrada por inyección subcutánea a dosis de entre 3 y 20 mg/kg alcanza concentraciones máximas entre los 15 y 30 min (t_{max}) (Elmore et al., 2017; Štefková et al., 2017; Grecco et al., 2018). En un estudio en el administraron dosis de 3, 6 y 12 mg/kg se obtuvieron concentraciones máximas de 680, 1410 y 3170 ng/ml (Elmore et al., 2017).

En caso de ser administrada de forma oral a dosis de 15 y 30 mg/kg, puede alcanzar la concentración máxima en sangre de 1457 y 1896 ng/ml entre los 30 min y 1 h, respectivamente, demostrando una absorción rápida por esta vía (López-Arnau et al., 2013).

En comparación, los datos farmacocinéticos en ratas de la MDMA administrada por vía oral indicaban que las concentraciones máximas en sangre se alcanzaban entre los 19 y 34 min, con una $t_{1/2}$ de entre 46 y 97 min. En cambio, la mefedrona administrada también oralmente consigue concentraciones máximas más rápidamente entre los 26 y 56 min, con $t_{1/2}$ de 33 min (Baumann et al., 2009; Martínez-Clemente et al., 2013).

Tabla 5. Resumen de los estudios sobre la farmacocinética en sangre de la metilona en animales.

Referencia	Modelo animal	Dosis y vía de administración	Parámetros farmacocinéticos
(López-Arnau et al., 2013)	Ratas macho	10 mg/kg intravenoso	-
	Ratas macho	15 mg/kg oral (equivalente a 158 mg)	C_{max} : 1456,7 ng/mL (CV 15,8%) C_{max} : 0,50 h (CV 0,0%) $t_{1/2}$: 0,55 h (CV 4,5%) F: 89,00%
	Ratas macho	30 mg/kg oral (equivalente a 315 mg)	C_{max} : 1896,0 ng/mL (CV 69,2%) T_{max} : 0,97 h (CV 55,3%) $t_{1/2}$: 0,55 h (CV 4,5%) F: 78,40%
(Elmore et al., 2017)	Ratas macho	3 mg/kg subcutáneo	C_{max} : 680 ± 83 ng/mL T_{max} : 0,25 h $t_{1/2}$: $0,8 \pm 0,2$ h
	Ratas macho	6 mg/kg subcutáneo	C_{max} : 1410 ± 95 ng/mL T_{max} : 0,25 h $t_{1/2}$: $0,95 \pm 0,05$ h
	Ratas macho	12 mg/kg subcutáneo	C_{max} : 3170 ± 590 ng/mL T_{max} : 0,25 h $t_{1/2}$: $1,1 \pm 0,12$ h
(Štefková et al., 2017)	Ratas macho	10 mg/kg subcutáneo	T_{max} : 0,5 h
(Grecco et al., 2018)	Ratas hembra	20 mg/kg subcutáneo	C_{max} : $999,04 \pm 56,72$ ng/mL T_{max} : 0,5 h $t_{1/2}$: $2,23 \pm 0,31$ h
(Gearlds et al., 2021)	Ratones macho	10 mg/kg intraperitoneal	C_{max} aprox. 650 ng/mL T_{max} : 0,25 h

			t _{1/2} : 50,6 min
(Warner-Schmidt et al., 2023)	Ratas macho	5 mg/kg intraperitoneal	C _{max} : 1983 ng/mL t _{1/2} : 0,60 h AUC _{0-final} : 908 ng/mL·h
		10 mg/kg intraperitoneal	C _{max} : 4507 ng/mL t _{1/2} : 0,67 h AUC _{0-final} : 3242 ng/mL·h
		15 mg/kg intraperitoneal	C _{max} : 8470 ng/mL t _{1/2} : 0,81 h AUC _{0-final} : 7320 ng/mL·h

FARMACOCINÉTICA EN HUMANOS

Como se ha comentado, previamente a la realización de este proyecto doctoral, la información respecto a la farmacocinética de la metilona en humanos era muy escasa. Los datos disponibles provenían de informes clínicos de los casos de intoxicación que acudían a urgencias.

En el estudio observacional incluido en el anexo 9.2 de esta tesis se recogieron muestras de saliva en las que se analizaron las concentraciones de metilona. En el estudio participaron 8 voluntarios sanos (5 hombres y 3 mujeres) con una amplia experiencia en el consumo de psicoestimulantes, tales como la MDMA y/o catinonas sintéticas. Cada voluntario seleccionó la dosis de metilona oral que iba a consumir en base a su experiencia, de manera que se auto-administraron dosis de 100 mg (n=1), 150 mg (n=2, una mujer), 200 mg (n=4, dos mujeres) y 300 mg (n=1), con un promedio de dosis total de 187,5 mg. A partir de las muestras de saliva que se recogieron, se obtuvo un promedio de C_{max} de 15.514 ng/mL, que se alcanzó a las 2 h (2-2 h) post-administración. Estos datos se compararon con los resultados de la MDMA, auto-administrada en similares condiciones a 6 voluntarios (1 mujer y 5 hombres). Las dosis de MDMA seleccionadas fueron de 75 mg (n=3) y 100 mg (n=3), con un promedio de dosis total de 87,5 mg. Las concentraciones máximas de MDMA en saliva fueron de 2936 ng/mL a las 2 h (2-4 h).

Hay descripciones de concentraciones de metilona en diferentes matrices biológicas en casos de intoxicaciones, en su mayoría fatales (Cawrse et al., 2012; Pearson et al., 2012; Carbone et al., 2013; McIntyre et al., 2013; Barrios et al., 2016; Shimomura et al., 2016; deRoux y Dunn, 2017). En 4 casos post-mortem se detectaron concentraciones de metilona en sangre cardíaca ("heart blood") de 0,74, 0,12, 0,06 and 1,12 mg/mL; en 2 de ellos se encontró presencia de metilona también en orina en concentraciones de 38 mg/L y 0,22 mg/L (Cawrse et al., 2012). En otros 3 casos fatales relacionados con el consumo de metilona se detectaron concentraciones de 0,84, 3,3 y 0,56 mg/L en sangre periférica y 0,55 mg/L y 230 mg/L en orina (Pearson et al., 2012). En otros 2 casos se detectaron concentraciones de metilona más elevadas, en el primero encontraron 3,4 mg/L en sangre periférica (McIntyre et al., 2013) y en el segundo 3,13 mg/L en sangre periférica, 6,64 mg/mL en sangre central y 502 mg/L en orina (Barrios et al., 2016).

En el caso de la MDMA, su farmacocinética en humanos ha sido ampliamente investigada con múltiples estudios disponibles al respecto (Mas et al., 1999; De La Torre et al., 2000; Farré et al., 2004, 2007, 2015; Kolbrich et al., 2008; Mueller et al., 2009a; Desrosiers et al., 2013; Peiró et al., 2013; Hysek et al., 2014; Steuer et al., 2016; Papaseit et al., 2016). Se ha descrito que la MDMA seguiría una cinética no lineal, es decir, sus concentraciones no aumentan en proporción a la dosis consumida (De La Torre et al., 2000; Kolbrich et al., 2008). La diferencia en las razones metabolito/MDMA, siendo menor en dosis altas, indicarían que la generación de los metabolitos no es proporcional en función a la dosis (Kolbrich et al., 2008). Una explicación plausible para este fenómeno sería la autoinhibición de su propio metabolismo, ya que se conoce que la MDMA actúa como inhibidor de la actividad enzimática del CYP2D6, principal responsable de su metabolismo (O'Shea et al., 2023).

Las dosis únicas habitualmente utilizadas en los estudios de cinética de la MDMA se encuentran entre los 50 y 125 mg o 1,0 y 1,6 mg/kg si es en función

al peso. Tras una dosis única de 75 mg se alcanzaron concentraciones máximas a las 1,8 h (Mas et al., 1999; De La Torre et al., 2000), mientras que con las dosis de 100 y 125 mg se alcanzaron a las 1,5 y 3 h (Mas et al., 1999; De La Torre et al., 2000; Farré et al., 2007; Peiró et al., 2013; Hysek et al., 2014; Papaseit et al., 2016). La $t_{1/2}$ de la MDMA se encuentra entre las 7 y 8 h.

En comparación con otra catinona sintética, en un estudio de administración controlada en humanos, la mefedrona alcanzó concentraciones máximas a las 1,25 h y mostró una rápida semivida de eliminación de 2,15 h. La cinética de la dosis de 200 mg de mefedrona fue notablemente más rápida que la de la MDMA a 100 mg que se administró en comparación en ese estudio. La MDMA demostró una semivida de eliminación de 7,89 h, tras alcanzar concentraciones máximas a las 2 h (Papaseit et al., 2016). La mefedrona a dosis crecientes de 50 a 200 mg ha demostrado seguir una cinética lineal en humanos, incrementando las concentraciones plasmáticas en función de las dosis (Olesti et al., 2019).

PENETRACIÓN DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA

Además, es importante conocer la capacidad que tiene de penetrar en el sistema nervioso central dónde se darán las respuestas neuroquímicas y conseguir relacionar las concentraciones en el cerebro con la aparición de los efectos farmacológicos. En diversos estudios en rata se ha comprobado la buena capacidad de la metilona para atravesar la barrera hemato-encefálica para acceder al sistema nervioso central (López-Arnau et al., 2013; Štefková et al., 2017; Centazzo et al., 2021).

Respecto a los metabolitos, la MDC es el único que ha demostrado ser capaz de traspasar la barrera de forma eficiente; no es así para los metabolitos hidroxilados como la HMMC y la HMMC, los cuales no penetran eficazmente al cerebro.

Se considera que una razón de concentración en cerebro:sangre superior a 1 indica que la sustancia de estudio es capaz de penetrar en el cerebro. Tras su administración subcutánea en rata se observaron concentraciones de metilona en el cerebro muy superiores a las plasmáticas, con razones de 4,54 en el punto de máxima concentración (Štefková et al., 2017), más de 3 (rango 3-12) (Centazzo et al., 2021) o 39,5 en el caso de calcularla según las AUCs y no puntos en el tiempo (Grecco et al., 2018). Tras su administración oral en rata ha demostrado una razón de 1,42 (López-Arnau et al., 2013). El metabolito MDC tiene una buena capacidad de penetración con razones superiores a 3 (rango 3-14), mientras que para los metabolitos hidroxilados HHMC y HMMC se obtuvieron razones de menos de 0,2 (rango 0,01-0,2) (Centazzo et al., 2021).

Los datos en humanos disponibles hasta la fecha provienen de un estudio de la distribución de metilona en 4 casos postmortem en los que se obtuvo una razón promedio de 2,68 (1,19-4,66) (Cawrse et al., 2012).

1.3.3.5 Metabolismo

El metabolismo de la metilona se produce principalmente en el hígado. La metilona se metaboliza siguiendo una ruta muy similar a la descrita para su análogo estructural MDMA, con formación de metabolitos O-desmetilados y N-desmetilados (Mueller y Rentsch, 2012). En la Figura 8 se describen las principales vías metabólicas de la metilona.

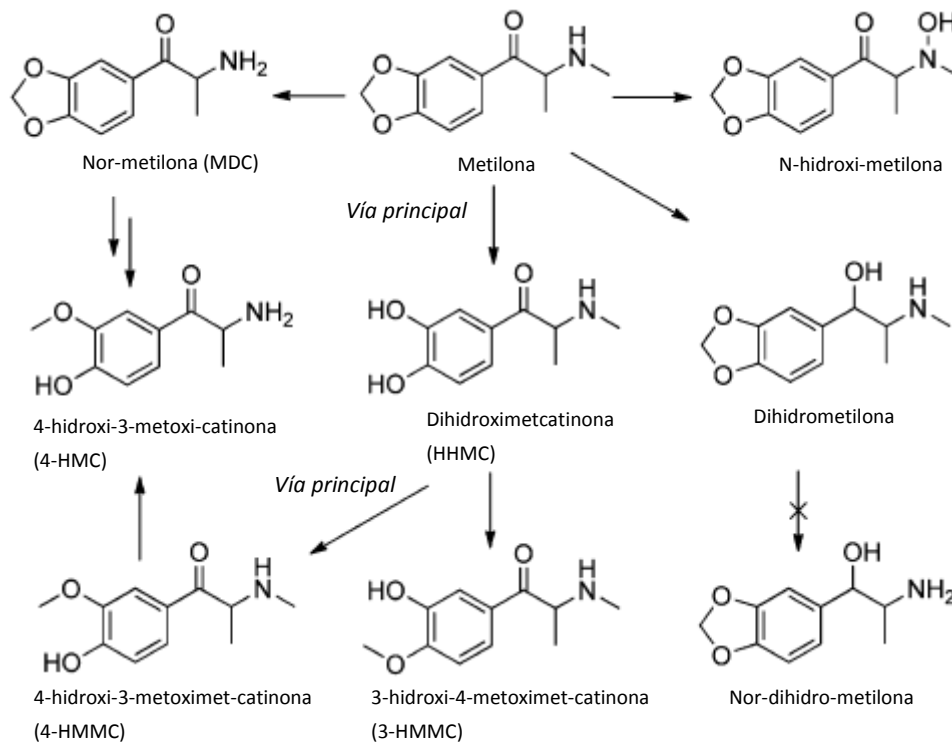


Figura 8. Principales vías metabólicas propuestas para la metilona a partir de metabolitos detectados en muestras biológicas humanas y de rata. (Figura modificada de Pedersen, *et al*/ 2013).

Se han llevado a cabo diversos estudios "in vitro" e "in vivo" en muestras de orina humanas y animales con el fin de detectar los diferentes metabolitos involucrados en su metabolismo (Kamata et al., 2006; Mueller y Rentsch, 2012; Pedersen et al., 2013; Elmore et al., 2017). La ruta metabólica de la metilona propuesta contiene principalmente dos vías por las que se forman los principales metabolitos:

1. De la metilona se produce una O-desmetilación de su anillo metilenedioxi formando la 3,4-dihidroxi-metcatinona (HHMC), mediado principalmente por el CYP2D6.
2. A partir del metabolito HHMC continúa con O-metilación de uno de los oxígenos que previamente formaban el anillo metilenedioxi resultando en 3,4-hidroxi-metoximet-catinona (HMMC).

3. Alternativamente, desde la metilona se produce en menor medida una N-desmetilación que resulta en la formación de la nor-metilona o 3,4-metilenedioxycatinona (MDC).

La formación de HHMC ha mostrado evidencias de no seguir una simple cinética monofásica, lo que podría deberse a una implicación de varias enzimas en su formación, aparte del CYP2D6 (Pedersen et al., 2013).

In vitro, la HHMC es el metabolito de la metilona más abundante y el que más persiste en sangre y, es a su vez, el que se encuentra en mayor cantidad excretado en muestras de orina de ratas y humanos (Kamata et al., 2006; Elmore et al., 2017). Su abundancia y por lo tanto amplia ventana de detección lo convierten en un buen candidato como biomarcador de exposición en análisis forenses (Elmore et al., 2017).

Como se ha comentado previamente, aunque se ha visto que tanto la MDC como la HHMC pueden actuar como sustratos de transportadores de monoaminas, únicamente la MDC ha demostrado contribución en los efectos psicoactivos en experimentos in vivo (Elmore et al., 2017; Luethi et al., 2019).

ACTIVIDAD DE CYP2D6

La metilona es metabolizada principalmente por la enzima CYP2D6 (95%) con la contribución de CYP1A2, CYP2B6 y CYP2C19. Según los resultados in vitro, la contribución de otros CYP sobre la eliminación de la metilona es muy minoritaria (Pedersen et al., 2013).

Los individuos con actividad reducida del CYP2D6 van a ser más susceptibles a sufrir una intoxicación por aquellas sustancias cuyo metabolismo dependa principalmente de esta enzima, como la metilona, MDMA o mefedrona. Sin embargo, una falta de funcionalidad se observa tanto en metabolizadores lentos como en situaciones en las que la actividad de la enzima está inhibida por la sustancia (ejemplo, inhibición basada en el mecanismo).

Existen evidencias de que la metilona es un inhibidor basado en el mecanismo de la enzima CYP2D6. Concretamente, produce una inhibición tiempo-dependiente consiguiendo una inactivación máxima con concentraciones altas de metilona. La MDMA también es un conocido inhibidor de su propio metabolismo a través del mismo mecanismo que la metilona. Sin embargo, la afinidad y capacidad de inhibición de la metilona es menor debido a la adición del grupo β -queto (Pedersen et al., 2013). Por lo tanto, es importante conocer la contribución de otras enzimas en el metabolismo de la metilona que puedan compensar por una actividad reducida del CYP2D6.

1.3.3.6 Efectos indeseables en humanos

Las sensaciones de euforia y bienestar suelen ser los efectos buscados por los usuarios a la hora de consumir psicoestimulantes como la metilona. Sin embargo, estos efectos deseados pueden ir acompañados de otros que consideran negativos y que aparecen como colaterales de los efectos de la metilona sobre el sistema monoaminérgico. En general, sus efectos indeseables siguen el patrón de los que se manifiestan tras el consumo de otros estimulantes como la MDMA u otras catinonas sintéticas.

Entre los efectos indeseables asociados al consumo de metilona se encuentran a nivel somático las palpitaciones, taquicardia, hipertensión, mareo, fatiga, anorexia, aumento de temperatura corporal, náuseas, vómitos, malestar gastrointestinal, bruxismo, rigidez mandibular y tensión y dolor muscular. Concretamente, a nivel psicológico se ha reportado confusión, miedo, ansiedad, paranoia, delirios, alucinaciones y psicosis (Prosser y Nelson, 2012; World Health Organization (WHO), 2014).

1.3.3.7 Intoxicación aguda en humanos

Desde su aparición en el mercado de las NSP se han documentado múltiples casos de intoxicaciones de metilona. Su uso recreativo se ha relacionado con diversos casos de intoxicaciones no fatales y fatales, especialmente en EEUU (Boulanger-Gobeil et al., 2012; Cawrse et al., 2012; Pearson et al., 2012; Warrick et al., 2012; Carbone et al., 2013; McIntyre et al., 2013; Barrios et al., 2016; Shimomura et al., 2016; Liakoni et al., 2017; Zaami et al., 2018; Gomila et al., 2022). Entre los principales síntomas de una intoxicación aguda grave por metilona se incluyen la acidosis metabólica, rabdomiólisis, fallo renal agudo, convulsiones, hiponatremia e hipertermia, entre otros (Boulanger-Gobeil et al., 2012; Pearson et al., 2012).

Aunque la metilona se vende a los usuarios como una sustancia relativamente segura, está asociada a fatalidades que incluyen principalmente hipertermia con temperaturas elevadas hasta los 41,7°C como síntoma principal del síndrome serotoninérgico, acidosis metabólica y fallo multiorgánico (Štefková et al., 2017). En casos de sobredosis mortales también pueden aparecer eventos cardíacos, rabdomiólisis, fallo renal agudo y coagulación intravascular (Hassan et al., 2017).

Concretamente, en tres casos mortales relacionados con el consumo de metilona se describieron episodios de acidosis metabólica en dos de ellos y síntomas similares a una toxicidad simpatomimética en otro, incluyendo acidosis metabólica, rabdomiólisis, fallo renal agudo y coagulación intravascular diseminada. En sangre periférica se detectaron concentraciones de 0,84, 3,3 y 0,56 mg/L (Pearson et al., 2012). Se describió también un caso de síndrome serotoninérgico tras el consumo en combinación de metilona y butilona, en cantidades estimadas de 844 y 106 mg respectivamente (Warrick et al., 2012).

En general, en un caso de intoxicación por metilona aparecerían signos y síntomas típicamente asociados a una intoxicación por estimulantes, los cuales

se encuentran recogidos en el DSM-5 (Tabla 6) (American Psychiatric Association, 2013).

Tabla 6. Criterios para el diagnóstico de una intoxicación por estimulantes.

Intoxicación por estimulantes
<p>A. Consumo reciente de una sustancia anfetamínica, cocaína u otro estimulante.</p> <p>B. Comportamiento problemático o cambios psicológicos clínicamente significativos (p. ej. euforia o embotamiento afectivo, cambios en la sociabilidad, hipervigilancia, sensibilidad interpersonal, ansiedad, tensión o rabia; comportamientos estereotípicos, juicio alterado) que aparecen durante o poco después del consumo de un estimulante.</p> <p>C. Dos (o más) de los signos o síntomas siguientes que aparecen durante o poco después del consumo de un estimulante:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Taquicardia o bradicardia.2. Dilatación pupilar.3. Tensión arterial elevada o reducida.4. Sudoración o escalofríos.5. Náuseas o vómitos.6. Pérdida de peso.7. Agitación o retraso psicomotores.8. Debilidad muscular, depresión respiratoria, dolor torácico o arritmias cardíacas.9. Confusión, convulsiones, discinesias, distonías o coma. <p>D. Los signos o síntomas no se pueden atribuir a ninguna otra afección médica y no se explican mejor por otro trastorno mental, incluida una intoxicación con otra sustancia.</p>

Algunos autores aconsejan sospechar de las catinonas sintéticas como causantes de cuadros de intoxicación en pacientes que tengan una historia de policonsumo de drogas y que cursen con síntomas simpatomiméticos y psicomotores, tales como taquicardia, hipertensión, hipertermia, confusión,

agitación, paranoia, alucinaciones, delirio excitado, psicosis y comportamiento violento (deRoux y Dunn, 2017). En estos casos así sería recomendable realizar análisis específicos de detección de catinonas sintéticas.

En animales no se han encontrado evidencias en la determinación de una dosis letal de metilona, pero sí se han obtenido efectos letales de dosis altas en ratas (40 mg/kg). La curva de dosis-respuesta de letalidad inducida por la metilona indica un incremento exponencial del 10 al 100% tras doblar la dosis de 40 a 80 mg/kg (Piao et al., 2015). Los síntomas observados incluyeron hiperventilación, convulsiones e hipertermia que podrían estar asociados al síndrome serotoninérgico (Štefková et al., 2017).

Tampoco se ha determinado una concentración letal de catinonas en humanos debido a la escasez de datos. En la mayoría de las muertes reportadas relacionadas con metilona se encuentran concentraciones entre 0,5 y 3,5 mg/L en sangre periférica (Zaami et al., 2018).

Hasta la fecha, no se ha establecido un protocolo de tratamiento para el manejo clínico de casos de intoxicación por metilona, por lo que se siguen las recomendaciones básicas de manejo en caso de intoxicaciones por psicoestimulantes y/o MDMA.

1.3.3.8 Posibles aplicaciones terapéuticas

La metilona fue inicialmente sintetizada como posible antidepresivo y potencial tratamiento para la enfermedad del Parkinson debido a su acción sobre el sistema monoaminérgico. Sin embargo, no llegó a estudiarse ni comercializarse con ese fin terapéutico y fue posteriormente redescubierto como sustancia de abuso. Actualmente, la metilona se consume principalmente con fines recreativos.

Recientemente ha resurgido el planteamiento de la metilona como opción terapéutica en combinación con psicoterapia en el tratamiento y recuperación de pacientes con trastorno por estrés postraumático (TEPT).

El TEPT es una afección psiquiátrica originada a raíz de la experiencia o presencia de un evento traumático que desencadena síntomas intrusivos, evitación persistente, alteraciones en el alerta y reactividad, y alteraciones negativas cognitivas y del estado de ánimo ante estímulos asociados al evento tiempo después de haber sucedido (American Psychiatric Association, 2013). El tratamiento de elección principalmente se basa en psicoterapia como la de exposición prolongada y la cognitivo-conductual, que puede acompañarse con tratamiento farmacológico. En este aspecto, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina se consideran los fármacos de primera línea. No obstante, ciertas comorbilidades asociadas a la resistencia a las opciones terapéuticas actuales impulsan la necesidad de encontrar nuevas alternativas farmacológicas, entre ellas la MDMA y la metilona (Farré et al., 2021).

Un estudio preclínico ha evaluado la actividad de la metilona como antidepresivo y ansiolítico en ratas a través de pruebas de campo abierto y de natación forzada. Los resultados fueron prometedores tras observar una reducción de la inmovilidad en la prueba de natación forzada y un incremento del tiempo de permanencia en el centro en la prueba de campo abierto. Estos resultados se interpretan como efectos antidepresivos y ansiolíticos, respectivamente, que posicionarían a la metilona como un posible candidato en el tratamiento de la depresión y ansiedad (Warner-Schmidt et al., 2023).

Adicionalmente, se han publicado recientemente una serie de casos en los que 21 pacientes (57% mujeres) recibieron metilona para tratar su TEPT. Los pacientes recibieron una o más dosis de metilona oral en un entorno psiquiátrico ambulatorio, con una duración del tratamiento que se extendía desde una sesión hasta los 3,5 años en algunos pacientes. Todos los pacientes

reportaron al menos una mejora mínima de su condición, mientras un 81% consiguieron una sustancial mejora de su condición según la Escala de Impresión Clínica Global (Kelmendi et al., 2022). En el registro ClinicalTrials.gov se ha inscrito recientemente un estudio inglés cuyo objetivo será evaluar de forma controlada la eficacia y seguridad de metilona en el TEPT (identificador del ClinicalTrials.gov NCT05741710).

En el caso de la MDMA, esta ha sido más ampliamente evaluada para esta potencial indicación, contando con 27 ensayos clínicos registrados en el clinicaltrials.gov y 6 ensayos clínicos para el tratamiento de la ansiedad. Existen varias publicaciones sobre el uso terapéutico de la MDMA y su eficacia como terapia asistida para el TEPT, la ansiedad social en autistas adultos, la ansiedad asociada a enfermedad terminal y en pacientes con trastorno por consumo de alcohol (Mithoefer et al., 2016, 2018, 2019; Ot'alora G et al., 2018; Sessa et al., 2019; Jerome et al., 2020; Mitchell et al., 2021).

Algunos expertos consideran la MDMA una prometedora alternativa terapéutica en combinación con la psicoterapia debido a sus efectos euforizantes y empato-génicos. La MDMA conseguiría aumentar la sensación de cercanía con el terapeuta y ayudaría a reducir la indisposición a la hora de compartir y abordar aspectos traumáticos durante las sesiones. En los estudios que han evaluado esta posible indicación, la MDMA administrada durante las sesiones ayudó a atenuar los síntomas del TEPT según la Escala para el TEPT Administrada por el Clínico según el DSM-5 (CAPS-5) (Mitchell et al., 2021).

En febrero de 2023, la agencia de medicamentos australiana conocida como Administración de Bienes Terapéuticos (Therapeutic Goods Administration) ha anunciado que la MDMA y la psilocibina podrán ser recetadas por psiquiatras autorizados para el tratamiento de casos de TEPT y depresión, respectivamente, que sean resistentes a tratamiento en combinación a psicoterapia y en entornos

Introducción

medicamento controlados (Therapeutic Goods Administration, 2023). Esta decisión será efectiva a partir del 1 de julio de 2023.

2. JUSTIFICACIÓN

2 JUSTIFICACIÓN

La metilona es una de las catinonas sintéticas más consumidas debido a la similitud de sus efectos subjetivos con los de la MDMA. En los últimos años, su consumo se ha relacionado con casos de intoxicación en los que aparecen síntomas similares a los producidos por MDMA, algunos de ellos con un desenlace fatal. A pesar de ello, los datos experimentales publicados proceden principalmente de investigaciones en modelo animal, en las que ha demostrado sus propiedades de refuerzo, menos potentes que las de otras catinonas sintéticas como la mefedrona y las pirovaleronas.

Previamente a la realización de esta tesis doctoral, la información respecto al potencial de abuso, farmacocinética y efectos farmacológicos de la metilona en humanos era muy limitada. Los escasos datos sobre su farmacocinética y efectos toxicológicos provenían principalmente de informes clínicos de los casos de intoxicación que acudían a urgencias hospitalarias. Igualmente, la información sobre el espectro y características de sus efectos farmacológicos se conocía a través del relato de los propios consumidores y a un estudio observacional.

El mencionado estudio observacional que evaluó los efectos farmacológicos de la metilona en humanos en un entorno natural sirvió como antecedente del estudio incluido en esta tesis. La publicación relacionada a esos resultados no se incluye en el compendio de artículos de la presente tesis, pero está adjuntada en el anexo 9.2. En el estudio observacional se incluyeron 8 voluntarios sanos (3 mujeres y 5 hombres) con una amplia experiencia en el consumo de psicoestimulantes. Las dosis de metilona evaluadas fueron seleccionadas por los propios voluntarios según su preferencia y experiencia previa. Finalmente, las dosis orales seleccionadas oscilaron entre los 100 y 300 mg, con un promedio de dosis total de 187,5 mg. La metilona indujo efectos de bienestar y

estimulación semejantes a los de la MDMA administrada bajo condiciones naturales parecidas y a dosis de entre 75 a 100 mg, con un promedio de 87,5 mg. Aunque el perfil de efectos de la metilona fue similar al de la MDMA, la intensidad fue menor.

Debido a la naturaleza del estudio, las muestras biológicas que se recogieron fueron de saliva, las cuales se utilizaron para analizar las concentraciones de metilona. Este estudio permitió concluir que la saliva era una matriz adecuada en la que detectar la presencia y, por lo tanto, el consumo de metilona.

Sin embargo, aún quedaba por explorar la farmacología de la metilona en condiciones controladas con el fin de perfilar y entender la cinética y potencial de abuso de esta catinona sintética en humanos. Este conocimiento de metilona será relevante desde una perspectiva sanitaria para aquellos profesionales que se enfrenten al manejo de intoxicaciones de esta sustancia. Además, determinar su potencial de abuso permitirá implementar actividades encaminadas a la prevención y detección precoz de futuros procesos patológicos asociados a su consumo.

Esta tesis incluye los primeros artículos publicados presentando datos sobre el potencial de abuso y la farmacología humana de la metilona. Previamente a realización de esta tesis, la metilona no había sido estudiada bajo condiciones experimentales en humanos.

3. HIPÓTESIS

3 HIPÓTESIS

1. La administración experimental de metilona presentará un elevado potencial de abuso, produciendo efectos subjetivos de tipo psicoestimulante, empatógeno-entactógeno y activación simpática.
 - 1.1. La metilona producirá estimulación, sensación de bienestar y euforia.
 - 1.2. La metilona producirá un incremento de la empatía con una sensación y deseo de mayor cercanía a los demás, y sentirse abierto y confiado hacia los demás.
 - 1.3. La metilona producirá un aumento de la presión arterial sistólica y diastólica y/o frecuencia cardiaca y provocará midriasis.
2. La farmacocinética de la metilona tras su administración experimental a dosis única en humanos presentará:
 - 2.1. Una absorción rápida.
 - 2.2. Una semivida de eliminación inferior a la de la MDMA.
3. La metilona producirá efectos farmacológicos de tipo psicoestimulantes y empatógenos similares a los de la MDMA.

4. *OBJETIVOS*

4 OBJETIVOS

1. Evaluar el potencial de abuso y los efectos farmacológicos agudos de la metilona en humanos.
 - 1.1. Evaluar los efectos psicoestimulantes de la metilona.
 - 1.2. Evaluar los efectos empatógenos de la metilona.
 - 1.3. Evaluar los efectos sobre las constantes vitales y diámetro pupilar de la metilona.
2. Determinar los parámetros farmacocinéticos de la metilona tras su administración experimental a dosis única en humanos.
 - 2.1. Determinar las concentraciones plasmáticas máximas y el tiempo en el que aparecen.
 - 2.2. Determinar la semivida de eliminación.
3. Comparar el perfil de efectos farmacológicos y la farmacocinética de la metilona con los de la MDMA.

5. MATERIALES Y RESULTADOS

5 MÉTODOS Y RESULTADOS

Los métodos y resultados se encuentran descritos en los respectivos manuscritos que conforman el compendio de artículos.

Se diseñó un ensayo clínico de Fase I, aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo y con MDMA como comparador activo. En los estudios se incluyeron voluntarios sanos con experiencia previa en el consumo de psicoestimulantes. Inicialmente, se realizó un estudio piloto con un escalado de dosis de 50 a 200 mg que permitiera definir el diseño del estudio definitivo. En el estudio piloto se incluyeron 12 participantes masculinos que recibieron dosis de 50 (n= 3), 100 (n= 6), 150 (n= 5) y 200 mg (n= 7) de metilona en comparación con placebo (n= 12) y MDMA (n= 3). Posteriormente, se llevó a cabo el estudio definitivo en el que participaron 17 sujetos (3 mujeres, 14 hombres) que recibieron la dosis seleccionada de 200 mg de metilona en comparación con 100 mg de MDMA y placebo.

Esta tesis por compendio incluye dos artículos:

5.1 Methylone and MDMA Pharmacokinetics Following Controlled Administration in Humans.

Poyatos, L., Lo Faro, A. F., Berardinelli, D., Sprega, G., Malaca, S., Pichini, S., Huestis, M. A., Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Busardò, F. P., & Farré, M. (2022). Methylone and MDMA Pharmacokinetics Following Controlled Administration in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14636), 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms232314636>.

En este artículo se describe la farmacocinética en sangre de la metilona a dosis crecientes y se compara con la MDMA. Corresponde al estudio piloto del ensayo clínico de Fase I.

5.2 Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans.

Poyatos, L., Pérez-Mañá, C., Hladun, O., Núñez-Montero, M., de la Rosa, G., Martín, S., Barriocanal, A. M., Carabias, L., Kelmendi, B., Taoussi, O., Busardò, F. P., Fonseca, F., Torrens, M., Pichini, S., Farré, M., & Papaseit, E. (2023). Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans. *Frontiers in pharmacology*, *14* (February), 1122861. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1122861>.

En este artículo se describen los efectos farmacológicos agudos de la metilona 200 mg en comparación con MDMA 100 mg y placebo. Corresponde al estudio definitivo del ensayo clínico de Fase I. En el anexo 9.1 se incluye el material suplementario de este artículo.

5.1 Methylone and MDMA Pharmacokinetics Following Controlled Administration in Humans.

Poyatos, L., Lo Faro, A. F., Berardinelli, D., Sprega, G., Malaca, S., Pichini, S., Huestis, M. A., Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Busardò, F. P., & Farré, M. (2022). Methylone and MDMA Pharmacokinetics Following Controlled Administration in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14636), 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms232314636>



Article

Methylone and MDMA Pharmacokinetics Following Controlled Administration in Humans

Lourdes Poyatos ^{1,†}, Alfredo Fabrizio Lo Faro ^{2,†}, Diletta Berardinelli ², Giorgia Sprega ², Sara Malaca ², Simona Pichini ³, Marilyn A. Huestis ⁴, Esther Papaseit ¹, Clara Pérez-Mañá ¹, Francesco Paolo Busardò ^{2,*} and Magí Farré ¹

¹ Servei de Farmacologia Clínica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP, IGTP), Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain

² Department of Excellence-Biomedical Sciences and Public Health, Università Politecnica delle Marche, 60121 Ancona, Italy

³ National Centre on Addiction and Doping, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy

⁴ Institute of Emerging Health Professions, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107, USA

* Correspondence: f.p.busardo@univpm.it; Tel.: +39-0712206274

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The aim of this study is to define, for the first time, human methylone and HMMC plasma pharmacokinetics following controlled administration of 50–200 mg methylone to 12 male volunteers. A new LC-MS/MS method was validated to quantify methylone, MDMA, and their metabolites in plasma. The study was a randomized, cross-over, double-blinded and placebo-controlled study, with a total of 468 plasma samples collected. First, 10 µL of MDMA-d₅, MDA-d₅ and methylone-d₃ internal standards were added to 100 µL of plasma. Two mL of chloroform and ethyl acetate 9:1 (*v/v*) were then added, mixed well and centrifuged. The supernatant was fortified with 0.1 mL acidified methanol and evaporated under nitrogen. Samples were reconstituted with a mobile phase and injected into the LC-MS/MS instrument. The method was fully validated according to OSAC guidelines (USA). Methylone plasma concentrations increased in a dose-proportional manner, as demonstrated by the increasing maximum concentration (C_{max}) and area under the curve of concentrations (AUC). Methylone C_{max} values were reported as 153, 304, 355 and 604 ng/mL, AUC_{0–24} values were reported as 1042.8, 2441.2, 3524.4 and 5067.9 h*ng/mL and T_{1/2} values as 5.8, 6.4, 6.9 and 6.4 h following the 50, 100, 150 and 200 mg doses, respectively. Methylone exhibited rapid kinetics with a T_{max} of 1.5 h for the 50 mg dose and 2 h approximately after all the other doses. HMMC exhibited faster kinetics compared to methylone, with a C_{max} value that was 10–14-fold lower and an AUC_{0–24} value that was 21–29-fold lower. Methylone pharmacokinetics was linear across 50–200 mg oral doses in humans, unlike the previously described non-linear oral MDMA pharmacokinetics. An LC-MS/MS method for the quantification of methylone, MDMA and their metabolites in human plasma was achieved. Methylone exhibited linear pharmacokinetics in humans with oral doses of 50–200 mg.

Citation: Poyatos, L.; Lo Faro, A.F.; Berardinelli, D.; Sprega, G.; Malaca, S.; Pichini, S.; Huestis, M.A.; Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Busardò, F.P.; et al. Methylone and MDMA Pharmacokinetics Following Controlled Administration in Humans. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14636. <https://doi.org/10.3390/ijms232314636>

Academic Editor: João Pedro Silva

Received: 2 October 2022

Accepted: 21 November 2022

Published: 23 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Keywords: methylone; MDMA; pharmacokinetics; humans; LC-MS/MS



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Synthetic cathinones are a class of novel psychoactive substances (NPS) that are structurally similar to cathinone, a naturally occurring psychoactive molecule from *Catha edulis* plants [1]. Among the most common cathinones are the 3,4'-methylenedioxy-N-alkylates, which are synthesized by adding a methylenedioxy group to the aromatic ring [2]. This produces substances similar to MDMA or ecstasy in chemical structure and psychotropic effects and resulted in their emergency placement into schedule I of the Controlled Substances Act in 2011 by the US Drug Enforcement Administration (DEA) [3].

3,4-methylenedioxy-methcathinone, more commonly known as methylone or MDMC, is a designer drug of the phenethylamine class that was first identified in 2009. The only structural difference between methylone and MDMA is the replacement of two hydrogen atoms with an oxygen atom in the β position of the phenylethylamine nucleus, forming a ketone group [4]. There are substantial pharmacological similarities between methylone and MDMA, including inhibition of neuronal reuptake of the monoamines dopamine and serotonin and increasing monoamine concentrations in the synaptic cleft [5,6]. In addition, MDMA, methylone and their metabolites displayed interaction with human monoamine transporters. Their capacity to inhibit their uptake may contribute to the effect of the parent drugs on the monoaminergic system, and consequently, to pharmacological effects in humans [7].

There are very few studies of the pharmacological effects of methylone in humans that show similar actions compared to MDMA [8].

For this reason, psychoactive effects, adverse health risks, and signs of intoxication following methylone intake are likely to be similar to those of MDMA [9].

Methylone is mainly metabolized in the liver, with N-demethylation producing 3,4-methylenedioxycathinone (MDC). Methylone is also O-demethylated to 3,4-dihydroxy-N-methylcathinone (HHMC) and the latter is subsequently O-methylated to 4-hydroxy-3-methoxy-N-methylcathinone (HMMC), a primary metabolite [10,11].

There is some evidence in animals for non-linear methylone pharmacokinetics similar to MDMA [10,12,13], due to the multiple structural and metabolic similarities of the two compounds. However, whether or not methylone pharmacokinetics are non-linear was not fully investigated.

The aim of this research is to define methylone's and HMMC's human pharmacokinetics and evaluate whether or not non-linear pharmacokinetics occur following controlled administration. To the best of our knowledge, this is the first study on the pharmacokinetics of methylone in humans and the first analytical assay for the simultaneous determination of methylone, MDMA and their related metabolites (HMMC, HMMA, HMA, and MDA). A new high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated to quantify methylone, MDMA and their metabolites in human plasma after controlled methylone and MDMA administration.

2. Results

2.1. Method Development and Validation

The best fit calibration model was a linear least-squares regression model with $1/\times^2$ weighting, as confirmed by Mandel test coefficients. All coefficient of determination results were greater than or equal to 0.99. Linearity, calibration results, LOD and LOQ are shown in Table 1. LOQ was set as the lowest non-zero calibrator for each analyte (Figure 1). There was no carryover observed with any of the analytes.

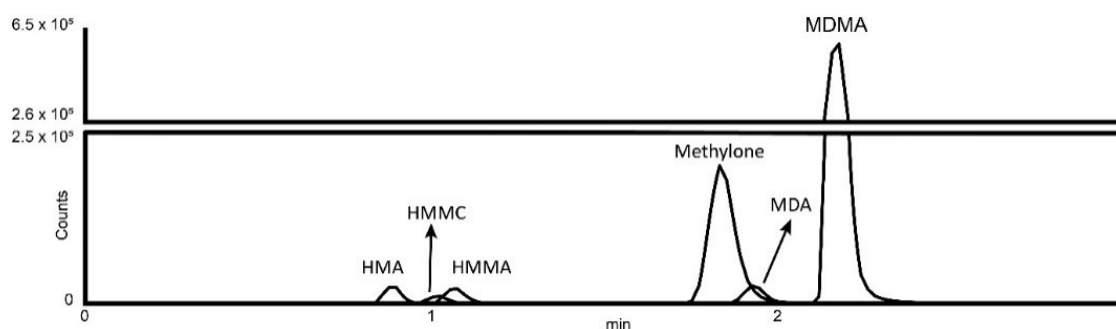


Figure 1. Extracted ion chromatogram of methylone, MDMA and their metabolites. Abbreviations: HMMC, 4-hydroxy-3methoxymethcathinone; MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine;

MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamine; HMA, 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine; HMMA, 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine.

Accuracy and imprecision were calculated at the following three QC concentrations ($n = 5$): 7.5, 150 and 350 ng/mL for MDMA and methylone; 1.5, 20 and 80 ng/mL for HMMC, MDA, HMMA and HMA. Bias was <20% of the target. The ANOVA approach defined by OSAC guidelines determined the overall within- and between-run imprecision [14]. All CV values were less than 20%, as shown in Table 1.

Table 1. Method validation parameters and Mandel's fitting test (p -value and $F_{crit95\%}$) for analytes under investigation in plasma sample.

Linear Range ng/mL	r^2	p -Value	$F_{crit95\%}$	LOD		LOQ		QC		Accuracy				Intra-Day Imprecision CV (%)				Inter-Day Imprecision CV (%)				Recovery (%)				Matrix Effect (%)			
				ng/mL	ng/mL	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H	L	M	H
Methylone	0.9973	0.126	2.495	0.5	2.5	7.5	150	350	120	95.8	117	1.4	3.5	5.0	3.7	5.9	3.9	112	103	96	7.3	-5.2	1.9						
HMMC	0.9892	0.741	0.110	0.1	0.5	1.5	20	80	102	96.5	101	2.5	4.0	6.1	2.1	7.1	2.2	111	105	107	3.1	-6.0	0.6						
MDMA	0.9985	0.857	0.032	0.5	2.5	7.5	150	350	93.0	93.5	98.6	1.7	3.9	1.7	2.2	4.6	2.2	113	102	103	1.5	-1.8	1.2						
MDA	0.9998	0.665	0.191	0.1	0.5	1.5	20	80	98.2	94.2	91.8	2.3	0.9	6.1	4.4	3.2	0.7	108	104	103	-7.7	-4.6	2.1						
HMA	0.9999	0.057	0.900	0.1	0.5	1.5	20	80	99.2	93.9	112	1.9	5.8	0.9	3.0	5.7	2.7	119	102	99.4	-4.0	-2.1	-3.8						
HMMA	0.9972	0.221	1.136	0.1	0.5	1.5	20	80	102	107	98.8	1.4	2.2	4.3	4.6	7.0	1.1	114	104	99.7	-8.5	-6.6	-5.2						

Abbreviations: HMMC, 4-hydroxy-3-methoxymethcathinone; MDMA, 3,4-methylenedioxyamphetamin; MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamin; HMA, 4-hydroxy-3-methoxyamphetamin; HMMA, 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamin; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; L, low-quality control; M, medium-quality control; H, high-quality control; CV, coefficient of variation.

There were no interfering peaks in any of the biological matrix pools analyzed. Dilution integrity was evaluated by extracting plasma samples with concentrations two times the ULOQ and diluting the samples 2-, 5-, 10- and 20-fold in blank plasma. Concentrations of replicates ($n = 5$) for the diluted samples were within $\pm 20\%$ of the target for all compounds.

All analytes were stable at room temperature for 24 h, when refrigerated ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 24 h, after three freeze/thaw cycles, 24 h post-extraction in the autosampler ($+10\text{ }^{\circ}\text{C}$) and when stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ up to 4 months after QC sample preparation (concentration differences less than 20% with respect to time zero response). Matrix effects were evaluated at low (1.5 and 7.5 ng/mL), mid (20 and 150 ng/mL) and high (80 and 350 ng/mL) concentrations. The post-extraction addition method determined ionization suppression (negative value) or ionization enhancement (positive value) within $\pm 20\%$ for all analytes.

2.2. Pharmacokinetics of Methylone, MDMA and their Metabolites

Figure 2 shows the time–concentration profiles for plasma methylone and HMMC after oral administration of 50, 100, 150 and 200 mg of methylone and MDMA, MDA, HMMA and HMA after oral administration of 100 mg of MDMA. The pharmacokinetic parameters derived from the data depicted in Figure 2 are presented in Table 2.

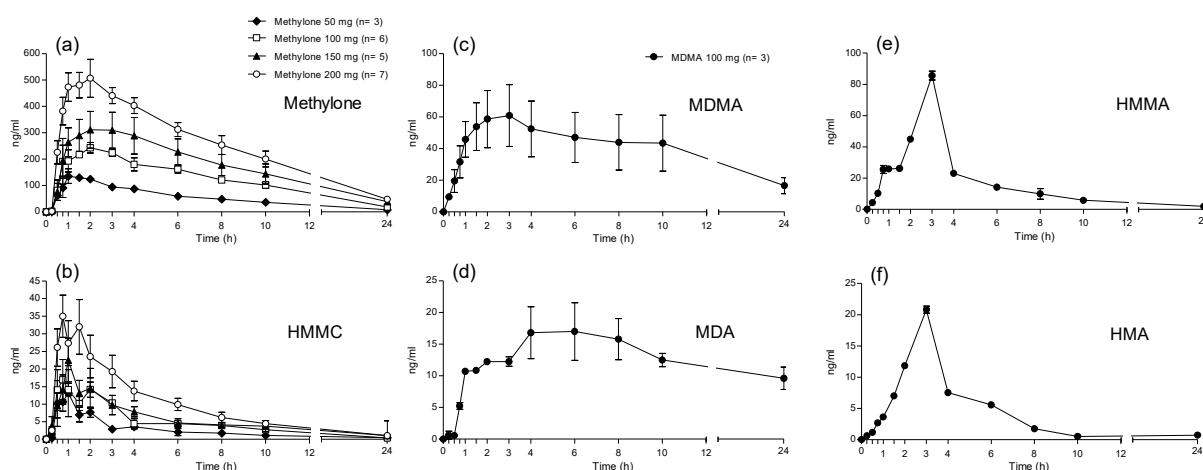


Figure 2. Time–concentration profiles for plasma (a) methylone; (b) HMMC; (c) MDMA; (d) MDA; (e) HMMA and (f) HMA. Error bars correspond to standard error.

Table 2. Pharmacokinetic parameters for plasma methylone, HMMC, MDMA, MDA, HMMA and HMA.

Analytes	Dose mg (Subjects)	Cmax ng/mL	Tmax h	AUC0–10 h-ng/mL	AUC0–24 h-ng/mL	T1/2 h	Clast ng/mL
Methylone	50 (n = 3)	153.0	1.5	729.2	1042.8	5.8	8.0
	100 (n = 6)	304.0	2.5	1596.2	2441.2	6.4	18.8
	150 (n = 5)	355.0	2.0	2245.6	3524.4	6.9	38.6
	200 (n = 7)	604.0	2.0	3329.1	5067.9	6.4	47.8
HMMC	50 (n = 3)	15.3	1.0	36.6	47.7	5.8	0.5
	100 (n = 6)	24.3	0.9	65.8	87.9	4.5	0.4
	150 (n = 5)	25.9	1.0	75.5	109.4	7.2	1.3
	200 (n = 7)	42.1	1.5	136.3	174.7	6.3	1.0
MDMA	100 (n = 3)	66.1	2.0	468.2	888.6	12.3	16.6
MDA	100 (n = 3)	21.9	4.0	135.9	290.8	44.7	9.6
HMMA	100 (n = 3)	85.6	3.0	240.8	294.1	5.4	1.8
HMA	100 (n = 3)	20.8	3.0	62.3	71.0	5.3	0.7

Abbreviations: HMMC, 4-hydroxy-3-methoxymethcathinone; MDMA, 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamine; HMA, 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine; HMMA, 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine; C_{max}, maximum concentration; T_{max}: time to reach maximum concentration; AUC, area under the curve; T_{1/2}, elimination half-life; C_{last}, last concentration at 24h.

As shown in Figure 3, the methylone plasma concentrations increased in a dose-proportional manner, as demonstrated by the increasing C_{max} and AUC values. Methylone C_{max} values were reported as 153.0, 304.0, 355.0 and 604.0 ng/mL following the 50, 100, 150 and 200 mg doses, respectively, while the corresponding AUC_{0–10} values were 729.2, 1596.2, 2245.6 and 3329.1 h*ng/mL and the AUC_{0–24} values were 1042.8, 2241.2, 3524.4 and 5067.9 h*ng/mL. Methylone exhibited rapid kinetics with a T_{max} of 1.5 h for the 50 mg dose and 2 h approximately after all other doses. Twenty-four hours after drug administration (T_{last}), the methylone concentrations were 8.0, 18.8, 38.6 and 47.8 ng/mL following the 50, 100, 150 and 200 mg methylone doses, respectively, yielding T_{1/2} values of 5.8, 6.4, 6.9 and 6.4 h, respectively.

For methylone's metabolite HMMC, the C_{max} values were 10–14-fold lower, the AUC_{0–10} values were 19–24-fold lower and the AUC_{0–24} values were 21–29-fold lower than those of methylone. HMMC C_{max} occurred between 0.9 and 1.5 h. C_{last} concentrations were 0.5, 0.4, 1.3 and 0.8 ng/mL at 24 h, respectively.

C_{max} for the 100 mg oral MDMA dose was 66.1 ng/mL at 2.0 h (T_{max}), AUC_{0–10} was 468.2 h*ng/mL and AUC_{0–24} was 888.6 h*ng/mL. For MDMA metabolites, MDA C_{max} was 21.9 ng/mL after 4.0 h, AUC_{0–10} was 135.9 h*ng/mL and AUC_{0–24} was 290.8 h*ng/mL. HMMA C_{max} was 85.6 ng/mL at a T_{max} of 3 h and AUC_{0–24} was 294.1 h*ng/mL with a T_{1/2} value of 5.4h and at 24 h, this reduced to a concentration (C_{last}) of 1.8 ng/mL. Finally, HMA C_{max} was 20.8 ng/mL with a T_{max} of 3 h and AUC_{0–24} was 71.0 h*ng/mL, with a T_{1/2} of 5.3 h and C_{last} of 0.7 ng/mL after 24 h. HMMC concentrations were approximately 20 times lower than methylone's drug concentration, for all administered doses (50, 100, 150 and 200 mg), while HMA, HMMA and MDA concentrations were 8-, 2- and 8-times lower than MDMA's concentrations, respectively. The relative concentrations of MDMA and its metabolites were MDMA > HMMA > MDA > HMA.

The dose response based on C_{max} for the 50, 100, 150 and 200 mg oral doses of methylone resulted in dose-proportional values of 3.1, 3, 2.4 and 3, respectively, and based on AUC_{0–24}, a similar proportionality was observed for the values of 20.8, 24.4, 23.5 and 25.3. In contrast, de la Torre et al. showed non-dose-proportional AUC values for oral 50, 75, 100, 125 and 150 mg MDMA doses of 9.15, 17.8, 18.5, 21 and 34.5, respectively, confirming the non-linear pharmacokinetics of MDMA [12].

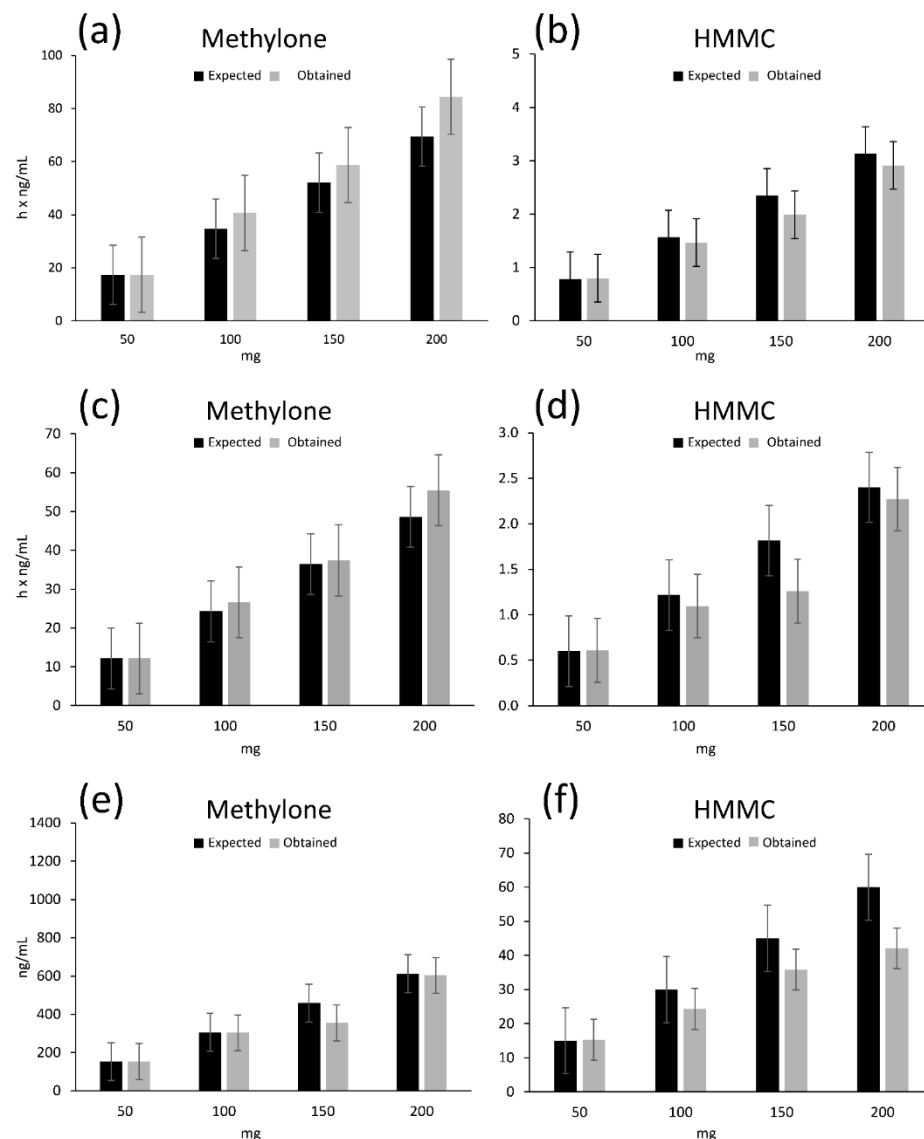


Figure 3. Comparison of expected vs. observed (a,b) area-under-the-curve 0–24 values (AUC0–24); (c,d) area-under-the-curve 0–10 values (AUC0–10); (e,f) maximum concentration (Cmax) values of methylone and HMMC, respectively. HMMC, 4-hydroxy-3methoxymethcathinone.

3. Discussion

The analytical method was fully validated over five consecutive days for the simultaneous quantification of methylone, MDMA and their metabolites and later applied to authentic samples. Plasma samples were collected from twelve male participants after administration of controlled doses of methylone and/or MDMA. Overall, this rapid and simple HPLC-MS/MS method enabled robust and sensitive quantification of methylone, MDMA and their metabolites, with good precision, accuracy, and efficiency. All analytes were stable at room temperature, 4 °C and –20 °C for 24 h, and also after three freeze/thaw cycles, demonstrating the applicability of the validated method for routine analysis.

As expected, methylone concentrations were dose-proportional, at least at the doses administered from 50 to 200 mg. Methylone concentrations were higher than MDMA concentrations at the same 100 mg dose; however, not all participants received all doses ($n = 3$). Regarding metabolites, at a 200 mg methylone dose, HMMC concentrations were approximately 20-times lower than the parent drug concentrations, HMMC concentrations were 16-fold lower than the parent drug, while MDA concentrations were 3-times lower than MDMA after the 100 mg dose.

Previous studies reported that methylone is extensively metabolized in a manner similar to its structural analog MDMA, as illustrated by the formation of *O*-demethylated metabolites (such as HMMC). The pharmacokinetics of MDMA were studied in both humans and animal models, and it was widely demonstrated that MDMA concentrations exhibit non-linear behavior, due to the inhibition of its own metabolism [14–16]. By contrast, Elmore et al. found non-linear pharmacokinetics in rats after subcutaneous administration of methylone at doses of 3, 6 and 12 mg/kg [9]. Unlike its structural analog, linear pharmacokinetics were observed for methylone and its more abundant metabolite (HMMC) in humans, as shown here. It was also verified that plasma concentrations of methylone and its metabolite displayed more rapid kinetics when compared with MDMA [9,10]. Methylone is a common drug of abuse, but to date, only a few studies have addressed its pharmacokinetics and metabolism in animal models [10,17].

For the first time, we investigated the pharmacokinetics of methylone and HMMC in humans and documented linear pharmacokinetics based on normalized C_{max} and AUC values. However, the observed variance is most likely related to individual variability and different participants who received the 50, 100, 150, 200 mg doses of methylone. Comparison of the normalized AUC_{0–10} and AUC_{0–24} values obtained in this study (14.5, 15.9, 14.9, 16.6 and 20.8, 24.4, 23.5, 25.3, respectively) with those obtained by de la Torre et al. for MDMA (9.15, 17.8, 18.5, 21 and 34.5) further supports the thesis of methylone linear pharmacokinetics. The elimination half-life of methylone was 6 h, considerably higher than other cathinones, such as mephedrone (2,3 h) or cathinone (4 h), but considerably less than other phenethylamines, such as MDMA (around 8 h) or amphetamine–methamphetamine (12 h) [18].

A limitation of the present study is that only one methylone metabolite, HMMC, was measured. Unfortunately, nor MDC or HHMC could be determined due to the unavailability of pure chemical standards at the time of the study.

There are few published reports on methylone intoxication [18,19], but given the pharmacological similarity between methylone and MDMA reported in an observational study, there most likely are toxicological effects [20,21]. The toxicological consequences of methylone non-linear pharmacokinetics in animals are poorly understood. In humans, the enzyme CYP2D6 is inhibited by MDMA, and in animals, methylone results in the same inhibition. Our results, in the range of 50–200 mg, showed linear pharmacokinetics and do not support CYP2D6 inhibition. Furthermore, substrates of the enzyme (MDMA and MDA) could be responsible for pharmacokinetic interactions, leading to acute toxic and neurotoxic effects.

Furthermore, it has been described that the disposition of MDMA is mainly affected by the CYP2D6 polymorphism. However, this influence may be less relevant due to the effect of the self-inhibition mechanism of MDMA on this enzyme and the contribution of other isoenzymes of cytochrome P450 in the metabolism process [22–24]. When assessing this effect on pharmacokinetics, it was observed that poor metabolizers achieved higher maximum concentrations of MDMA (+15%) and MDA (+50%), but lower concentrations of HMMA (–50–70%) compared to extensive metabolizers. These differences may have implications in pharmacological effects and toxicity, since poor metabolizers experience higher and faster increases in blood pressure and subjective effects [23]. In addition, higher concentrations of HHMA could lead to the increased formation of some quinones, which are involved in the mechanisms of serotonergic neurotoxicity [25]. Similarly, a potential influence of enzyme polymorphisms on the toxicity of the reactive intermediate methylone metabolite HHMC can be hypothesized. However, it is still unknown if these effects also occur after methylone administration and further studies to verify this hypothesis are needed.

Considering the few methylone deaths reported in the literature and the fact that methylone exhibits linear pharmacokinetics, it is possible that dose-response proportionality protects against overdose. These results must be confirmed in large samples of subjects and doses in future studies.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Materials

MDMA, MDA, HMMA, HMA, methylone and HMMC standards were purchased from Cerilliant (Texas, USA). Deuterated internal standards (ISTD) MDMA-d5, MDA-d5 and methylone-d3 were acquired from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Standards were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. LC-MS grade water, methanol, acetonitrile, formic acid, chloroform and ethyl acetate were obtained from Carlo Erba (Cornaredo, Italia). Ammonium hydroxide (25% purity) and hydrochloric acid (37% purity) were purchased from Honeywell Fluka™ (Morristown, NJ, USA).

4.2. Calibrators and Quality Control (QC) Solutions

Two different aliquots (I and II) from each standard stock solution were prepared. Calibrators were made from aliquot I standard stock solution that contained all analytes at 10 and 100 ng/mL in acetonitrile. Aliquot II standard stock solutions (10 and 100 ng/mL) were used to prepare quality controls (QCs). ISTD stock solution was prepared with the same procedure mentioned above at 100 and 1000 ng/mL concentrations and stored in glass vials at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Blank human plasma was provided by the University storehouse. Plasma was evaluated by in-house routine chromatography–mass spectrometry methods to ensure the absence of methylone and MDMA and their metabolites and the most prevalent drugs of abuse and pooled for the preparation of calibrators and QC.

Based on an initial semi-quantitative analysis of authentic plasma samples, the following calibrators were prepared: 2.5, 5, 25, 50, 250 and 500 ng/mL for methylone and MDMA, and 0.5, 1, 10, 25, 50 and 100 ng/mL for HMMC, MDA, HMA and HMMA. MDMA and methylone low-, medium-, and high-QC samples were 7.5, 150 and 350 ng/mL, respectively, and HMMC, MDA HMA and HMMA low-, medium-, and high-QC samples were 1.5, 20 and 80 ng/mL, respectively.

4.3. Controlled Methylone and MDMA Administration to Humans

A randomized, cross-over, placebo-controlled, double-blind study was conducted using 12 male volunteers (mean age: 23 years old (range 22–24); mean weight: 70,2 (range 60.4–87 kg)) at the Hospital Universitari German Trias i Pujol, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, in Badalona, Spain. All participants have recreational experience with psychostimulants, such as cocaine, amphetamines, MDMA and synthetic cathinones. Each subject participated in three experimental sessions, during which they received single oral doses of 50, 100, 150 or 200 mg of methylone, 100 mg of MDMA or a placebo (dextromaltose) in each session. For safety, higher doses were administered after lower doses showed good tolerability. Blood samples were collected in lithium heparin vacutainer tubes before and 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 24 h after dosing. Blood was immediately centrifuged at 3500 rpm for 10 min and the obtained plasma was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis (around 2–4 months after collection).

The 12 subjects were divided into 4 study groups with 3 drug administration sessions, each separated by a washout period of 5 to 7 days. MDMA capsules contained 100 mg of MDMA and the placebo capsules contained dextromaltose.

Methylone capsules contained 50 mg methylone to administer 50, 100, 150, or 200 mg of methylone. Participants received 5 capsules (containing active substance or placebo) each session so the participants and clinical staff were unaware of the dose. The clinical trial was approved by the local human research ethics committee (CEI-HUGTiP ref. PI-19-082) to investigate the potential for abuse and human pharmacology of methylone. The study was registered on ClinicalTrials.gov (number NCT05488171). It was conducted according to the Declaration of Helsinki recommendations and Spanish rules about clinical investigation. All the participants were informed, both orally and in writing, and signed informed consent prior to inclusion. Prior to study sessions, the participants underwent

general medical examination, including blood and urine chemistry tests. Measures of the pharmacological effects were collected (not presented in this manuscript).

4.4. Sample Preparation

Briefly, 10 μ L of the 100 ng/mL internal standard mixture (methylone-d₃, MDA-d₅ and MDMA-d₅) 2 μ L of 2% NH₃ in H₂O (pH 9), and 2 mL chloroform: ethyl acetate 9:1 (*v/v*) were added to 100 μ L of plasma and the tubes were stirred using a roller mixer for 10 min and centrifuged at 3500 rpm for 5 min. Supernatants were placed into clean tubes, 100 μ L of acidic methanol (1% HCl) was added to prevent evaporative losses, and the samples were dried under nitrogen for approximately 30 min. Samples were reconstituted in 100 μ L of mobile phase A:B (95:5) (0.1% formic acid in water:acetonitrile) and transferred into autosampler vials, prior to injection of 1 μ L onto the chromatographic system.

4.5. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) Analysis

Analyte separation was achieved on an HPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies Italia S.p.a., Milan, Italy) coupled to a mass spectrometer (6470A Triple Quadrupole LC-MS), equipped with an electrospray ionization source (ESI) operating in the positive mode. Data were acquired with MassHunter® Workstation Quantitative Analysis 10.0 Software (Agilent). The optimization process was conducted automatically with the “MassHunter Optimizer” tool provided by Agilent and manually confirmed. Specifically, the “MassHunter Optimizer” automates the selection of the best precursor ions, the optimization of the fragmentor voltage for each precursor ion, the selection of the best product ions, and optimization of collision energy values for each compound transition. Data were acquired with MassHunter® Workstation Quantitative Analysis 10.0 Software (Agilent).

Separation was performed on a Kinetics® 2.6 μ m Phenyl-Hexyl column from Phenomenex® (100 mm \times 2.1 mm). Run time was 6 min with a gradient mobile phase composed of 0.1% formic acid in water (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.4 mL/min. The initial conditions were 5% B, held for 1 min, increased gradually to 50% B within 2 min, increased to 95% B within 4.0 min, decreased to 5% B and held for 6 min. The autosampler and column oven temperatures were 10 °C and 37 °C, respectively.

The mass spectrometer operated in the scheduled multiple reaction monitoring (MRM) mode, with two transitions for each analyte and ISTD (Table 3).

MS parameter settings were optimized by infusing neat standards (100 ng/mL) individually in methanol and increasing the cone voltage and collision energy. Scan speed (dwell time) was 0.023 s. ESI conditions were optimized as follows: the capillary voltage was 3500 V, source temperature was 300 °C, cone gas flow rate was 10 L/min and desolvation gas flow rate was 12 L/min.

Table 3. Mass spectrometry parameters for analytes and internal standards with positive ionization.

Analytes	Molecular Mass g/mol	Precursor Ion <i>m/z</i>	Product Ion <i>m/z</i>	Retention Time Min	CE eV
MDMA	193.2	194.2	105.0	2.16	25
			163.0	2.16	9
MDMA-d ₅	198.2	199.2	107.1	2.15	29
			165.1	2.15	13
MDA	179.2	180.2	77.1	1.91	45
			105.1	1.91	25
MDA-d ₅	198.2	199.2	110.1	1.90	24
			168.1	1.90	8
HMMA	231.7	232.0	105.1	1.07	25

			165	1.07	8
HMA	181.0	182.0	105.1	0.87	24
			165.1	0.87	8
Methylone	207.2	208.2	132.1	1.79	29
			160.1	1.79	17
Methylone-d ₃	210.2	211.2	135.1	1.78	16
			163.1	1.78	16
HMMC	209.2	210.2	192.1	1.01	12
			160.1	1.01	16

Abbreviations: HMMC, 4-hydroxy-3methoxymethcathinone; MDMA, 3,4-methylenedioxyamphetaminophetamine; MDA, 3,4-methylenedioxyamphetamine; HMA, 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine; HMMA, 4-hydroxy-3methoxymethamphetamine; CE, collision energy. Quantification ions are in bold.

4.6. Method Validation

Analytical bias, imprecision, limit of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ), linearity, carryover, matrix effect (ME), recovery (RE), and dilution integrity were assessed during the method validation following recommendations from the Organization of Scientific Area Committees (OSAC) for Forensic Science, USA [13]. Preliminary experiments with eight calibrator concentrations revealed the most appropriate calibration model.

4.6.1. Linearity

Five calibration curves were established on five separate days with six calibrators from the lower (LLOQ) to the upper limit of quantification (ULOQ), which were calculated by linear least squares regression for each analyte and by performing a Mandel test [26]. Calibrators were required to quantify within $\pm 15\%$ of the target concentration ($\pm 20\%$ for LLOQ) and the coefficient of determination had to be higher than or equal to 0.99. Quantifying/confirming transition ratios were required to be within $\pm 20\%$ of the average calibrator transition ion ratio.

4.6.2. Limit of Detection and Quantification

LOD was tested by fortifying 5 different sources of blank plasma at the LLOQ and diluting the sources 2-, 5-, 10-, and 20-fold with blank plasma. For each analyte, the LOD was defined as the lowest concentration at which a peak eluted within ± 0.1 min of the average calibrator retention time, with a signal/noise ratio higher than or equal to 3 for both transitions and a quantifying/confirming transition ratio within $\pm 20\%$ of the average calibrator ratio.

LLOQ was tested by fortifying 5 different sources of blank plasma. For each analyte, the LLOQ retention time had to be within ± 0.1 min of the average calibrator retention time and quantify within $\pm 20\%$ of the target concentration. In addition, quantifying/confirming transition ratios were required to be within $\pm 20\%$ of the average calibrator ratio.

4.6.3. Carryover

Lack of carryover was verified in triplicate by injecting a blank plasma sample fortified with the analytes at 5 times the ULOQ, followed by a negative sample. Carryover was negligible if no peak eluted within ± 0.1 min of the average calibrator retention time, with a signal/noise ratio higher than 3 in the negative samples.

4.6.4. Interferences

Matrix interferences were evaluated with 5 different blank plasma samples. Interferences were negligible if no peak eluted within ± 0.1 min of the average calibrator retention

time with a signal/noise ratio higher than 3. Moreover, blank plasma samples were analyzed for possible exogenous drug interferences. For this, fortified matrix samples were spiked with other sympathomimetic amines (ephedrine and pseudoephedrine), and cathinones (4-dimethylmethcathinone hydrochloride (3,4-DMMC HCl), 4-methyl-alpha-pyrrolidinoexanophenone (3,4-MDPHP), 3-chloromethcathinone hydrochloride (3-CMC HCl), 3-fluoro-alpha-pyrrolidinopentiophenone (3-fluoro-alpha-PVP), 3-methylmethcathinone hydrochloride (3-MMC HCl), 4-bromomethcathinone hydrochloride (4-BMC HCl), 4-ethylethcathinone hydrochloride (4-EEC HCl), 4'-fluoro-alpha-pyrrolidinohexanophenone hydrochloride (3-fluoro-alpha-PVP HCl), 4-fluoromethcathinone metabolite hydrochloride (4-FMC metabolite HCl), 4-hydroxy-3-methoxy methcathinone (HMMC), 4-methylethcathinone metabolite hydrochloride (4-MEC metabolite HCl), benzedrone hydrochloride (4-MBC HCl), 3,4-methylenedioxy-N-ethylcathinone hydrochloride (ethylone HCl) and β -keto-1,3-benzodioxolyl-N-ethylbutanamine hydrochloride (futhylone HCl)) at 3 different concentrations (10, 50 and 100 ng/mL). A signal/noise ratio no greater than 3 at ± 0.1 min of the analytes' retention period (which ranged from 0.73 to 2.31 min) for the quantitative and qualitative ions was the requirement for acceptability.

4.6.5. Dilution Integrity

Dilution integrity was assessed in five replicates by fortifying blank plasma with analytes at 2 times the ULOQ. Samples were diluted two-, five-, ten- and twenty-fold in blank plasma before analysis and were required to quantify within $\pm 20\%$ of the target concentration with a quantifying/confirming transition ratio within $\pm 20\%$ of the average calibrator ratio.

4.6.6. Stability

Analyte stability was assessed in plasma at room temperature and at $+4$ °C for 24 h, in plasma following 3 freeze/thaw cycles (-20 °C), and in the LC reconstitution solvent 24 h after extraction and storage in the autosampler ($+10$ °C). Internal standards were added immediately before extraction. Stability was assessed in 4 replicates at QC1, QC2, and QC3 concentrations.

Room temperature samples and refrigerated samples were analyzed after 24 h. Processed sample stability was measured by extracting low- and high-QC samples ($n = 3$), combining reconstituted samples, dividing them into different autosampler vials, and immediately analyzing them using the instrument. Ratios of the peak area of the analyte to the internal standard were calculated and triplicates were averaged for each concentration to establish the time zero response. Vials with extracted samples remained on the autosampler (4 °C) and were re-injected at 24 h and the calculated ratios of the peak areas of the analyte to the internal standard were compared to time zero. Finally, mid-term stability was assessed by re-analyzing 3 replicates at QC1, QC2, and QC3 concentrations 1, 2 and 4 months after QC sample preparation and storage at -20 °C.

Analytes were considered stable if the observed concentrations were within $\pm 20\%$ of the target concentration with a quantifying/confirming transition ratio within $\pm 20\%$ of the average calibrator ratio of the target.

4.6.7. Matrix Effect and Recovery

Matrix effect and recovery were evaluated with blank plasma from 5 different sources fortified with the analytes at QC1, QC2, and QC3 concentrations. Three sample sets were prepared, with set A blank plasma fortified with the analytes before extraction, set B blank plasma extracted and fortified with the analytes immediately before evaporation, and set C neat standards in the LC reconstitution solvent. For each analyte, ion suppression or enhancement was calculated by dividing the mean LC-MS/MS peak area of set A by the mean analyte peak area of set B. Ion suppression or enhancement was calculated by dividing the mean LC-MS/MS peak area of set B by the mean analyte peak area of set C, minus

1. The samples were required to quantify within $\pm 20\%$ of the target concentration with a quantifying/confirming transition ratio within $\pm 20\%$ of the average calibrator ratio. Accuracy and imprecision were calculated for each matrix type at the QC concentrations. Acceptable criteria were $\pm 30\%$ of the target and 20% CV for accuracy and imprecision, respectively.

4.6.8. Data Analysis and Statistics

Data from pharmacokinetics experiments were analyzed and graphically displayed using GraphPad Prism 9 (version 9.4.0 (653)). Plasma pharmacokinetics data were further analyzed using WinNonlin to determine the non-compartmental pharmacokinetics constants.

5. Conclusions

We developed and validated the first analytical method for simultaneously quantifying methylone, MDMA and their principal metabolites (one metabolite for methylone and three for MDMA) in human plasma samples, starting with controlled administration at different doses. The extraction and analysis method was simple, fast and effective for the detection of all analytes of interest and was fully validated. Methylone plasma concentrations increased in a linear dose-related manner, in contrast to MDMA. The elimination half-life of methylone was 6–7 h.

Considering the results obtained, further studies are needed to better understand the pharmacokinetics of synthetic cathinones and to analyze all the metabolites from different compounds, including methylone metabolites, and the impact that these new drugs might have on human health. The analytical method developed in this study will certainly be useful for the analysis of future methylone cases.

Author Contributions: Conceptualization, M.F., S.P., M.A.H. and F.P.B.; methodology, A.F.L.F. and L.P.; validation, A.F.L.F., D.B., G.S., S.M. and M.A.H. investigation, L.P., A.F.L.F., E.P., C.P.-M., M.F., D.B., S.M., F.P.B., S.P. and M.A.H.; data curation, L.P., A.F.L.F., E.P., C.P.-M., M.F., D.B., S.M., F.P.B., S.P. and M.A.H.; writing—original draft preparation, A.F.L.F.; G.S.; L.P. and D.B., writing—review and editing, A.F.L.F., F.P.B., S.P., L.P., M.F. and M.A.H.; supervision, M.F., S.P., M.A.H. and F.P.B.; funding acquisition, M.F. and S.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This investigation was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Fondo de Investigación en Salud (FIS)-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), grant numbers PI17/01962 and PI20/00879; predoctoral PFIS fellowship grant number FI18/00179; Plataformas ISCIII de apoyo a la I + D + I en Biomedicina y Ciencias de la Salud grant number PT20/00018). It is also partially funded by the project “Implementation of the identification and study of the effects of NPS: Development of a multicenter research to enhance the database of the National drug Addiction Observatory and the Early Warning System” and by the project “National Early Warning System on Drugs” (SNAP)” following the Italian Department of Antidrug policies.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the local human research ethics committee CEI-HUGTiP (ref. PI-19-082).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors thank Andrea Faragalli for her statistical assistance and A. Bacosi, S. Di Carlo, L. Martucci, C. Fraioli and M. Sciotti for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. Preliminary results of this study have been presented by Dr. Lo Faro at TIAFT 2022 Congress in Versailles (FR) on 5–8 September, 2022.

References

1. Majchrzak, M.; Celiński, R.; Kuś, P.; Kowalska, T.; Sajewicz, M. The newest cathinone derivatives as designer drugs: An analytical and toxicological review. *Forensic Toxicol.* **2018**, *36*, 33–50.
2. Soares, J.; Costa, V.M.; Bastos, M.d.L.; Carvalho, F.; Capela, J.P. An updated review on synthetic cathinones. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95*, 2895–2940.
3. The Controlled Substances Act. Available online: <https://www.dea.gov/drug-information/csa> (accessed on 15 November 2022).
4. Cozzi, N.V.; Sievert, M.K.; Shulgin, A.T.; Jacob, P., III.; Ruoho, A.E. Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by *b*-ketoamphetamines. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *381*, 63–69.
5. Baumann, M.H.; Ayestas, M.A.; Partilla, J.S.; Sink, J.R.; Shulgin, A.T.; Daley, P.F.; Brandt, S.D.; Rothman, R.B.; Ruoho, A.; Cozzi, N.V. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37*, 1192–1203.
6. Eshleman, A.J.; Wolfrum, K.M.; Hatfield, M.G.; Johnson, R.A.; Murphy, K.V.; Janowsky, A. Substituted methcathinones differ in transporter and receptor interactions. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1803–1815.
7. Luethi, D.; Kolaczynska, K.E.; Walter, M.; Suzuki, M.; Rice, K.C.; Blough, B.E.; Hoener, M.C.; Baumann, M.H.; Liechti, M. Metabolites of the ring-substituted stimulants MDMA, methylone and MDPV differentially affect human monoaminergic systems. *J. Psychopharmacol.* **2019**, *337*, 831–841.
8. Poyatos, L.; Papaseit, E.; Olesti, E.; Pérez-Mañá, C.; Ventura, M.; Carbón, X.; Grifell, M.; Fonseca, F.; Torrens, M.; de la Torre, R.; et al. A comparison of acute pharmacological effects of methylone and mdma administration in humans and oral fluid concentrations as biomarkers of exposure. *Biology* **2021**, *10*, 788.
9. Barrios, L.; Grison-Hernando, H.; Boels, D.; Bouquie, R.; Monteil-Ganiere, C.; Clement, R. Death following ingestion of methylone. *Int. J. Legal. Med.* **2016**, *130*, 381–385.
10. Elmore, J.S.; Dillon-Carter, O.; Partilla, J.S.; Ellefsen, K.N.; Concheiro, M.; Suzuki, M.; Rice, K.C.; A Huestis, M.; Baumann, M.H. Pharmacokinetic Profiles and Pharmacodynamic Effects for Methylone and Its Metabolites in Rats. *Neuropsychopharmacology* **2017**, *42*, 649–660.
11. Centazzo, N.; Chojnacki, M.R.; Elmore, J.S.; Rodriguez, R.; Acosta, T.; Suzuki, M.; Rice, K.C.; Baumann, M.H.; Concheiro, M. Brain Concentrations of Methylone and Its Metabolites after Systemic Methylone Administration: Relationship to Pharmacodynamic Effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, *377*, 398–406.
12. de La Torre, R.; Farré, M.; Ortuñ, J.; Mas, M.; Brenneisen, R.; Roset, P.N.; Segura, J.; Camí, J. Non-linear pharmacokinetics of MDMA (ecstasy) in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2000**, *49*, 104–109.
13. Farré, M.; de La Torre, R.; Mathúna, B.Ó.; Roset, P.N.; Peiró, A.M.; Torrens, M.; et al. Repeated doses administration of MDMA in humans: Pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology* **2004**, *173*, 364–375.
14. Yang, K.M. Organization of Scientific Area Committees (OSAC) for Forensic Science Standard Practices for Method Development. Available online: <https://www.nist.gov/osac> (accessed on 15 November 2022).
15. Kolbrich, E.A.; Goodwin, R.S.; Gorelick, D.A.; Hayes, R.J.; Stein, E.A.; Huestis, M.A. Plasma Pharmacokinetics of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine after Controlled Oral Administration to Young Adults. *Ther. Drug Monit.* **2008**, *30*, 320–332.
16. Baumann, M.H.; Zolkowska, D.; Kim, I.; Scheidweiler, K.B.; Rothman, R.B.; Huestis, M.A. Effects of dose and route of administration on pharmacokinetics of (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine in the rat. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 2163–2170.
17. López-Arnau, R.; Martínez-Clemente, J.; Carbó, M.; Pubill, D.; Escubedo, E.; Camarasa, J. An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new drug of abuse, methylone, a synthetic cathinone sold as “bath salts”. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2013**, *45*, 64–72.
18. Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Mateus, J.A.; Pujadas, M.; Fonseca, F.; Torrens, M.; Olesti, E.; de la Torre, R.; Farré, M. Human Pharmacology of Mephedrone in Comparison with MDMA. *Neuropsychopharmacology* **2016**, *41*, 2704–2713.
19. Carbone, P.N.; Carbone, D.L.; Carstairs, S.D.; Luzi, S.A.; Sudden cardiac death associated with methylone use. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **2013**, *34*, 26–28.
20. Cawrse, B.M.; Levine, B.; Jufer, R.A.; Fowler, D.R.; Vorce, S.P.; Dickson, A.J.; Holler, J.M. Distribution of methylone in four postmortem cases. *J. Anal. Toxicol.* **2012**, *36*, 434–439.
21. Pearson, J.M.; Hargraves, T.L.; Hair, L.S.; Massucci, C.J.; Frazee, C.C.; Garg, U.; Pietak, B.R. Three fatal intoxications due to methylone. *J. Anal. Toxicol.* **2012**, *36*, 444–451.
22. 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. *Ther. Drug Monit.* **2004**, *26*, 137–144.
23. Schmid, Y.; Vizeli, P.; Hysek, C.M.; Prestin, K.; Meyer Zu Schwabedissen, H.E.; Liechti, M.E. CYP2D6 function moderates the pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylene-dioxymethamphetamine in a controlled study in healthy individuals. *Pharmacogenet. Genom.* **2016**, *26*, 397–401.
24. Vizeli, P.; Schmid, Y.; Prestin, K.; Meyer Zu Schwabedissen, H.E.; Liechti, M.E. Pharmacogenetics of ecstasy: CYP1A2, CYP2C19, and CYP2B6 polymorphisms moderate pharmacokinetics of MDMA in healthy subjects. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2017**, *27*, 232–238.
25. de la Torre, R.; Farré, M. Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): The limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 505–508.
26. Van Looco, J.; Elskens, M.; Croux, C.; Beernaert, H. Linearity of calibration curves: Use and misuse of the correlation coefficient. *Accredit. Qual. Assur.* **2002**, *7*, 281–285.

5.2 Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans.

Poyatos, L., Pérez-Mañá, C., Hladun, O., Núñez-Montero, M., de la Rosa, G., Martín, S., Barriocanal, A. M., Carabias, L., Kelmendi, B., Taoussi, O., Busardò, F. P., Fonseca, F., Torrens, M., Pichini, S., Farré, M., & Papaseit, E. (2023). Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans. *Frontiers in pharmacology*, *14* (February), 1122861. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1122861>



OPEN ACCESS

EDITED BY

Kabirullah Lutfy,
Western University of Health Sciences,
United States

REVIEWED BY

Frederick E. Williams,
University of Toledo, United States
Michael H. Baumann,
National Institute on Drug Abuse (NIH),
United States

*CORRESPONDENCE

Clara Pérez-Mañá,
✉ cperezmn.mn.ics@gencat.cat
Magí Farré,
✉ mfarre.germanstrias@gencat.cat

†These authors share the last authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

RECEIVED 13 December 2022

ACCEPTED 06 February 2023

PUBLISHED 17 February 2023

CITATION

Poyatos L, Pérez-Mañá C, Hladun O,
Núñez-Montero M, de la Rosa G, Martín S,
Barriocanal AM, Carabias L, Kelmendi B,
Taoussi O, Busardò FP, Fonseca F,
Torrens M, Pichini S, Farré M and
Papaseit E (2023), Pharmacological
effects of methylone and MDMA
in humans.
Front. Pharmacol. 14:1122861.
doi: 10.3389/fphar.2023.1122861

COPYRIGHT

© 2023 Poyatos, Pérez-Mañá, Hladun,
Núñez-Montero, de la Rosa, Martín,
Barriocanal, Carabias, Kelmendi, Taoussi,
Busardò, Fonseca, Torrens, Pichini, Farré
and Papaseit. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s)
and the copyright owner(s) are credited
and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans

Lourdes Poyatos^{1,2}, Clara Pérez-Mañá^{1,2*}, Olga Hladun^{1,2},
Melani Núñez-Montero^{1,2}, Georgina de la Rosa^{1,2}, Soraya Martín¹,
Ana Maria Barriocanal¹, Lydia Carabias³, Benjamin Kelmendi⁴,
Omayema Taoussi⁵, Francesco Paolo Busardò⁵,
Francina Fonseca^{6,7}, Marta Torrens^{7,8}, Simona Pichini⁹,
Magí Farré^{1,2*†} and Esther Papaseit^{1,2†}

¹Department of Clinical Pharmacology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (HUGTIP-IGTP), Badalona, Spain, ²Department of Pharmacology, Therapeutics and Toxicology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Cerdanyola del Vallés, Spain, ³Department of Pharmacy, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP), Badalona, Spain, ⁴Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, United States, ⁵Department of Excellence-Biomedical Sciences and Public Health, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy, ⁶Department of Medicine and Life Sciences (MELIS), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain, ⁷Addiction Program, Institut de Neuropsiquiatria i Adiccions (INAD), Barcelona, Spain, ⁸Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Cerdanyola del Vallés, Spain, ⁹National Centre on Addiction and Doping, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Methylone is one of the most common synthetic cathinones popularized as a substitute for 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, midomafetamine) owing to its similar effects among users. Both psychostimulants exhibit similar chemistry (i.e., methylone is a β -keto analog of MDMA) and mechanisms of action. Currently, the pharmacology of methylone remains scarcely explored in humans. Herein, we aimed to evaluate the acute pharmacological effects of methylone and its abuse potential in humans when compared with that of MDMA following oral administration under controlled conditions. Seventeen participants of both sexes (14 males, 3 females) with a previous history of psychostimulant use completed a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. Participants received a single oral dose of 200 mg of methylone, 100 mg of MDMA, and a placebo. The variables included physiological effects (blood pressure, heart rate, oral temperature, pupil diameter), subjective effects using visual analog scales (VAS), the short form of the Addiction Research Center Inventory (ARCI), the Evaluation of Subjective Effects of Substances with Abuse Potential questionnaire (VESSPA-SSE), and the Sensitivity to Drug Reinforcement Questionnaire (SDRQ), and psychomotor performance (Maddox wing, psychomotor vigilance task). We observed that methylone could significantly increase blood pressure and heart rate and induce pleasurable effects, such as stimulation, euphoria, wellbeing, enhanced empathy, and altered perception. Methylone exhibited an effect profile similar to MDMA, with a faster overall onset and earlier disappearance of subjective effects. These results suggest that abuse potential of methylone is comparable to that of MDMA in humans.

Clinical Trial Registration: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05488171>;
Identifier: NCT05488171.

KEYWORDS

methylone, 3,4-methylenedioxy-methylcathinone, MDMA, 3,4-methylenedioxy-methylamphetamine, new psychoactive substances, synthetic cathinones, bath salts, psychostimulants

1 Introduction

Methylone (3,4-methylenedioxy-*N*-methylcathinone), also known as MDMC, β k-MDMA, or M1, is a synthetic cathinone that emerged in 2004 as a new psychoactive substance (NPS), although first synthesized in 1996 and planned for therapeutic use as an antidepressant and potential treatment for the Parkinson's disease (Bossong et al., 2005). NPSs appear in the market as legal alternatives to common drugs of abuse, benefiting from their status as non-controlled substances by the International Drug Control Conventions. Users can acquire these substances *via* the Internet, advertised as bath salts, plant fertilizers, or incense. Methylone has been popularized as an alternative to MDMA (3,4-methylenedioxy-methylamphetamine, midomafetamine), which is chemically similar, given that methylone is considered its β -keto analog, differing only by an oxygen atom added at the benzylic position (Bossong et al., 2005).

Similar to MDMA, methylone is a substrate for the high-affinity monoamine transporters—i.e., the dopamine transporter (DAT), norepinephrine transporter (NET), and serotonin (5-HT) transporter (SERT) (Simmler et al., 2011; Sogawa et al., 2011; Baumann et al., 2012; Eshleman et al., 2013; Simmler et al., 2013; Elmore et al., 2017; Luethi et al., 2019). *In vitro* studies from rat brain tissue demonstrate that methylone has a similar mechanism of action as MDMA but is less potent at all three transporters (Baumann et al., 2012). Like other transporter substrates, methylone evokes the release of intraneuronal monoamine neurotransmitters by reversing the normal direction of transporter flux, thereby increasing extracellular concentrations of dopamine, norepinephrine, and 5-HT in the brain (Schindler et al., 2016; Elmore et al., 2017). Heightened levels of serotonin and dopamine potentially contribute to the rewarding properties of methylone (Schindler et al., 2016; Elmore et al., 2017).

Although the popularity of methylone peaked from 2011 to 2015, according to seizure reports (NFLIS, 2016), it remains one of the most commonly used synthetic cathinones, along with mephedrone. In some recent studies, methylone has been detected along with other illicit drugs in different matrixes such as oral fluid (Axelsson et al., 2022), wastewater (Brett et al., 2022) (Australian Criminal Intelligence Commission, 2020), urine (Gomila et al., 2022), hair (Palamar et al., 2016; Palamar et al., 2017; Salomone et al., 2017), and nails (Busardò et al., 2020). These data suggest that the pattern of methylone consumption mainly focuses on weekend and nightlife scenarios.

Methylone is typically administered orally as tablets or pills and less frequently *via* intranasal (insufflation), sublingual, intravenous, and rectal routes. According to users, moderate oral doses of methylone range between 100 and 200 mg, with <100 mg considered a low dose and >200 mg a high dose. After a common dose of methylone, acute effects appear within 15–60 min and last 3–5 h, with maximum effects experienced 60–90 min post-ingestion (World Health Organization, 2014). According to the only published human study evaluating the acute effects of methylone in natural conditions, it has been reported that methylone mainly induces euphoria, stimulation, increased sociability,

and altered perception (Poyatos et al., 2021). Overall, methylone exhibits a prototypical psychostimulant and empathogenic MDMA profile.

Like other synthetic cathinones, recreational users often consume small doses after the initial large dose to induce prolonged effects; this pattern of use increases the risk of intoxication or overdose (Liakoni et al., 2017; Gomila et al., 2022) and, in the worst case scenario, death (Boulanger-Gobeil et al., 2012; Cawrse et al., 2012; Pearson et al., 2012; Warrick et al., 2012; Carbone et al., 2013; McIntyre et al., 2013; Barrios et al., 2016; Shimomura et al., 2016; deRoux and Dunn, 2017). Common adverse effects associated with intoxication include anxiety, agitation, palpitations, sweating, tremors, seizures, hyperthermia, and vomiting (Karila et al., 2016; Liakoni et al., 2017).

As previously mentioned, methylone was first designed as a potential treatment for depression and Parkinson's disease. Recently, this therapeutic approach has resurfaced as a proposal to use methylone to treat post-traumatic stress disorder (PTSD), anxiety, and depression (Warner-Schmidt et al., 2023). In an observational study, methylone exhibited promising results, improving the condition of almost all patients with PTSD (Kelmendi et al., 2022). Methylone could follow the path of MDMA, which has demonstrated its efficacy and safety as a potential treatment in combination with psychotherapy for severe PTSD, anxiety, and related psychiatric disorders (Jerome et al., 2020; Wolfson et al., 2020; Mitchell et al., 2021). To exploit the potential of methylone as a therapeutic tool, it is essential to comprehensively clarify its underlying human pharmacology.

To date, the abuse potential of methylone has mainly been explored in self-administration studies in animal models (Watterson et al., 2012; Creehan et al., 2015; Vandewater et al., 2015; Nguyen et al., 2017; Javadi-Paydar et al., 2018), demonstrating reinforcing properties, less potent than those of other synthetic cathinones, such as mephedrone, MDPV (3,4-methylenedioxy-pyrovalerone), and α -PVP (α -pyrrolidinopentiophenone) (Schindler et al., 2016; Javadi-Paydar et al., 2018). Nevertheless, data regarding its abuse potential in humans remain scarce, and most available data on the human pharmacology of methylone mainly comprises user reports and the above-mentioned observational study (Poyatos et al., 2021). To date, no controlled studies have explored these effects in humans.

In the present study, we aimed to evaluate the abuse potential and acute pharmacological effects of methylone compared with those of MDMA and placebo after oral administration under controlled conditions.

2 Methods

2.1 Participants

Eighteen healthy participants (15 males, 3 females) were recruited by word of mouth, but only 17 (14 males, 3 females) completed the study (see 3.1 Participants). Before enrollment, participants underwent a medical examination, including an electrocardiogram (ECG) and blood and urine tests. In addition, the participants received training

regarding procedures, questionnaires, and psychomotor tests to be used during the experimental sessions. All subjects reported previous recreational drug use, such as methylone or other synthetic cathinones, amphetamines, and/or MDMA, at least twice in the last year and six times in their lifetime. Subjects were excluded if they had a current or recent (3 months prior to inclusion) organic illness or major surgery or a history of mental disorders, including substance use disorder (except for nicotine), according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5.

2.2 Study design

This study was designed as a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial to compare the pharmacological effects of methylone with those of MDMA and a placebo. The subjects participated in three experimental sessions, separated by a 1-week wash-out period. In each session, participants received either one of the following three oral medications: 200 mg methylone, 100 mg MDMA, and a placebo. The administered dose of methylone was selected after various dose-finding pilot studies evaluating doses of 50 (n = 3), 100 (n = 6), 150 (n = 5), and 200 mg (n = 7, four subjects received two different doses of methylone and placebo; three subjects received methylone, MDMA and placebo and were included in the definitive study). Methylone and MDMA were evaluated and proved to be well-tolerated (Poyatos et al., 2022a). After the pilot studies, we selected the 200 mg dose of methylone that evoked similar subjective effects to the 100 mg dose of MDMA (e.g., high or liking feelings), which is considered a common dose used in previous pharmacological studies. The subjects received compensation for possible inconveniences owing to their participation. Ethical approval was obtained from the local Human Research Ethics Committee (CEI Hospital Germans Trias i Pujol, code PI-19-082). This study was conducted in compliance with Spanish legislation regarding clinical research and the Declaration of Helsinki. This study has been registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05488171) (NCT05488171).

2.3 Drugs

Methylone hydrochloride and MDMA hydrochloride were acquired from the LGC Standards (Teddington, United Kingdom). The Pharmacy Department of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol was responsible for manufacturing and dispensing identical, white, and opaque soft gelatin capsules of methylone, MDMA, or placebo (maltodextrin). The methylone capsules contained 50 mg of methylone, and MDMA capsules contained 100 mg of MDMA. During each session, participants received five capsules, combining capsules with active substances and a placebo to reach the methylone or MDMA dose.

2.4 Procedures

One day prior to any experimental session, participants were tested for coronavirus disease 2019 (COVID-19) by performing a PCR test. Participants arrived at the Clinical Research Unit (UPIC)

at 7:45 a.m. on the day of the session after fasting overnight and remained at the facility for approximately 11 h. Upon arrival, participants provided a urine sample to perform a drug urine test (Drug-Screen Multi 10TD Test [Multi-Line], Nal Von Minden, Germany) to detect the presence of drugs of abuse (amphetamine, barbiturate, benzodiazepine, cocaine, MDMA, methamphetamine, morphine, methadone, tricyclic antidepressants, and tetrahydrocannabinol). Participants were requested to abstain from pre-session use of illicit drugs (1 week), alcohol (48 h), and caffeine or xanthines (24 h) (Papaseit et al., 2016; Poyatos et al., 2021).

To establish levels of methylone, MDMA and their metabolites, blood and oral fluid samples were collected at baseline and 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 24 h after administration. Urine samples were collected at various time points throughout the session until 24 h (0–4 h, 4–8 h, 8–12 h, 12–24 h). Data on methylone and MDMA concentrations from this study are not presented, although the pharmacokinetics of methylone at doses ranging from 50 to 200 mg from pilot studies have been published (see study design) (Poyatos et al., 2022a).

2.5 Physiological effects

Non-invasive systolic and diastolic blood pressure, heart rate, and oral temperature were repeatedly recorded at baseline (–30 and –15 min) and 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 24 h after administration using a vital signs monitor (Philips Sure Signs VM4 monitors, Phillips, Amsterdam, Netherlands). Pupil diameter was measured using a Haab pupil gauge as a reference under constant light conditions. Electrocardiogram was continuously monitored during the sessions for safety reasons.

2.6 Subjective effects

Subjective effects were assessed using visual analog scales (VAS), the short form of the Addiction Research Center Inventory (ARCI), the Evaluation of Subjective Effects of Substances with Abuse Potential questionnaire (VESSPA-SSE), the Sensitivity to Drug Reinforcement Questionnaire (SDRQ), and a pharmacological identification class questionnaire.

VAS allowed participants to rate several adjectives from “not at all” (0 mm) to “extremely” (100 mm) according to their sensations. This instrument contained 31 items, including intensity (any effect), stimulated, high, good effects, bad effects, liking, changes in distances, changes in colors, changes in shapes, changes in lights, hallucinations (seeing lights or spots), hallucinations (seeing things, animals, insects, or people), changes in hearing, hallucinations (hearing sounds or voices), drowsiness, concentration, dizziness, confusion, different or changed body feeling, unreal body feeling, different surroundings, unreal surroundings, open, trust, feeling close to others, I want to be with other people, I want to hug someone, sexual desire, and sexual arousal (Papaseit et al., 2016; Kuypers et al., 2018; Poyatos et al., 2021).

The ARCI 49-item short form is a validated inventory developed to evaluate the subjective effects of various substances, following five subscales: pentobarbital-chlorpromazine-alcohol group (PCAG)

measures sedation, morphine-benzedrine group (MBG) measures euphoria, lysergic acid diethylamide (LSD) measures dysphoria and somatic symptoms, benzedrine (BG) measures intellectual efficiency and energy, and amphetamine (A) measures amphetamine-like effects (Lamas et al., 1994; Papaseit et al., 2016; Poyatos et al., 2021).

The standardized VESSPA-SSE questionnaire was used to evaluate the subjective effects of stimulant drugs, such as MDMA. This questionnaire is divided into six subscales that assess sedation (S), psychosomatic anxiety (ANX), changes in perception (CP), pleasure and sociability (SOC), activity and energy (ACT), and psychotic symptoms (PS) (Poudevida et al., 2003; Papaseit et al., 2016; Poyatos et al., 2021).

In addition, participants completed the SDRQ (Kuypers et al., 2018), rating “How pleasant was the substance” (drug liking) and “How much you wanted to use it in that moment” (drug wanting) on a scale of 1–5.

In the pharmacological identification class questionnaire, participants were required to select which pharmacological class better described the administered substance. The options included placebo, benzodiazepines (such as diazepam), alcohol, stimulants (such as amphetamine), designer drugs (such as ecstasy), cocaine, hallucinogens (such as LSD), cannabinoids (such as cannabis), ketamine (special K), GHB (gamma-hydroxybutyric acid; liquid ecstasy), and others (Papaseit et al., 2016).

VAS (except sexual desire and sexual arousal) were performed at baseline and 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 24 h, but scales regarding intensity (any effect), stimulated, high, good effects, bad effects, and liking were also performed at 2.5 h. SDRQ and VAS regarding sexual desire and arousal were performed at baseline and 1 and 10 h. ARCI and VESSPA-SSE were performed at baseline and 1, 2, 3, 4, 6, 8, and 10 h. The pharmacological class identification questionnaire was performed at 8 h. Subjects were evaluated for psychiatric symptoms using the Young Mania Rating Scale at baseline, 0.5, 1, 4, 6, and 24 h after administration.

2.7 Psychomotor performance

Psychomotor performance was evaluated using a specific computerized psychomotor vigilance task (PVT) and a Maddox wing device. The PVT test was performed using software (PC-PVT 2.0) that quantifies the simple reaction time to a numeric stimulus (Reifman et al., 2018). The Maddox wing measures heterophoria due to extraocular muscle imbalance and quantifies exophoria as an indicator of extraocular musculature relaxation and esophoria; this has been previously reported in other studies evaluating the pharmacological effects of psychostimulants (Papaseit et al., 2016). The PVT test was conducted at baseline and 1 and 2 h, while Maddox wing assessments were performed at baseline and 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 24 h.

2.8 Statistical analysis

The sample size was calculated following the methodology of bioequivalence studies considering an alpha risk of 0.05, a power of 80%, and a variability of 30% with a difference of at least 40% between methylone or MDMA and placebo in systolic and diastolic

blood pressure. This method resulted in a sample size of at least 10 participants, which was increased to 17 to improve statistical power.

For statistical analysis, values of physiological and subjective effects and psychomotor performance were baseline-adjusted. The maximum effects from baseline (0 h) to 6 h (Emax) and the time needed to achieve maximum effects (Tmax) were determined, and the area under the curve (AUC_{0–6h}) was calculated using the trapezoidal rule. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA), with treatment as a factor, assessed differences among the three groups considering Emax and AUC values. If significant differences were detected between treatments, *post hoc* Tukey’s multiple comparison test was performed. For Tmax values, differences were assessed using the non-parametric Friedman test. A Wilcoxon signed-rank test was performed for variables with significant differences in the previous test, with the *p*-value for multiple comparisons adjusted using the Bonferroni test.

The time course (0–10 h) of effects was compared using a two-way repeated measures ANOVA with time and treatment as factors. When significant differences between treatments or in the treatment × time interaction were detected, a *post hoc* Tukey’s multiple comparison test was performed to assess differences between treatments at each time point.

Statistical tests were performed using PASW Statistics, version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, United States). A *p*-value <0.05 indicated a statistically significant difference.

3 Results

3.1 Participants

Considering the participants who completed the study, 17 subjects had a mean age of 23 years (range 21–25 years) and a mean weight of 70.8 kg (range 52.1–84.1 kg), presenting a mean body mass index of 23.2 kg/m² (range 17.6–31.3 kg/m²). The participants reported previous use of MDMA (100%), poppers (100%), cannabis (94%), mushrooms (71%), amphetamines (41%), cocaine (47%), LSD (18%), ketamine (18%), sedatives/hypnotics (18%), nitrous oxide (12%), opioids (6%), dimethyltryptamine (DMT) (6%), and cathinones (6%). All subjects tested negative on performing urine drug tests, conducted using urine samples collected prior to the study session.

One subject was excluded after completing two experimental sessions owing to undesirable effects, mainly anxiety and uneasiness, attributed to the treatment administered in the second session. Treatment unblinding was performed after excluding the subject, revealing that placebo and MDMA were administered during the first and second treatment sessions, respectively. Side effects that dissipated 1.5 h after appearance were attributed to MDMA, with no therapeutic intervention required to mitigate these effects.

Except for the one excluded subject, all participants completed their experimental sessions without reporting any serious adverse effects, including psychiatric symptoms, psychotic episodes, or hallucinations.

TABLE 1 Summary of results (n = 17; mean ± standard deviation; median, range) on physiological measures, subjective effects, and psychomotor performance with statistically significant differences between the three administered conditions (methylone 200 mg, MDMA 100 mg and placebo).

		Methylone	MDMA	Placebo	ANOVA		Tukey/Wilcoxon
					F/X ²	p	
Physiological effects							
Systolic blood pressure	Emax (mmHg)	37.35 ± 10.47	31.88 ± 15.28	-8.97 ± 7.64	89.589	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-1.5)	1 (0.5-1.5)	4 (0.5-6)	17.844	<0.001	B,C
Diastolic blood pressure	Emax (mmHg)	12.29 ± 14.31	13.26 ± 13.02	0.47 ± 10.02	5.375	0.010	b,c
	Tmax (h)	1 (0.5-6)	1 (0.75-6)	1 (0.25-6)	0.677	0.713	NS
Heart rate	Emax (bpm)	29.38 ± 18.16	21.53 ± 22.17	0.97 ± 12.54	13.778	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-3)	1 (0.25-6)	3 (0.25-6)	8.848	0.012	B
Pupil diameter	Emax (mm)	2.50 ± 0.66	3.10 ± 1.05	-0.15 ± 0.34	95.149	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-1)	1 (0.5-2)	0 (0-4)	14.323	0.001	A
Visual Analog Scales (VAS)							
Intensity	Emax (mm)	45.41 ± 23.56	52.76 ± 30.07	1.12 ± 3.66	30.439	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	24.862	<0.001	a,B,C
Stimulated	Emax (mm)	48.65 ± 25.47	50.94 ± 32.87	1.29 ± 3.93	25.805	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	25.000	<0.001	a,B,C
High	Emax (mm)	54.65 ± 29.74	58.71 ± 29.78	1.06 ± 4.12	38.121	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	27.692	<0.001	a,B,C
Good effects	Emax (mm)	54.35 ± 30.00	57.53 ± 31.01	1.12 ± 4.36	34.635	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	26.226	<0.001	a,B,C
Bad effects	Emax (mm)	3.82 ± 7.61	11.06 ± 21.72	0	4.204	0.024	c
	Tmax (h)	0 (0-1.5)	0 (0-2)	0 (0-0)	9.920	0.007	NS
Liking	Emax (mm)	57.59 ± 31.38	57.18 ± 33.72	1.88 ± 7.51	30.962	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0.5-1)	1 (0-2.5)	0 (0-1)	25.803	<0.001	a,B,C
Changes in distances	Emax (mm)	7.29 ± 13.81	24.35 ± 34.45	0	5.515	0.009	C
	Tmax (h)	0 (0-1)	1 (0-6)	0 (0-0)	12.050	0.002	c
Changes in lights	Emax (mm)	11.06 ± 18.28	18.41 ± 25.25	0.53 ± 2.18	4.869	0.014	c
	Tmax (h)	0 (0-1)	0 (0-1.5)	0 (0-1.5)	8.486	0.014	NS
Focused	Emax (mm)	19.65 ± 18.05	15.06 ± 17.18	1.24 ± 5.09	8.500	0.001	B,c
	Tmax (h)	0.75 (0-1.5)	1 (0-4)	0 (0-1)	15.709	<0.001	B,c
Dizziness	Emax (mm)	10.12 ± 12.36	26.71 ± 26.23	0	11.580	<0.001	a,C
	Tmax (h)	0.5 (0-1.5)	0.75 (0-2)	0 (0-0)	16.128	<0.001	B,C
Confusion	Emax (mm)	10.71 ± 21.58	17.29 ± 22.83	0	6.165	0.005	C
	Tmax (h)	0 (0-1)	0.5 (0-2)	0 (0-0)	13.818	0.001	c
Different body feeling	Emax (mm)	32.65 ± 29.47	34.35 ± 34.15	1.18 ± 4.60	10.725	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0-1.5)	1 (0-2)	0 (0-1)	14.913	0.001	B,c
Different surroundings	Emax (mm)	10.35 ± 16.93	16.71 ± 26.37	0	4.311	0.022	c
	Tmax (h)	0 (0-1)	0 (0-1.5)	0 (0-0)	10.294	0.006	b,c

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued) Summary of results (n = 17; mean ± standard deviation; median, range) on physiological measures, subjective effects, and psychomotor performance with statistically significant differences between the three administered conditions (methylone 200 mg, MDMA 100 mg and placebo).

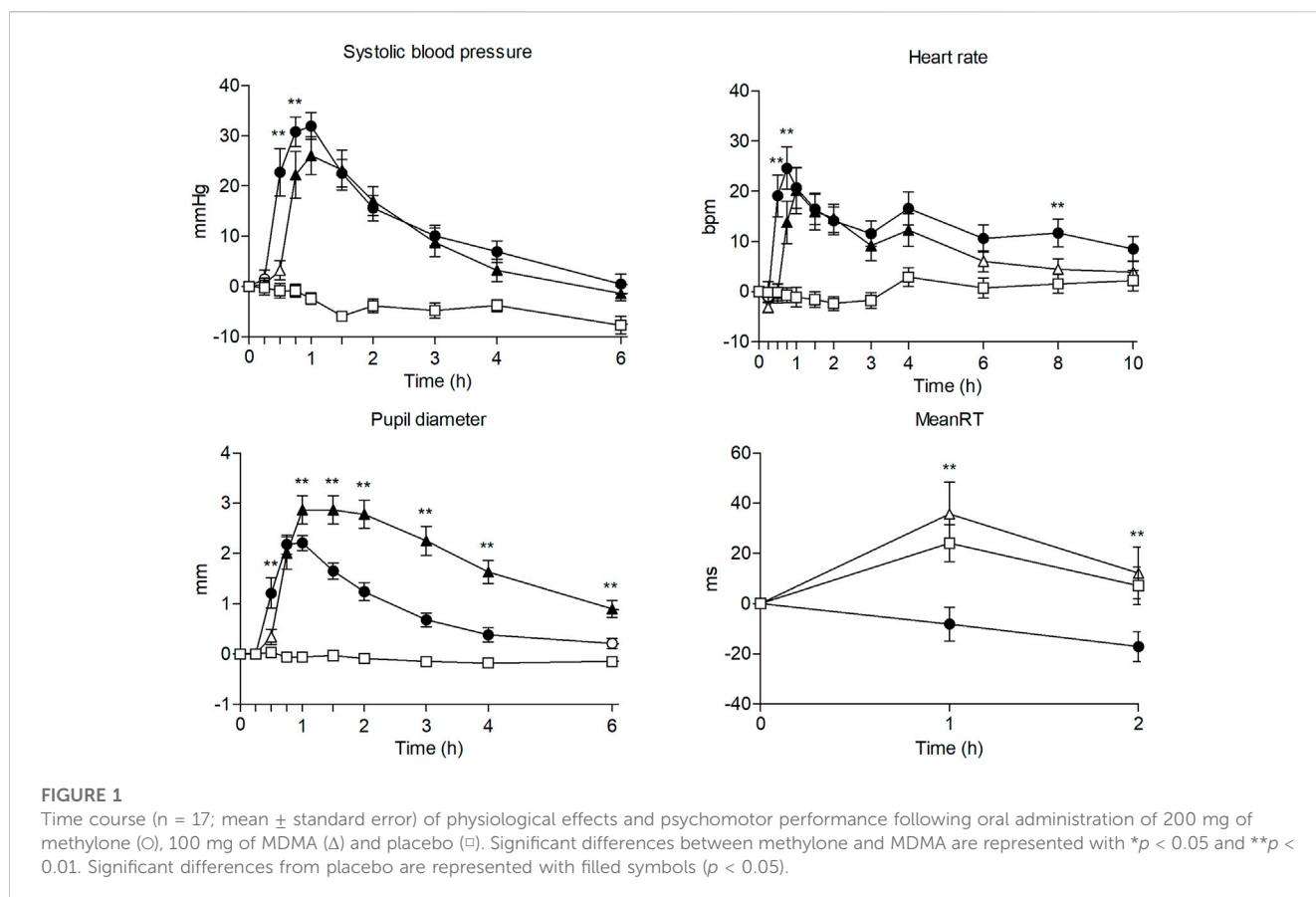
		Methylone	MDMA	Placebo	ANOVA		Tukey/Wilcoxon
					F/X ²	p	
Open	Emax (mm)	44.82 ± 36.34	38.71 ± 31.45	1.53 ± 6.31	16.175	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0–1.5)	1.5 (0–2)	0 (0–1)	21.541	<0.001	B,C
Trust	Emax (mm)	43.71 ± 35.51	37.59 ± 31.27	1.53 ± 6.31	15.340	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0–1)	1 (0–3)	0 (0–1)	22.836	<0.001	a,B,C
Feeling close to others	Emax (mm)	41.06 ± 35.88	35.53 ± 32.48	1.53 ± 6.31	13.123	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0–1.5)	1 (0–3)	0 (0–1)	21.849	<0.001	a,B,C
I want to be with other people	Emax (mm)	46.41 ± 38.37	46.00 ± 35.10	1.53 ± 6.31	18.333	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0–1.5)	1 (0–2)	0 (0–1)	21.055	<0.001	B,C
I want to hug someone	Emax (mm)	34.71 ± 38.89	38.41 ± 35.05	1.06 ± 4.37	12.162	<0.001	B,C
	Tmax (h)	0.75 (0–1.5)	1 (0–2)	0 (0–1)	15.647	<0.001	B,C
Sensitivity to Drug Reinforcement Questionnaire (SDRQ)							
How pleasant was the substance	Emax (score)	2.53 ± 1.37	2.29 ± 1.45	0.24 ± 0.75	22.501	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (0–1)	1 (0–1)	0 (0–1)	22.933	<0.001	B,C
How much you wanted to use it in that moment	Emax (score)	2.29 ± 1.36	1.71 ± 1.57	0.18 ± 0.73	15.221	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (0–1)	1 (0–1)	0 (0–1)	21.875	<0.001	B,c
Addiction Research Center Inventory (ARCI)							
ARCI PCAG	Emax (score)	0.47 ± 4.11	3.35 ± 3.28	0.12 ± 0.99	9.797	<0.001	A,C
	Tmax (h)	1 (1–4)	2 (0–4)	0 (0–1)	21.390	<0.001	B,C
ARCI MBG	Emax (score)	7.76 ± 4.93	7.29 ± 5.03	0.47 ± 1.70	21.788	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (0–1)	1 (0–3)	0 (0–1)	24.875	<0.001	B,C
ARCI LSD	Emax (score)	1.88 ± 2.29	2.18 ± 2.16	-0.35 ± 0.61	11.837	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (0–2)	1 (0–2)	0 (0–1)	19.395	<0.001	B,C
ARCI BG	Emax (score)	2.71 ± 2.42	1.06 ± 2.77	0.53 ± 1.28	7.042	0.003	a,B
	Tmax (h)	1 (1–3)	1 (0–4)	0 (0–1)	23.216	<0.001	B,C
ARCI A	Emax (score)	4.24 ± 2.25	4.18 ± 2.72	0.47 ± 1.07	22.899	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (1–1)	1 (0–2)	0 (0–1)	21.814	<0.001	B,C
Subjective Effects of Substances with Abuse Potential (VESSPA-SSE)							
VESSPA S	Emax (score)	0.52 ± 0.62	1.03 ± 0.98	0.08 ± 0.17	9.987	<0.001	C
	Tmax (h)	1 (0–6)	1 (0–3)	0 (0–4)	7.538	0.023	NS
VESSPA ANX	Emax (score)	1.66 ± 0.96	1.59 ± 0.98	0.13 ± 0.39	28.771	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (1–3)	1 (0–3)	0 (0–3)	18.429	<0.001	b,C
VESSPA CP	Emax (score)	0.07 ± 0.17	0.30 ± 0.45	0	5.785	0.007	a,C
	Tmax (h)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–0)	10.667	0.005	c
VESSPA SOC	Emax (score)	1.90 ± 1.64	1.81 ± 1.42	0.15 ± 0.53	13.473	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (0–1)	1 (0–3)	0 (0–1)	22.545	<0.001	B,C
VESSPA ACT	Emax (score)	1.82 ± 1.22	1.56 ± 1.35	0.10 ± 0.40	15.926	<0.001	B,C
	Tmax (h)	1 (0–2)	1 (0–3)	0 (0–1)	24.400	<0.001	B,C

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued) Summary of results (n = 17; mean ± standard deviation; median, range) on physiological measures, subjective effects, and psychomotor performance with statistically significant differences between the three administered conditions (methylone 200 mg, MDMA 100 mg and placebo).

		Methylone	MDMA	Placebo	ANOVA		Tukey/Wilcoxon
					F/X ²	p	
VESSPA PS	Emax (score)	0.28 ± 0.39	0.33 ± 0.48	0.03 ± 0.12	5.094	0.012	b,c
	Tmax (h)	1 (0–1)	1 (0–2)	0 (0–1)	13.550	0.001	B,c
Psychomotor performance							
Mean reaction time	Emax (ms)	-14.63 ± 31.09	36.40 ± 58.70	22.53 ± 39.48	6.818	0.003	A,b
	Tmax (h)	2 (1–2)	1 (1–2)	2 (1–2)	2.533	0.282	NS
Maddox wing	Emax (diopter)	-0.97 ± 1.91	-1.69 ± 2.05	0.13 ± 0.43	7.070	0.003	C
	Tmax (h)	0.75 (0–1.5)	1 (0–2)	0 (0–6)	9.088	0.011	a

Abbreviations: ARCI PCAG (sedation), MBG (euphoria), LSD (dysphoria), BG (intellectual efficiency), and A (amphetamine-like effects), VESSPA-SSE S (sedation), ANX (psychosomatic anxiety), CP (changes in perception), SOC (pleasure and sociability), ACT (activity and energy), and PS (psychotic symptoms), ms (milliseconds). Emax is maximum effects from baseline to 6 h, expressed as mean ± standard deviation. Tmax is the time needed to reach maximum effects, expressed as median (range). Differences among Emax were calculated with a one-way ANOVA (degrees of freedom 2 and 32 for all variables) and *post hoc* Tukey's multiple comparisons test. Differences among Tmax were calculated with Friedman's test and Wilcoxon signed rank test adjusted for multiple comparisons. Statistical differences in Emax between conditions are indicated as: "a" (p < 0.05) or "A" (p < 0.01) for methylone vs. MDMA, "b" (p < 0.05) or "B" (p < 0.01) for methylone vs. placebo, "c" (p < 0.05) or "C" (p < 0.01) for MDMA vs. placebo. Statistical differences in Tmax between conditions are indicated as: "a" (p < 0.016) or "A" (p < 0.003) for methylone vs. MDMA, "b" (p < 0.016) or "B" (p < 0.003) for methylone vs. placebo, "c" (p < 0.016) or "C" (p < 0.003) for MDMA vs. placebo.



3.2 Pharmacological effects

Table 1 summarizes the results (Emax and Tmax) of physiological effects, subjective effects, and psychomotor

performance for which the statistical analysis revealed significant differences between the three examined treatments. The results of AUC_{0–6h} and time-course with significant differences between conditions are presented in [Supplementary Table S1](#).

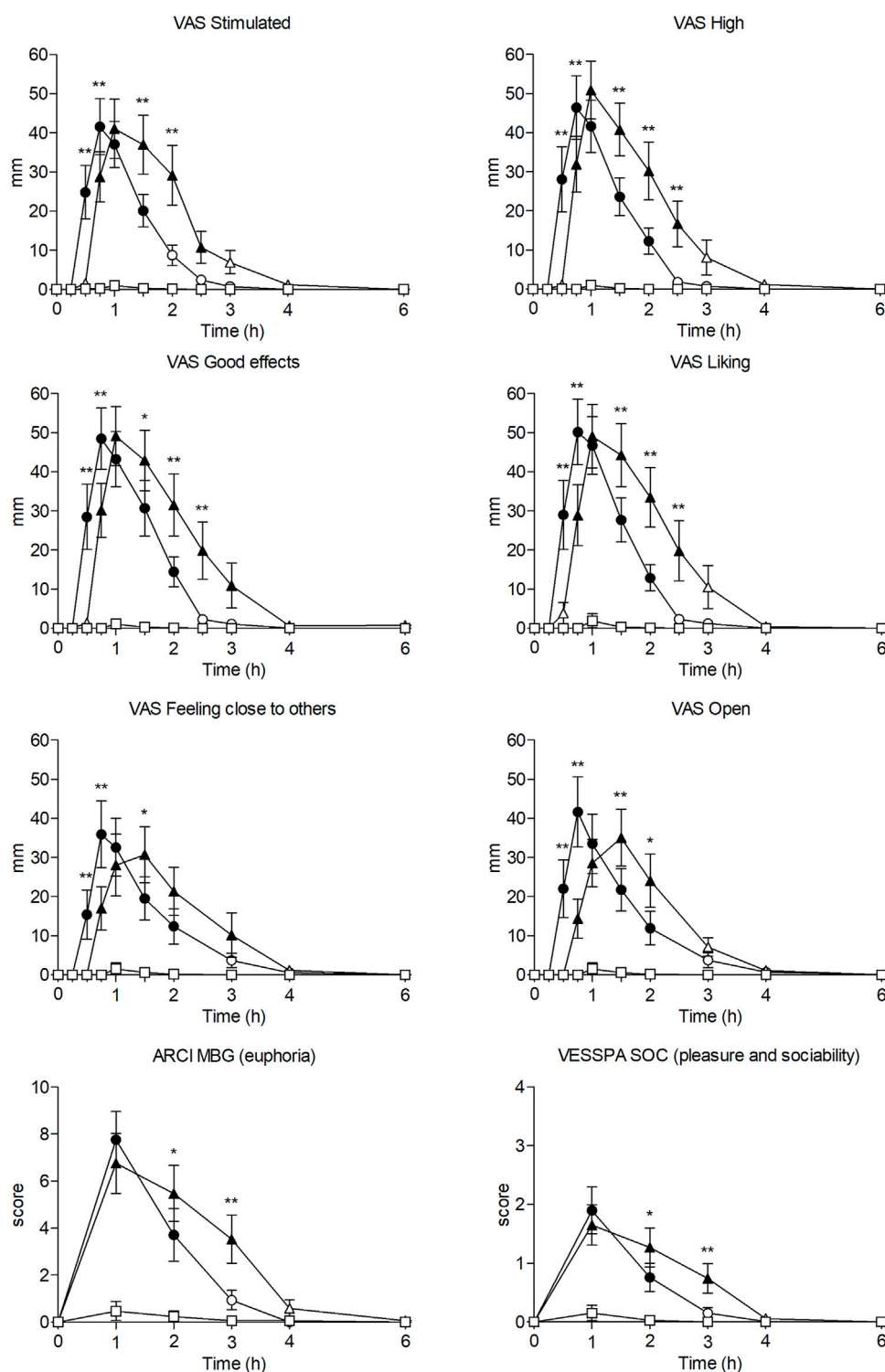


FIGURE 2
 Time course (n = 17; mean ± standard error) of subjective effects following oral administration of 200 mg of methylone (O), 100 mg of MDMA (Δ) and placebo (□). Significant differences between methylone and MDMA are represented with **p* < 0.05 and ***p* < 0.01. Significant differences from placebo are represented with filled symbols (*p* < 0.05).

3.2.1 Physiological effects

Compared with the placebo, 200 mg methylone and 100 mg MDMA could significantly increase systolic blood pressure, diastolic blood pressure, heart rate, and pupil diameter (see Table 1; Figure 1).

The maximum effects of methylone and MDMA on cardiovascular parameters and pupil diameter differed significantly from those of placebo; however, these differences were not observed between active treatments.

Regarding systolic blood pressure and heart rate, methylone administration afforded higher and earlier maximum effects than MDMA administration, although these differences were not statistically significant. However, we noted significant differences between methylone and MDMA considering certain time-course points of systolic blood pressure, heart rate, pupil diameter, AUC, and time to reach maximum effects (T_{max}) of pupil diameter, with methylone demonstrating lower AUC and earlier time to reach maximum effects than MDMA.

Methylone produced a sustained increase in heart rate, which differed significantly from placebo until 10 h post-administration, returning to baseline after 24 h. Changes in diastolic blood pressure were markedly similar between methylone and MDMA, considering maximum effects, time to achieve maximum effects, and differences in the time course of effects.

Except at one time-course point (2 h), there were no significant differences in any temperature parameter between active treatments.

3.2.2 Subjective effects

Compared with the placebo, methylone and MDMA induced significant changes in subjective effects measured using VAS and questionnaires (ARCI, VESSPA, and SDRQ) (Table 1; Figure 2).

The significant changes in VAS were mainly related to stimulation and wellbeing (VAS “stimulation”, “high”, “good effects”, “liking”), altered perception (“changes in distances”, “changes in lights”, “different body feeling”, “different surroundings”), and empathy (“open”, “trust”, “feeling close to others”, “I want to be with other people”, “I want to hug someone”). In general, methylone-induced subjective effects appeared at 0.5 h and normalized at 2.5–3 h post-administration. The subjective effects of MDMA appeared later (0.75 h), returning to baseline at 4 h.

Comparing both active substances, maximum effects and AUCs of most subjective effects measured with VAS did not differ significantly; however, participants who received MDMA reported significantly more ‘dizziness’. Notably, methylone-induced maximum effects appeared significantly earlier (T_{max} = 0.75 h), considering effects related to stimulation, wellbeing, and empathy, than those induced by MDMA (T_{max} = 1 h). Regarding the time course of effects, we noted significant differences within the first 2.5 h in several scales related to stimulation, wellbeing, altered perception, and empathy between both active treatments, with higher effects of methylone typically documented at earlier time points (0.5–0.75 h), whereas those of MDMA noted at later time points (2–2.5 h) (see Supplementary Table S1).

Methylone and MDMA demonstrated significant changes in all subscales of the ARCI questionnaire, especially MBG (euphoria) and A (amphetamine effects). Methylone generated higher maximum scores on the MBG, BG (intellectual efficiency), and A subscales, whereas MDMA generated higher scores for PCAG and LSD (dysphoria). However, only PCAG (sedation) and BG (intellectual efficiency) revealed significant differences in the maximum effects between both treatments. Comparing the time courses of methylone and MDMA, we noted significant differences at certain time points between 1 and 4 h for ARCI PCAG, MBG, BG, and A.

Compared with placebo, methylone and MDMA demonstrated significant differences in the VESSPA questionnaire in all subscales,

particularly in ANX (psychosomatic anxiety), SOC (pleasure and sociability), and ACT (activity and energy). Methylone produced higher maximum effects represented by the VESSPA ANX, SOC, and ACT, whereas MDMA produced higher effects sensitive to the VESSPA S (sedation), CP, and PS subscales. The VESSPA CP was the only subscale with significant differences in the maximum effects and AUC between active treatments. Comparing the time courses of methylone and MDMA, time points between 1 and 3 h differed significantly in VESSPA S, ANX, CP, and SOC.

Regarding SDRQ, methylone was higher rated in the “How pleasant was the substance” and “How much you wanted to use it in that moment” questions than MDMA and placebo, considering maximum effects and AUCs; however, differences among active substances were not statistically significant.

Considering the pharmacological class identification questionnaire, 16 (94.1%) participants identified methylone as a designer drug, similar to MDMA, whereas one (5.9%) participant identified it as a stimulant, similar to amphetamine. After receiving MDMA, 15 (88.2%) participants correctly identified their treatment as a designer drug (MDMA), whereas one (5.9%) subject classified it as a stimulant (amphetamine) and another (5.9%) as a placebo. The placebo was correctly identified by 16 (94.1%) participants, with only one subject classifying it as a stimulant (amphetamine).

3.2.3 Psychomotor performance

In the PVT test, methylone was the only treatment that significantly improved the reaction time by reducing the mean time needed to react to a numeric stimulus (see Table 1). Conversely, MDMA did not impact the reaction time when compared with the placebo. Considering the time course of effects, methylone could significantly decrease the reaction time when compared with MDMA and placebo at 1 and 2 h post-administration.

After methylone and MDMA administration, the participants experienced an inward deviation of the eyes (esophoria) in the Maddox wing device (see Table 1). Notably, MDMA produced higher, but statistically insignificant, levels of esophoria than methylone, considering their maximum effects and AUC. However, methylone administration could induce maximum effects significantly earlier than MDMA administration. During the time course of effects, significant differences were detected between the two active treatments at 2 and 3 h.

4 Discussion

To the best of our knowledge, this is the first experimental, controlled study to evaluate the acute pharmacological effects of methylone in humans. Our main finding was that oral doses of 200 mg methylone could induce notable cardiovascular and pleasurable effects, including stimulation, euphoria, wellbeing, increased empathy, and altered perception. Methylone exhibited an effect profile comparable to that of MDMA, with a faster onset and earlier disappearance of subjective effects than MDMA. Typically, the abuse potential of methylone follows the trend of other cathinones, such as natural cathinone and mephedrone (Poyatos et al., 2022b). MDMA exhibited effects similar to those previously reported in other published human studies (Camí et al.,

2000; Kirkpatrick et al., 2014; Papaseit et al., 2016; Kuypers et al., 2017; Holze et al., 2020; Studerus et al., 2021).

Our results corroborate those of an observational study in which the effects of methylone were evaluated under natural conditions (Poyatos et al., 2021). In the previous observational study, eight subjects self-administered an oral dose of methylone (100–300 mg, mean dose of 187 mg), which were self-selected according to their preferences and previous experiences. Under the same setting, six subjects were selected and self-administered oral MDMA (75–100 mg, mean dose of 87 mg). In that study, methylone exhibited a prototypical stimulant profile and empathogenic effects frequently attributed to social drugs, such as MDMA. Moreover, methylone was shown to induce a high and sustained increase in the heart rate, also observed under controlled conditions. Regarding subjective effects, methylone induced milder effects than MDMA in the earlier discussed naturalistic study. According to our present results, participants reported higher subjective effects after methylone administration than those documented in the previous study. This discrepancy could be attributed to the wider experience with psychostimulant use among volunteers in the naturalistic study or the distinct settings in which the studies were conducted. In addition, the maximum subjective effects of methylone appeared earlier under controlled conditions.

Furthermore, comparing our results with other synthetic cathinones, such as mephedrone, considered one of the most popular cathinones for recreational use, can be interesting. The human pharmacology of mephedrone was evaluated in a clinical trial including 12 subjects well-experienced in psychostimulant use, who received one oral dose of 200 mg mephedrone compared with 100 mg MDMA and placebo. Methylone and mephedrone appear to share similarities in their physiological effects, given that both could produce higher maximum effects on heart rate and a lower increase in pupil diameter than MDMA. Overall, both cathinones affected vital signs with an early onset and similar intensity. Like methylone, mephedrone exhibits an MDMA-like profile with desirable subjective effects, comprising stimulation, a sensation of wellbeing, altered perception, and increased sociability (Papaseit et al., 2016).

Moreover, the effects of methylone are consistent with the euphorogenic and stimulant effects of *khat*, a naturally occurring cathinone (Brenneisen et al., 1990; Widler et al., 1994).

Interestingly, methylone displayed characteristics that differed from those of MDMA. Unlike MDMA and mephedrone, methylone could induce a sustained and significant increase in heart rate when compared with the placebo, which persisted for 10 h despite the normalization of blood pressure. Moreover, methylone improved psychomotor performance by reducing reaction time. This improvement has also been documented with amphetamine administration (Silber et al., 2006), although there is no clear evidence for MDMA (Camí et al., 2000; Farré et al., 2004; Ramaekers and Kuypers, 2006; Kuypers et al., 2007). Combined with alcohol, mephedrone could reduce the reaction time when compared with that of alcohol alone by mitigating the sedative effects of alcohol. However, mephedrone alone produced markedly similar effects to the placebo on reaction time (De Sousa Fernandes Perna et al., 2016). However, the main difference between methylone and MDMA is the earlier onset and disappearance

of subjective effects induced by the former, a particularity that more closely resembles mephedrone (Papaseit et al., 2016).

Considering the data from the pilot studies, methylone displayed fast pharmacokinetics at oral doses ranging from 50 to 200 mg; specifically, 200 mg methylone achieved maximum plasma concentrations (C_{max}) of 604 ng/mL at 2 h (T_{max}), with an elimination half-life ($t_{1/2}$) of 6.4 h (Poyatos et al., 2022a). These results suggest that the kinetics of methylone are faster than those of MDMA (T_{max} of 2–2.5 h, $t_{1/2}$ of 7.7–12 h) (Desrosiers et al., 2013; Hysek et al., 2014; Papaseit et al., 2016) but less rapid than those of mephedrone (T_{max} of 1.25, $t_{1/2}$ of 2.15) (Papaseit et al., 2016). The maximum pharmacological effects of methylone appeared earlier than the maximum concentrations, but the short elimination half-life could explain the early dissipation of most subjective effects. This fact can also be observed in other studies evaluating human pharmacology of other cathinones such as mephedrone (Papaseit et al., 2016). In that study, mephedrone and MDMA produced earlier maximum effects compared to their T_{max} for blood concentration. Effects for mephedrone peaked at 0.75 h, while its concentrations peaked at 1.25 h. In case of MDMA, effects peaked at 0.75–1.25 h whereas maximum concentrations were achieved at 2 h. Our results, along with those from previous studies, confirm that pharmacological effects do not need maximum concentrations of the substance in blood to reach peak effects. Moreover, the concentrations of its metabolite 4-hydroxy-3-methoxy-N-methylcathinone (HMMC) were analyzed, revealing a plasma C_{max} of 42.1 ng/mL, T_{max} of 1.5 h, and $t_{1/2}$ of 6.3 h on administering 200 mg methylone. However, the psychoactive effects might not be attributed to HMMC concentrations despite its affinity for monoamine transporters (Elmore et al., 2017; Luethi et al., 2019), given the poor brain penetration capacity of hydroxylated metabolites (Centazzo et al., 2021). Data regarding the linearity of methylone remain controversial in animals, with evidence of non-linear behavior after subcutaneous administration in rats (Elmore et al., 2017) and linear pharmacokinetics after oral administration (López-Arnau et al., 2013). However, the pharmacokinetics of methylone seem linear in humans (Poyatos et al., 2022a), contrary to MDMA's, which has been widely described as non-linear (De La Torre et al., 2000). The pharmacokinetic data are consistent with the reduced potency of methylone at monoamine transporters when compared to MDMA. Additionally, methylone may not penetrate the brain as effectively as MDMA, due to the more polar β -keto group. Regarding methylone's capacity to penetrate into the brain, previous studies confirmed that methylone cross the blood-brain barrier with a brain-to-plasma ratio of 1.42 (López-Arnau et al., 2013), 4.54 (Štefková et al., 2017) or more than 3 (range 3–12) (Centazzo et al., 2021). Studies for MDMA found brain concentrations 5- to 10-fold higher than those in plasma (Mueller et al., 2009). Methylone seems to need higher blood concentrations to produce comparable pharmacological effects with MDMA.

The limitations of the present study should be noted. The statistical analysis lacked the power to detect significant differences between both active drugs owing to the sample size, despite increasing the size with respect to that initially calculated. In addition, although this study included participants of both sexes, the small number of females was insufficient to explore sex differences in the acute effects of methylone. As only one dose of methylone was

examined, our findings could not be extrapolated to higher doses or for establishing a dose-response relationship.

Given its short-lived subjective effects, methylone seems suitable for redosing to extend its duration of action. This postulation is reinforced by high scores in the SDRQ questionnaire regarding the desire to repeat the dose, which was performed 1 h post-administration. At that time point, the subjective effects of methylone were already decreasing in most participants, while those of MDMA were at their highest level. This phenomenon is also exhibited by mephedrone, a drug often readministered owing to its brief effects and rapid pharmacokinetics (Papaseit et al., 2016).

5 Conclusion

To the best of our knowledge, the present study is the first controlled study to assess the pharmacological effects of methylone in humans. Methylone enhanced cardiovascular parameters and subjective effects, characterized by stimulation, euphoria, increased sociability, and altered perception. This profile was similar to the prototypical effects associated with MDMA, which differed in onset and duration. Overall, these results suggest that the abuse potential of methylone is similar to that of MDMA in humans, although its shorter subjective effects with faster onset may lead to a redosing pattern of use.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Material](#), further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Germans Trias i Pujol Human Research Ethics Committee (code PI-19-082). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

MF, EP, LP, and CP-M conceptualized the study design. MF, EP, CP-M, SM, LP, OH, MN-M, GdR, AB, and LC collected the data; SM and LP organized the database. MF, EP, and LP performed statistical

analyses and generated the figures. LP, MF, and EP wrote the first draft; all the authors revised, and edited the manuscript.

Funding

This work was partially supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Fondo de Investigación en Salud [FIS]-Fondo Europeo de Desarrollo Regional [FEDER] under grant numbers PI17/01962 and PI20/00879, and a predoctoral PFIS fellowship under grant number FI18/00179); Plataformas ISCIII de apoyo a la I + D + I en Biomedicina y Ciencias de la Salud under grant number PT20/00018; and ISCIII-Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS)-Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones (RIAPAd) under grant numbers RD21/0009/0001 and RD21/0009/0004 funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), and by the European Union NextGenerationEU, Mecanismo para la Recuperación y la Resiliencia (MRR). It is also partially supported by the project “Implementation of the identification and study of the effects of NPS: Development of a multicenter research to enhance the database of the National drug Addiction Observatory and the Early Warning System” and by the project “National Early Warning System on Drugs” (SNAP)” following the Italian Department of Antidrug policies.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2023.1122861/full#supplementary-material>

References

- Australian Criminal Intelligence Commission (2020). National wastewater drug monitoring program report 10. 1–86. Available at: https://www.acic.gov.au/sites/default/files/2021-10/National_Wastewater_Drug_Monitoring_Report_14.pdf.
- Axelsson, M. A. B., Lövgren, H., Kronstrand, R., Green, H., and Bergström, M. A. (2022). Retrospective identification of new psychoactive substances in patient samples submitted for clinical drug analysis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 131, 420–434. doi:10.1111/bcpt.13786
- Barrios, L., Grison-Hernando, H., Boels, D., Bouquie, R., Montel-Ganiere, C., and Clement, R. (2016). Death following ingestion of methylone. *Int. J. Leg. Med.* 130, 381–385. doi:10.1007/s00414-015-1212-4
- Baumann, M. H., Ayestas, M. A., Partilla, J. S., Sink, J. R., Shulgin, A. T., Daley, P. F., et al. (2012). The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology* 37, 1192–1203. doi:10.1038/npp.2011.304

- Bossong, M. G., Van Dijk, J. P., and Niesink, R. J. M. (2005). Methylone and mCPP, two new drugs of abuse? *Addict. Biol.* 10, 321–323. doi:10.1080/13556210500350794
- Boulanger-Gobeil, C., St-Onge, M., Laliberté, M., and Auger, P. L. (2012). Seizures and hyponatremia related to ethcathinone and methylone poisoning. *J. Med. Toxicol.* 8, 59–61. doi:10.1007/s13181-011-0159-1
- Brenneisen, R., Fisch, H., Koelbing, U., Geissshusler, S., and Kalix, P. (1990). Amphetamine-like effects in humans of the khat alkaloid cathinone. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30, 825–828. doi:10.1111/j.1365-2125.1990.tb05447.x
- Brett, J., Siefried, K. J., Healey, A., Harrod, M. E., Franklin, E., Barratt, M. J., et al. (2022). Wastewater analysis for psychoactive substances at music festivals across New South Wales, Australia in 2019–2020. *Clin. Toxicol.* 60, 440–445. doi:10.1080/15563650.2021.1979233
- Busardò, F. P., Gottardi, M., Pacifici, R., Vari, M. R., Tini, A., Volpe, A. R., et al. (2020). Nails analysis for drugs used in the context of chemsex: A pilot study. *J. Anal. Toxicol.* 44, 69–74. doi:10.1093/jat/bkz009
- Camí, J., Farré, M., Mas, M., Roset, P. N., Poudevida, S., Mas, A., et al. (2000). Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"): Psychomotor performance and subjective effects. *J. Clin. Psychopharmacol.* 20, 455–466. doi:10.1097/00004714-200008000-00010
- Carbone, P. N., Carbone, D. L., Carstairs, S. D., and Luzzi, S. A. (2013). Sudden cardiac death associated with methylone use. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 34, 26–28. doi:10.1097/PAF.0b013e31827ab5da
- Cawse, B. M., Levine, B., Jufer, R. A., Fowler, D. R., Vorce, S. P., Dickson, A. J., et al. (2012). Distribution of methylone in four postmortem cases. *J. Anal. Toxicol.* 36, 434–439. doi:10.1093/jat/bks046
- Centazzo, N., Chojnacki, M. R., Elmore, J. S., Rodriguez, R., Acosta, T., Suzuki, M., et al. (2021). Brain concentrations of methylone and its metabolites after systemic methylone administration: Relationship to pharmacodynamic effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 377, 398–406. doi:10.1124/jpet.121.000531
- Creehan, K. M., Vandewater, S. A., and Taffe, M. A. (2015). Intravenous self-administration of mephedrone, methylone and MDMA in female rats. *Neuropharmacology* 92, 90–97. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.01.003
- De La Torre, R., Farré, M., Ortuño, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P. N., et al. (2000). Non-linear pharmacokinetics of MDMA ("ecstasy") in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 104–109. doi:10.1046/j.1365-2125.2000.00121.x
- De Sousa Fernandes Perna, E. B., Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Mateus, J., Theunissen, E. L., Kuypers, K. P. C., et al. (2016). Neurocognitive performance following acute mephedrone administration, with and without alcohol. *J. Psychopharmacol.* 30, 1305–1312. doi:10.1177/0269881116662635
- deRoux, S. J., and Dunn, W. A. (2017). Bath salts™ the New York city medical examiner experience: A 3-year retrospective review. *J. Forensic Sci.* 62, 695–699. doi:10.1111/1556-4029.13316
- Desrosiers, N. A., Barnes, A. J., Hartman, R. L., Scheidweiler, K. B., Kolbrich-Spargo, E. A., Gorelick, D. A., et al. (2013). Oral fluid and plasma 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolite correlation after controlled oral MDMA administration. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4067–4076. doi:10.1007/s00216-013-6848-7
- Elmore, J. S., Dillon-Carter, O., Partilla, J. S., Ellefsen, K. N., Concheiro, M., Suzuki, M., et al. (2017). Pharmacokinetic profiles and pharmacodynamic effects for methylone and its metabolites in rats. *Neuropsychopharmacology* 42, 649–660. doi:10.1038/npp.2016.213
- Eshleman, A. J., Wolfrum, K. M., Hatfield, M. G., Johnson, R. A., Murphy, K. V., and Janowsky, A. (2013). Substituted methcathinones differ in transporter and receptor interactions. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1803–1815. doi:10.1016/j.bcp.2013.04.004
- Farré, M., De La Torre, R., Mathúna, B. Ó., Roset, P. N., Peiró, A. M., Torrens, M., et al. (2004). Repeated doses administration of MDMA in humans: Pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacol. Berl.* 173, 364–375. doi:10.1007/s00213-004-1789-7
- Gomila, I., Lendoiro, E., de Castro, A., Elorza, M. Á., Puiguiriguer, J., Sahuquillo, L., et al. (2022). Detección no sospechada de catinonas y piperacinas en pacientes consumidores de metanfetamina y anfetamina atendidos en servicios de urgencias hospitalarios. *Emergencias* 34, 174–180.
- Holze, F., Vizeli, P., Müller, F., Ley, L., Duerig, R., Varghese, N., et al. (2020). Distinct acute effects of LSD, MDMA, and d-amphetamine in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology* 45, 462–471. doi:10.1038/s41386-019-0569-3
- Hysek, C. M., Simmler, L. D., Schillinger, N., Meyer, N., Schmid, Y., Donzelli, M., et al. (2014). Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of methylphenidate and MDMA administered alone or in combination. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 371–381. doi:10.1017/S1461145713001132
- Javadi-Paydar, M., Nguyen, J. D., Vandewater, S. A., Dickerson, T. J., and Taffe, M. A. (2018). Locomotor and reinforcing effects of pentedrone, pentylone and methylone in rats. *Neuropharmacology* 134, 57–64. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.09.002
- Jerome, L., Feduccia, A. A., Wang, J. B., Hamilton, S., Yazar-Klosinski, B., Emerson, A., et al. (2020). Long-term follow-up outcomes of MDMA-assisted psychotherapy for treatment of PTSD: A longitudinal pooled analysis of six phase 2 trials. *Psychopharmacol. Berl.* 237, 2485–2497. doi:10.1007/s00213-020-05548-2
- Karila, L., Billieux, J., Benyamina, A., Lançon, C., and Cottencin, O. (2016). The effects and risks associated to mephedrone and methylone in humans: A review of the preliminary evidences. *Brain Res. Bull.* 126, 61–67. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.03.005
- Kelmendi, B., Pittenger, C., Ching, T., Farré, M., Mandell, B., Stogniew, M., et al. (2022). Clinical evidence for the use of methylone in the treatment of PTSD: A case series with long-term follow-up. *Ann. Clin. Case Rep.* 7, 2209.
- Kirkpatrick, M. G., Baggott, M. J., Mendelson, J. E., Galloway, G. P., Liechti, M. E., Hysek, C. M., et al. (2014). MDMA effects consistent across laboratories. *Psychopharmacol. Berl.* 231, 3899–3905. doi:10.1007/s00213-014-3528-z
- Kuypers, K. P. C., de Sousa Fernandes Perna, E. B., Dolder, P. C., Toennes, S. W., Theunissen, E. L., Mason, N. L., et al. (2018). Drug liking and wanting, not impulsive action or reflection is increased by 4-fluoroamphetamine. *Psychopharmacol. Berl.* 235, 2349–2356. doi:10.1007/s00213-018-4931-7
- Kuypers, K. P. C., Dolder, P. C., Ramaekers, J. G., and Liechti, M. E. (2017). Multifaceted empathy of healthy volunteers after single doses of MDMA: A pooled sample of placebo-controlled studies. *J. Psychopharmacol.* 31, 589–598. doi:10.1177/0269881117699617
- Kuypers, K. P. C., Wingen, M., Samyn, N., Limbert, N., and Ramaekers, J. G. (2007). Acute effects of nocturnal doses of MDMA on measures of impulsivity and psychomotor performance throughout the night. *Psychopharmacol. Berl.* 192, 111–119. doi:10.1007/s00213-006-0679-6
- Lamas, X., Farré, M., Llorente, M., and Camí, J. (1994). Spanish version of the 49-item short form of the addiction research center inventory (ARCI). *Drug Alcohol Depend.* 35, 203–209. doi:10.1016/0376-8716(94)90075-2
- Liakoni, E., Müller, S., Stoller, A., Ricklin, M., Liechti, M. E., and Exadaktylos, A. K. (2017). Presentations to an urban emergency department in Bern, Switzerland associated with acute recreational drug toxicity. *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* 25, 26–29. doi:10.1186/s13049-017-0369-x
- López-Arnau, R., Martínez-Clemente, J., Carbó, M., Pubill, D., Escubedo, E., and Camarasa, J. (2013). An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new drug of abuse, methylone, a synthetic cathinone sold as "bath salts". *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 45, 64–72. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.007
- Luethi, D., Kolaczynska, K. E., Walter, M., Suzuki, M., Rice, K. C., Blough, B. E., et al. (2019). Metabolites of the ring-substituted stimulants MDMA, methylone and MDPV differentially affect human monoaminergic systems. *J. Psychopharmacol.* 33, 831–841. doi:10.1177/0269881119844185
- McIntyre, I. M., Hamm, C. E., Aldridge, L., and Nelson, C. L. (2013). Acute methylone intoxication in an accidental drowning - a case report. *Forensic Sci. Int.* 231, e1–e3. doi:10.1016/j.forsciint.2013.06.005
- Mitchell, J. M., Bogenschutz, M., Lilienstein, A., Harrison, C., Kleiman, S., Parker-Guilbert, K., et al. (2021). MDMA-Assisted therapy for severe PTSD: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Nat. Med.* 27, 1025–1033. doi:10.1038/s41591-021-01336-3
- Mueller, M., Yuan, J., Felim, A., Neudörffer, A., Peters, F. T., Maurer, H. H., et al. (2009). Further studies on the role of metabolites in (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonergic neurotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2079–2086. doi:10.1124/dmd.109.028340
- NFLIS (2016). "Special report: Synthetic cannabinoids and synthetic cathinones reported in NFLIS." 2013–2015. 12.
- Nguyen, J. D., Grant, Y., Creehan, K. M., Vandewater, S. A., and Taffe, M. A. (2017). Escalation of intravenous self-administration of methylone and mephedrone under extended access conditions. *Addict. Biol.* 22, 1160–1168. doi:10.1111/adb.12398
- Palamar, J. J., Barratt, M. J., Ferris, J. A., and Winstock, A. R. (2016). Correlates of new psychoactive substance use among a self-selected sample of nightclub attendees in the United States. *Am. J. Addict.* 25, 400–407. doi:10.1111/ajad.12403
- Palamar, J. J., Salomone, A., Gerace, E., Di Corcia, D., Vincenti, M., and Cleland, C. M. (2017). Hair testing to assess both known and unknown use of drugs amongst ecstasy users in the electronic dance music scene. *Int. J. Drug Policy* 48, 91–98. doi:10.1016/j.drugpo.2017.07.010
- Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Mateus, J. A., Pujadas, M., Fonseca, F., Torrens, M., et al. (2016). Human pharmacology of mephedrone in comparison with MDMA. *Neuropsychopharmacology* 41, 2704–2713. doi:10.1038/npp.2016.75
- Pearson, J. M., Hargraves, T. L., Hair, L. S., Massucci, C. J., Frazee, C. C., Garg, U., et al. (2012). Three fatal intoxications due to methylone. *J. Anal. Toxicol.* 36, 444–451. doi:10.1093/jat/bks043
- Poudevida, S., Farré, M., Roset, P. N., and Camí, J. (2003). Construcción de un cuestionario para la Valoración de los Efectos Subjetivos de Sustancias con Potencial de Abuso (VESSPA): Evaluación del éxtasis. *Adicciones* 15, 115–126. doi:10.20882/adicciones.435
- Poyatos, L., Lo Faro, A. F., Berardinelli, D., Sprega, G., Malaca, S., Pichini, S., et al. (2022a). Methylone and MDMA pharmacokinetics following controlled administration in humans. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 14636. doi:10.3390/ijms232314636
- Poyatos, L., Papaseit, E., Olesti, E., Pérez-Mañá, C., Ventura, M., Carbón, X., et al. (2021). A comparison of acute pharmacological effects of methylone and mdma

- administration in humans and oral fluid concentrations as biomarkers of exposure. *Biol. (Basel)* 10, 788. doi:10.3390/biology10080788
- Poyatos, L., Torres, A., Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Hladun, O., Núñez-Montero, M., et al. (2022b). Abuse potential of cathinones in humans: A systematic review. *J. Clin. Med.* 11, 1004. doi:10.3390/jcm11041004
- Ramaekers, J. G., and Kuypers, K. P. C. (2006). Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on behavioral measures of impulsivity: Alone and in combination with alcohol. *Neuropsychopharmacology* 31, 1048–1055. doi:10.1038/sj.npp.1300894
- Reifman, J., Kumar, K., Khitrov, M. Y., Liu, J., and Ramakrishnan, S. (2018). PC-PVT 2.0: An updated platform for psychomotor vigilance task testing, analysis, prediction, and visualization. *J. Neurosci. Methods* 304, 39–45. doi:10.1016/j.jneumeth.2018.04.007
- Salomone, A., Palamar, J. J., Gerace, E., Di Corcia, D., and Vincenti, M. (2017). Hair testing for drugs of abuse and new psychoactive substances in a high-risk population. *J. Anal. Toxicol.* 41, 376–381. doi:10.1093/jat/bkx020
- Schindler, C. W., Thorndike, E. B., Goldberg, S. R., Lehner, K. R., Cozzi, N. V., Brandt, S. D., et al. (2016). Reinforcing and neurochemical effects of the “bath salts” constituents 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and 3,4-methylenedioxy-N-methylcathinone (methylone) in male rats. *Psychopharmacol. Berl.* 233, 1981–1990. doi:10.1007/s00213-015-4057-0
- Shimomura, E. T., Briones, A. J., Warren, W. S., Addison, J. W., Knittel, J. L., Shoemaker, S. A., et al. (2016). Case report of methylone, oxymorphone and ethanol in a fatality case with tissue distribution. *J. Anal. Toxicol.* 40, 543–545. doi:10.1093/jat/bkw045
- Silber, B. Y., Croft, R. J., Papafotiou, K., and Stough, C. (2006). The acute effects of d-amphetamine and methamphetamine on attention and psychomotor performance. *Psychopharmacol. Berl.* 187, 154–169. doi:10.1007/s00213-006-0410-7
- Simmler, L. D., Buser, T. A., Donzelli, M., Schramm, Y., Dieu, L. H., Huwyler, J., et al. (2013). Pharmacological characterization of designer cathinones *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 168, 458–470. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02145.x
- Simmler, L. D., Hysek, C. M., and Liechti, M. E. (2011). Sex differences in the effects of MDMA (ecstasy) on plasma copeptin in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 2844–2850. doi:10.1210/jc.2011-1143
- Sogawa, C., Sogawa, N., Ohyama, K., Kikura-Hanjiri, R., Goda, Y., Sora, I., et al. (2011). Methylone and monoamine transporters: Correlation with toxicity. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 58–62. doi:10.2174/157015911795017425
- Štefková, K., Židková, M., Horsley, R. R., Pinterová, N., Šichová, K., Uttl, L., et al. (2017). Pharmacokinetic, ambulatory, and hyperthermic effects of 3,4-methylenedioxy-N-methylcathinone (Methylone) in rats. *Front. Psychiatry* 8, 232. doi:10.3389/fpsy.2017.00232
- Studerus, E., Vizeli, P., Harder, S., Ley, L., and Liechti, M. E. (2021). Prediction of MDMA response in healthy humans: A pooled analysis of placebo-controlled studies. *J. Psychopharmacol.* 35, 556–565. doi:10.1177/0269881121998322
- Vandewater, S. A., Creehan, K. M., and Taffe, M. A. (2015). Intravenous self-administration of entactogen-class stimulants in male rats. *Neuropharmacology* 99, 538–545. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.030
- Warner-Schmidt, J., Pittenger, C., Stogniew, M., Mandell, B., Olmstead, S. J., and Kelmendi, B. (2023). Methylone, a rapid acting entactogen with robust anxiolytic and antidepressant-like activity. *Front. Psychiatry* 13, 1–13. doi:10.3389/fpsy.2022.1041277
- Warrick, B. J., Wilson, J., Hedge, M., Freeman, S., Leonard, K., and Aaron, C. (2012). Lethal serotonin syndrome after methylone and butylone ingestion. *J. Med. Toxicol.* 8, 65–68. doi:10.1007/s13181-011-0199-6
- Watterson, L. R., Hood, L., Sewalia, K., Tomek, S. E., Yahn, S., Johnson, C. T., et al. (2012). The reinforcing and rewarding effects of methylone, a synthetic cathinone commonly found in “bath salts”. *Addict. Res. Ther.*
- Widler, P., Mathys, K., Brenneisen, R., Kalix, P., and Fisch, H. (1994). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of khat: A controlled study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 55, 556–562. doi:10.1038/clpt.1994.69
- Wolfson, P. E., Andries, J., Feduccia, A. A., Jerome, L., Wang, J. B., Williams, E., et al. (2020). MDMA-Assisted psychotherapy for treatment of anxiety and other psychological distress related to life-threatening illnesses: A randomized pilot study. *Sci. Rep.* 10, 20442. doi:10.1038/s41598-020-75706-1
- World Health Organization (WHO) (2014). *Methylone (bk - MDMA). Critical review report*. Geneva: WHO.

7. DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

Esta tesis doctoral realizada como compendio de artículos incluye dos publicaciones en las que se presentan, por un lado, la farmacocinética de diversas dosis orales únicas de metilona administradas en el estudio piloto y, por otro lado, los resultados sobre los efectos farmacológicos de una dosis única de metilona en comparación con MDMA y placebo del estudio definitivo.

Hasta donde conocemos, este sería el primer estudio experimental y controlado en evaluar tanto la farmacocinética como los efectos farmacológicos de la metilona por vía oral en humanos.

Conviene señalar que los resultados obtenidos en este estudio sobre la administración oral de una dosis única de 100 mg de MDMA son congruentes con los previamente publicados (Camí et al., 2000; Kirkpatrick et al., 2014; Papaseit et al., 2016; Kuypers et al., 2017; Holze et al., 2020; Studerus et al., 2021).

La discusión integrada de los resultados de la farmacocinética y los efectos farmacológicos que no se muestra en los resultados de los artículos se realiza en el apartado 6.3.

6.1 Farmacocinética

En la primera publicación que conforma esta tesis se presentan las concentraciones en sangre de la metilona del estudio piloto junto con la validación de una nueva técnica de análisis mediante LC/MS-MS. Sin embargo, en la presente tesis nos centraremos en la discusión de los datos farmacocinéticos de las diversas dosis únicas de metilona (50, 100, 150 y 200 mg) y MDMA (100 mg).

La metilona es una droga de abuso común, pero hasta la fecha, solo unos pocos estudios han abordado su farmacocinética y metabolismo en modelos animales (López-Arnau et al., 2013; Elmore et al., 2017; Štefková et al., 2017; Grecco et al., 2018). Por primera vez, investigamos la farmacocinética de la metilona y su metabolito 3,4-hidroximetoximetcatinona (HMMC) en humanos tras la administración de varias dosis orales de metilona.

Las concentraciones de metilona en sangre fueron proporcionales a la dosis, al menos a las dosis administradas de 50 a 200 mg. En comparación con la MDMA, la metilona alcanzó concentraciones promedio superiores tras la administración de una misma dosis de 100 mg de MDMA.

En general, la metilona mostró una farmacocinética rápida en las dosis orales entre 50 y 200 mg. La metilona alcanzó unas C_{max} de 153, 304, 355 y 604 ng/mL entre las 1,5 y 2,5 h (T_{max}) según las dosis. En comparación, la dosis de 100 mg de MDMA tardó 2 h en alcanzar una C_{max} de 66 ng/mL. Estos resultados de la MDMA concuerdan con estudios previos que indican valores de T_{max} de entre 2 y 2,5 h (Desrosiers et al., 2013; Hysek et al., 2014; Papaseit et al., 2016). En comparación con otras catinonas, la mefedrona (200 mg) alcanza concentraciones máximas a las 1,25 h, parecido a la catinona natural administrada en cápsulas orales (0,5 mg/kg) de la que se ha reportado una T_{max} de 1,2 h (Brenneisen et al., 1990; Papaseit et al., 2016). La $t_{1/2}$ de la metilona fue de entre 5,8 y 6,9 h, considerablemente superior a la de otras catinonas, como la mefedrona (2,3 h) o la catinona (4,8 h), pero inferior a la de otras fenetilaminas, como la MDMA (entre las 7,7 y 12 h) o la anfetamina–metanfetamina (12 h) (de la Torre et al., 2004). Estos resultados sugieren que las concentraciones plasmáticas de metilona y su metabolito siguen una cinética más rápida que la de la MDMA, pero menos rápidas en comparación con la mefedrona.

Respecto a los metabolitos, las concentraciones de HMMC fueron aproximadamente 20 veces más bajas que las concentraciones de la droga original a una dosis de 200 mg de metilona. En el caso de la MDMA, los resultados actuales muestran que el metabolito más abundante en plasma fue la 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), seguido de la 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA) y por último la 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA). Concretamente, de la HMMC se observaron C_{max} de 15, 24, 26 y 42 ng/mL tras las dosis de 50, 100, 150 y 200 mg entre las 0,9 y 1,5 h con una $t_{1/2}$ de entre 4,5 y 7,2 h. Los resultados de este estudio indican que la T_{max} del metabolito HMMC precede a la de la metilona, lo que sugeriría un metabolismo de primer paso en el hígado. Estudios previos muestran concentraciones máximas de la droga original más tempranas que las de los metabolitos (Farré et al., 2007; Hysek et al., 2014). Sin embargo, también existen otras publicaciones que han descrito valores de T_{max} de los metabolitos HMMA y su precursor 3,4-dihidroximetanfetamina (HHMA) que preceden a los de la MDMA (Segura et al., 2001, 2005; Pizarro et al., 2002; Kolbrich et al., 2008; Mueller et al., 2009a).

CINÉTICA LINEAL

Por primera vez, documentamos una farmacocinética lineal de la metilona y su metabolito más abundante (HMMC) basada en valores normalizados de C_{max} y AUC en humanos. Los valores normalizados de AUC_{0-10} en base a las dosis de 50, 100, 150 y 200 mg de metilona indican una relación de 14,5, 15,9, 14,9, 16,6 y 20,8, mientras que en valores de AUC_{0-24} se han obtenido de 20,8, 24,4, 23,5, 25,3; consideramos que la variación observada en los dos casos estaría probablemente relacionada con la variabilidad interindividual debido al número reducido de la muestra. Este descubrimiento es relevante dado los resultados contradictorios obtenidos en modelo animal, en los que se observó comportamiento no lineal tras la administración subcutánea (Elmore et al., 2017)

aunque también existen resultados tras su administración oral en ratas que coinciden con la cinética lineal obtenida en la presente tesis (López-Arnau et al., 2013). En este aspecto, se asemejaría a la mefedrona, de la que se ha documentado un comportamiento lineal en humanos a dosis de 50 a 200 mg (Olesti et al., 2019).

Es también de interés enfatizar la diferencia del comportamiento cinético en comparación con la MDMA, la cual ha sido descrita previamente como no lineal debido a la inhibición de su propio metabolismo (De La Torre et al., 2000; Kolbrich et al., 2008). Para la MDMA a dosis de 50, 75, 100, 125 y 150 mg se obtienen valores normalizados de AUC_{0-24} de 9,15, 17,8, 18,5, 21 y 34,5, evidenciando un aumento de las concentraciones no proporcional a las dosis (De La Torre et al., 2000). La diferencia de estos valores observados para la MDMA en comparación con los obtenidos en esta tesis sobre la metilona respaldaría aún más la teoría de la farmacocinética lineal de esta última.

Esta diferencia en sus comportamientos cinéticos es sorprendente dada la similitud en su metabolismo tal y como se ha descrito en estudios previos. Tanto la metilona como la MDMA son capaces de autoinhibir su propio metabolismo a través de la inhibición del principal responsable del mismo, el CYP2D6 (Pedersen et al., 2013). Como se ha mencionado, la generación de los metabolitos de la MDMA no es proporcional en función a la dosis, observándose razones de metabolito/MDMA menores a medida que aumenta la dosis (Kolbrich et al., 2008). Este fenómeno se podría explicar por la inhibición de la enzima CYP2D6 por parte de la MDMA. Por el contrario, según nuestros resultados, la cinética del metabolito HMMC parece seguir un modelo lineal con razones de metabolito/metilona estables entre las dosis (0,10, 0,08, 0,07, 0,07), por lo que no respaldarían la inhibición de CYP2D6 en humanos. Serían necesarios estudios adicionales que confirmaran este descubrimiento o que investigasen en mayor profundidad este fenómeno para dilucidar las posibles

rutas metabólicas u otros mecanismos complementarios de la metilona que le permitan mantener una cinética lineal.

Al respecto de la toxicología de la metilona, existen algunos informes publicados sobre intoxicaciones por metilona en las que aparecen síntomas característicos de intoxicaciones por MDMA dada la similitud farmacológica entre ambas sustancias (O'Shea et al., 2023). En este aspecto, la farmacocinética lineal de la metilona en humanos podría producir una proporcionalidad dosis-respuesta que protegería contra posibles sobredosis. Las consecuencias toxicológicas de la farmacocinética no lineal de la metilona en animales son poco conocidas.

La disposición de MDMA se ve en gran medida afectada por el polimorfismo CYP2D6. Sin embargo, esta influencia puede ser menos relevante debido al efecto del mecanismo de autoinhibición de la MDMA sobre esta enzima y la contribución de otras isoenzimas del citocromo P450 en el proceso de metabolismo (De La Torre et al., 2004; Schmid et al., 2016; Vizeli et al., 2017). Al evaluar este efecto en la farmacocinética, se observó que los metabolizadores lentos alcanzaban concentraciones máximas más altas de MDMA (+15%) y MDA (+50%), pero concentraciones más bajas de HMMA (-50-70%) en comparación con los metabolizadores rápidos. Estas diferencias pueden tener implicaciones en los efectos farmacológicos y la toxicidad, ya que los metabolizadores lentos experimentan aumentos más altos y más rápidos en la presión arterial y efectos subjetivos (Schmid et al., 2016). Además, concentraciones más altas de HHMA podrían conducir a una mayor formación de algunas quinonas, que están involucradas en los mecanismos de neurotoxicidad serotoninérgica (De La Torre y Farré, 2004). De manera similar, se puede plantear la hipótesis de una influencia potencial de los polimorfismos enzimáticos en la toxicidad del metabolito HHMC de metilona. Sin embargo, aún se desconoce si estos efectos

también ocurren después de la administración de metilona, por lo que se necesitarían estudios complementarios para verificar esta hipótesis.

6.2 Efectos farmacológicos

La segunda publicación que forma parte de esta tesis presenta los resultados del estudio definitivo sobre los efectos farmacológicos de la metilona en comparación con MDMA y placebo.

Respecto a los efectos farmacológicos, el principal hallazgo es que una dosis oral única de 200 mg de metilona induce efectos cardiovasculares y placenteros notables, que incluyen estimulación, euforia, bienestar, mayor empatía y leve alteración de la percepción.

Respecto a los efectos fisiológicos, los resultados muestran que la metilona produjo un aumento especialmente sobre la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca con efectos máximos (E_{max}) de 37 mmHg y 29 lpm a las 0,75 h (t_{max}). El incremento sobre la frecuencia cardíaca fue sostenido, con diferencias significativas en comparación con placebo hasta las 10 h. En comparación, la MDMA provocó incrementos sobre la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca con E_{max} de 32 mmHg y 22 lpm a la 1 h, aunque esta última se normalizó a las 6 h, más rápidamente que en el caso de la metilona. Ambas sustancias produjeron midriasis, con efectos más pronunciados de la MDMA a lo largo del curso temporal.

Sobre los efectos subjetivos, las dos sustancias indujeron un conjunto de efectos y sensaciones subjetivas muy similares. Los efectos más característicos de la administración de metilona incluyeron estimulación y sensación de bienestar [ej. Escala analógica visual (VAS) "estimulación", "colocado", "buenos efectos"], ligera alteración en la percepción (ej. VAS "sensación corporal diferente") y aumento de la empatía (ej. VAS "me siento cercano a los demás",

“me gustaría estar con otras personas”). Las subescalas del Inventario del Centro de Investigación de Adicciones (ARCI) con mayor puntuación fueron ARCI MBG (euforia) y A (efectos tipo anfetamina). En el Cuestionario de evaluación de los efectos subjetivos de las sustancias con potencial de abuso (VESSPA) las subescalas más puntuadas fueron VESSPA PCS (placer y contacto social) y ACT (activación y contacto social). Ambos cuestionarios reflejaron los efectos estimulantes, euforigénicos y empatogénicos de la metilona. Aunque la magnitud de los efectos en comparación con los de la MDMA fuera similar, el inicio y desaparición fue más temprana, posiblemente debido a una cinética más rápida.

Referente a su acción sobre la actividad psicomotora, la metilona fue la única sustancia que redujo ligeramente, pero de forma significativa, el tiempo de reacción a un estímulo simple. Contrariamente, la MDMA no produjo efectos diferentes al placebo.

Los efectos farmacológicos de la MDMA observados en el presente estudio estarían en línea con los descritos previamente en otros estudios sobre su farmacología en humanos (Camí et al., 2000; Kirkpatrick et al., 2014; Papaseit et al., 2016; Kuypers et al., 2017; Holze et al., 2020; Studerus et al., 2021).

Esta similitud de efectos de la metilona y la MDMA también quedó reflejada en los resultados del cuestionario de identificación de la clase farmacológica que completaron los voluntarios en cada sesión experimental. La mayoría de los participantes identificaron la metilona como una droga de diseño parecida a la MDMA, mientras que uno de ellos la identificó como estimulante parecido a la anfetamina. Sucedió de forma parecida en la identificación del consumo de MDMA, aunque uno de ellos la clasificó como placebo.

Los resultados presentes corroboran los obtenidos en un estudio observacional en el que se evaluaron los efectos de la metilona en condiciones naturales (Poyatos et al., 2021). En el estudio observacional, 8 sujetos se

autoadministraron una dosis oral de metilona (100-300 mg, dosis media de 187 mg), que seleccionaron ellos mismos según sus preferencias y experiencias previas. En similares condiciones, otros 6 sujetos seleccionaron y se autoadministraron una dosis única oral de MDMA (75-100 mg, dosis media de 87 mg). En un ambiente natural, la metilona exhibió un perfil estimulante prototípico y efectos empatogénicos frecuentemente atribuidos a la MDMA. Además, se observó un aumento elevado y sostenido de la frecuencia cardíaca por parte de la metilona, también observado en condiciones controladas. Los efectos subjetivos producidos por la metilona fueron más leves que los de la MDMA bajo las mismas condiciones y que los obtenidos en el presente estudio en condiciones controladas. Esta discrepancia entre los efectos de la metilona entre ambos estudios podría atribuirse a la amplia experiencia en el consumo de psicoestimulantes de los voluntarios del estudio observacional y/o a los distintos entornos en los que se realizaron los estudios.

Otra catinona sintética de la que se ha evaluado su farmacología en humanos sería la mefedrona, considerada una de las más populares para consumo recreativo. Con ese objetivo se realizó un ensayo clínico que incluyó 12 participantes sanos con experiencia previa en el consumo de psicoestimulantes. En dicho estudio se evaluó una dosis de 200 mg de mefedrona en comparación con 100 mg de MDMA y placebo. En condiciones y dosis similares, la metilona y la mefedrona producen un perfil parecido de efectos fisiológicos y subjetivos con un inicio temprano y de corta duración. Ambas catinonas producen efectos máximos de la frecuencia cardíaca más elevados y menor midriasis en comparación con la MDMA. Además, ambas afectan a los signos vitales con un inicio temprano e intensidad similar. Al igual que la metilona, la mefedrona exhibió un perfil similar al de la MDMA con efectos subjetivos deseables, que incluyeron estimulación, sensación de bienestar, leve alteración de la percepción y aumento de la sociabilidad (Papaseit et al., 2016).

Además, los efectos de la metilona son consistentes con los resultados de estudios previos que evaluaban los efectos de la catinona, componente psicoactivo de la planta khat (Nencini et al., 1986; Brenneisen et al., 1990; Widler et al., 1994; Toennes y Kauert, 2002; Toennes et al., 2003). Tras consumirla mediante la masticación de las hojas del khat o encapsulada, la catinona produce un aumento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, normalmente acompañado de sensación de euforia, estimulación e incremento de la energía.

Cabe destacar que la metilona mostró algunas particularidades que diferían de la MDMA. A diferencia de la MDMA y la mefedrona, la metilona produjo un aumento sostenido de la frecuencia cardíaca que persistió de forma significativa en comparación con placebo durante 10 h a pesar de la normalización de la presión arterial. Además, la metilona fue la única que redujo el tiempo de reacción simple a un estímulo, sugiriendo una mejora del rendimiento psicomotor. Esta mejora también se ha documentado con la administración de anfetaminas (Silber et al., 2006), aunque no hay evidencia clara para MDMA (Camí et al., 2000; Farré et al., 2004; Ramaekers y Kuypers, 2006; Kuypers et al., 2007). Al respecto de la mefedrona, existen evidencias de que en combinación con alcohol sería capaz de reducir el tiempo de reacción en comparación con la administración sola de alcohol, en parte mitigando los efectos sedantes de este. Sin embargo, la mefedrona sola no produjo efectos sobre el tiempo de reacción que difirieran significativamente de la condición de placebo (De Sousa Fernandes Perna et al., 2016). Finalmente, la principal diferencia entre la metilona y la MDMA radicaría en el tiempo de aparición y desaparición más temprana de los efectos subjetivos inducidos por la primera, una particularidad semejante a la mefedrona (Papaseit et al., 2016).

Dada la corta duración de sus efectos subjetivos, el consumo de metilona puede conducir a la necesidad de redosificar con el fin de prolongarla. Esta hipótesis se

vería reforzada por las altas puntuaciones en el Cuestionario de sensibilidad al refuerzo de las drogas (SDRQ) sobre el deseo de repetir la dosis, que se realizó 1 h después de la administración. En ese punto temporal, los efectos subjetivos de la metilona ya estaban disminuyendo en la mayoría de los participantes, mientras que los de la MDMA se encontraban aún en su nivel más alto. Este fenómeno también ocurre con la mefedrona, una sustancia que se redosifica con frecuencia debido a la brevedad de sus efectos y su rápida farmacocinética (Papaseit et al., 2016).

6.3 Datos integrativos de farmacocinética y efectos

En este apartado se aportan figuras adicionales (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15) que no se incluyen en los manuscritos incluidos en el compendio con el fin de integrar los resultados de ambas publicaciones. A continuación, se discutirán dichas figuras y la relación entre la farmacocinética y efectos agudos de la metilona.

Como era de esperar, los efectos farmacológicos producidos por la metilona a dosis de 200 mg se iniciaron coincidiendo con el incremento de los niveles de metilona plasmáticos. En el caso de los efectos fisiológicos (Figura 10), la presión arterial sistólica comenzó a disminuir a partir de 1 h hasta que regresó a niveles basales a las 6 h, difiriendo de las concentraciones plasmáticas se mantuvieron elevadas hasta las 2 h. En cambio, el efecto sobre la frecuencia cardiaca se mantuvo sostenido en el tiempo a pesar del descenso de las concentraciones circulantes de metilona.

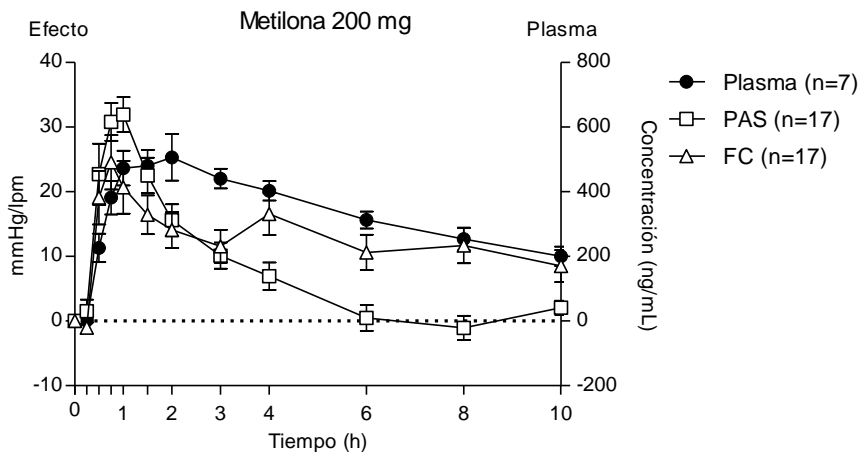


Figura 10. Resultados integrados de los efectos sobre la presión arterial sistólica (PAS) y la frecuencia cardiaca (FC) en comparación con las concentraciones de metilona plasmáticas.

Los efectos cardiovasculares de la MDMA inician junto el incremento de las concentraciones de esta en el plasma, aunque alcanzan el máximo antes que las concentraciones (Figura 11). La presión arterial sistólica y la frecuencia cardiaca se restituyen a las 6 h a pesar de las concentraciones elevadas de MDMA en el plasma.

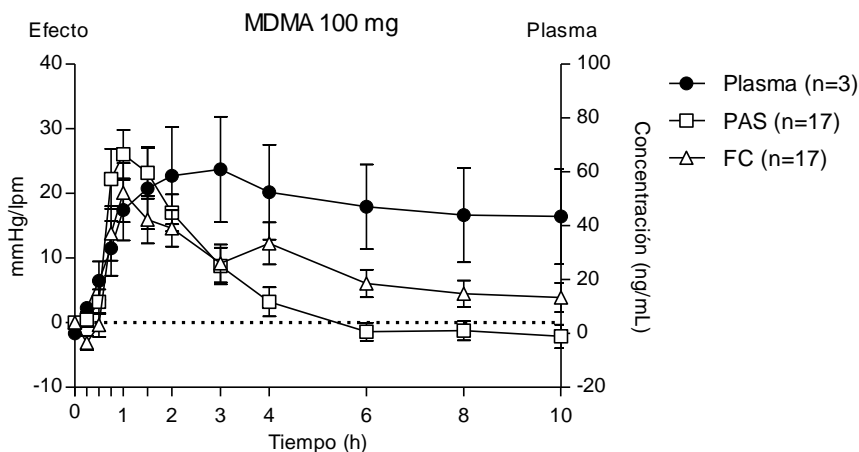


Figura 11. Resultados integrados de los efectos sobre presión arterial sistólica (PAS) y la frecuencia cardiaca (FC) en comparación con las concentraciones de MDMA plasmáticas.

Respecto a los efectos subjetivos de la metilona (Figura 12), estos también tuvieron un inicio precoz acompañados de la elevación de las concentraciones

plasmáticas de metilona. Sin embargo, desaparecieron casi por completo a las 3 h diferenciándose de una forma más evidente del perfil cinético.

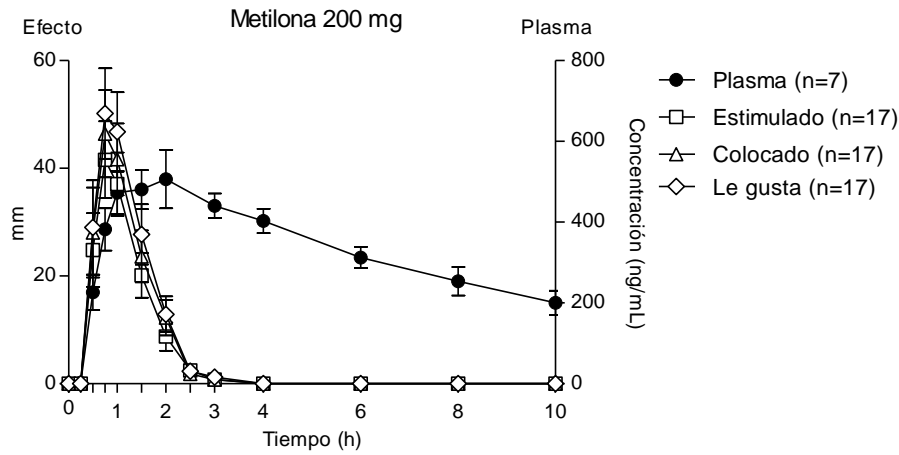


Figura 12. Resultados integrados de los efectos de estimulado, colocado y le gusta de las escalas analógicas visuales (VAS) en comparación con las concentraciones de metilona plasmáticas.

En el caso de la MDMA (Figura 13), los efectos subjetivos tardan más en alcanzar el máximo y en desaparecer, coincidiendo con una cinética más lenta en sangre.

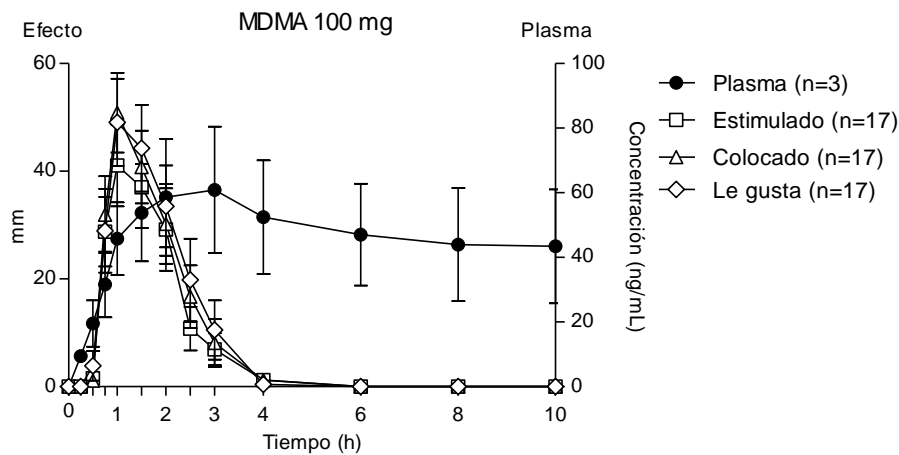


Figura 13. Resultados integrados de los efectos de estimulado, colocado y le gusta de las escalas analógicas visuales (VAS) en comparación con las concentraciones de MDMA plasmáticas.

Respecto a la relación entre las concentraciones plasmática de metilona y sus efectos farmacológicos, se puede observar una pronunciada histéresis a favor de reloj (Figura 14). Este tipo de relación sugeriría un fenómeno de tolerancia

aguda, en el que se experimentan mayores efectos durante el ascenso de las concentraciones que tiempo después durante el descenso a mismas concentraciones.

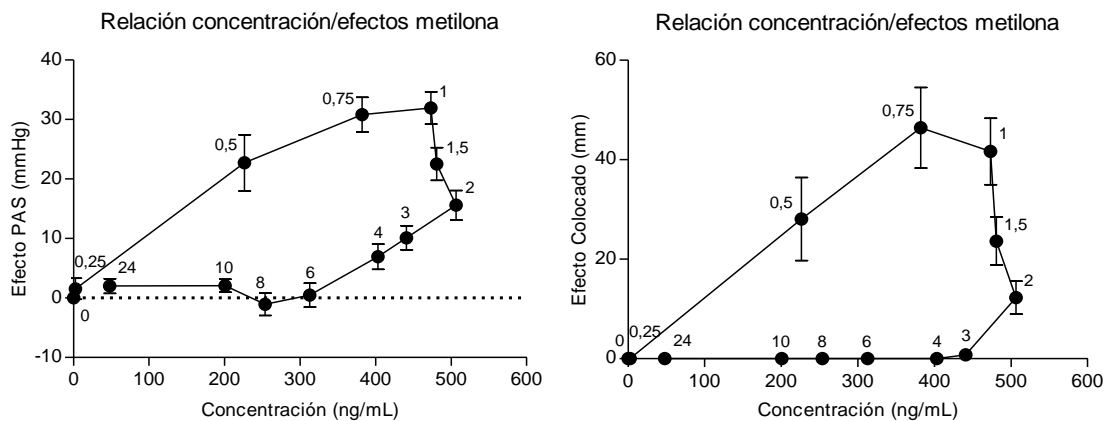


Figura 14. Relación entre las concentraciones plasmáticas de metilona y sus efectos sobre la presión arterial sistólica (PAS) y el efecto de colocado de las escalas analógicas visuales (VAS).

Lo mismo puede observarse en el caso de la MDMA (Figura 15), corroborando previas investigaciones en las que también se obtuvieron indicios de tolerancia aguda (Peiró et al., 2013; Hysek et al., 2014; Farré et al., 2015).

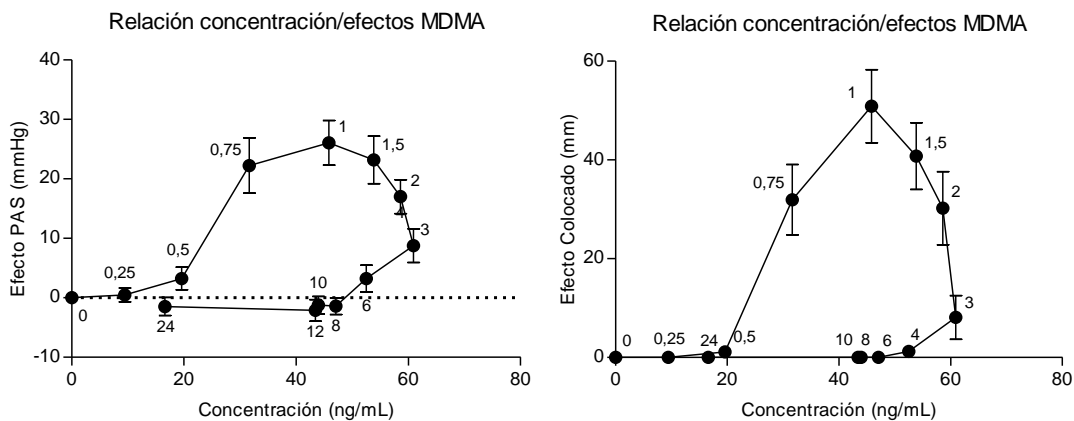


Figura 15. Relación entre las concentraciones plasmáticas de MDMA y sus efectos sobre la presión arterial sistólica (PAS) y el efecto de colocado de las escalas analógicas visuales (VAS).

Según la curva de la relación, la metilona produce mayores efectos sobre la presión arterial sistólica y de colocado antes de conseguir las concentraciones máximas. La diferencia máxima entre los efectos reportados a una misma

concentración se encontraría en los tiempos de 0,75 y 4 h, ya que los efectos a 0,75 h fueron máximos mientras que a las 4 h a una misma concentración ya no se reportaban efectos. Esta tolerancia aguda podría explicarse como el resultado de un agotamiento funcional de las reservas presinápticas de monoaminas que impediría la liberación de los neurotransmisores a pesar del mantenimiento de altas concentraciones de la sustancia en el plasma (Hysek et al., 2014). Los resultados de un estudio previo sugerirían que la administración de metilona induciría un agotamiento agudo selectivo de la 5-HT cerebral, ya que no se observó en el caso de la DA (Centazzo et al., 2021).

La menor $t_{1/2}$ de la metilona podría explicar la disipación más temprana de los efectos subjetivos en comparación con la MDMA. Sin embargo, la duración y desaparición de los efectos de la metilona serían similares a los de mefedrona, una sustancia que ha demostrado una $t_{1/2}$ más corta que la metilona.

Los efectos farmacológicos máximos (T_{max} de 0,75-1 h) aparecieron antes que las concentraciones máximas plasmáticas de metilona (T_{max} de 2 h). Este hecho también se puede observar en otros estudios que evalúan la farmacología humana de otras catinonas como la mefedrona (Papaseit et al., 2016). En ese estudio, los efectos máximos de la mefedrona y la MDMA precedieron a las concentraciones máximas en sangre. Los efectos de la mefedrona alcanzaron su punto máximo a las 0,75 h, aunque sus concentraciones fueron máximas a las 1,25 h. En el caso de MDMA, los efectos alcanzaron su punto máximo a entre las 0,75 y 1,25 h, mientras que las concentraciones máximas se alcanzaron a las 2 h (Papaseit et al., 2016). Nuestros resultados, junto con los de estudios previos, confirman que los efectos farmacológicos no necesitan concentraciones máximas de la sustancia en sangre para alcanzar los efectos máximos.

Respecto al metabolito analizado en plasma, los efectos psicoactivos podrían no atribuirse a las concentraciones de HMMC a pesar de su afinidad por los transportadores de monoaminas (Elmore et al., 2017; Luethi et al., 2019), dada la

escasa capacidad de penetración cerebral de los metabolitos hidroxilados (Centazzo et al., 2021).

El hecho de necesitar dosis y concentraciones superiores de metilona para producir efectos farmacológicos comparables a los de la MDMA sería consistente con la menor actividad de la metilona en los transportadores de monoaminas en comparación con la MDMA. Además, es posible que la metilona no penetre en el cerebro con tanta eficacia como la MDMA, debido a la mayor polaridad conferida por su grupo β -ceto. Como se ha comentado, existen evidencias en animales que confirman la capacidad de la metilona de atravesar la barrera hematoencefálica con una relación cerebro-plasma de 1,42 (López-Arnau et al., 2013), 4,54 (Štefková et al., 2017) o más de 3 (rango 3-12) (Centazzo et al., 2021). Los estudios de MDMA encontraron concentraciones en el cerebro de 5 a 10 veces más altas que las del plasma (Mueller et al., 2009b). En casos post-mortem humanos, se han reportado una razones promedio de 2,68 (1,19-4,66) de metilona y de 3,9 (0,92-5,1) de MDMA (Nedahl et al., 2019).

LIMITACIONES

Una de las limitaciones del estudio piloto cuyos resultados se describen en el primer manuscrito sería el escaso tamaño muestral. El número reducido de participantes aumenta la variabilidad de los resultados farmacocinéticos. Entre los participantes no se incluían las mujeres, de manera que no se ha podido evaluar la farmacocinética de la metilona en ambos sexos. Por seguridad, solo se administraron dosis hasta los 200 mg de metilona, de manera que se desconocen tanto la farmacocinética como los efectos agudos asociados a dosis superiores. Además, solo se midió un metabolito de metilona, HMMC, debido a la falta de disponibilidad de los estándares químicos puros de MDC y HHMC necesarios para su determinación en el momento del estudio.

Respecto a las limitaciones del estudio definitivo presentado en el segundo manuscrito, el análisis estadístico carecía de potencia para detectar diferencias significativas entre ambos fármacos activos en muchas de las variables evaluadas debido al tamaño de la muestra, a pesar de aumentar el tamaño respecto al inicialmente calculado. Además, aunque este estudio incluyó participantes de ambos sexos, el pequeño número de mujeres fue insuficiente para explorar las diferencias de sexo en los efectos agudos de la metilona. Como solo se examinó una dosis de metilona, nuestros hallazgos no pudieron extrapolarse a dosis más altas ni establecer una relación dosis-respuesta.

6.4 Futuras líneas de investigación

Hasta donde conocemos, esta sería la primera vez que se ha investigado la farmacocinética y los efectos farmacológicos de la metilona en humanos en condiciones controladas. Sin embargo, a raíz de estos resultados, todavía serían necesarios estudios adicionales para aclarar algunos de los aspectos encontrados o que no se han podido tratar en los presentes estudios.

Los resultados actuales apoyarían la hipótesis de una cinética lineal de la metilona en humanos, pero sería necesario profundizar en este asunto y dilucidar el papel que juega el CYP2D6 al respecto. En estudios previos la metilona demostró una autoinhibición de su propio metabolismo a través del CYP2D6, un mecanismo también conocido en el caso de la MDMA. Habríamos esperado observar una cinética no lineal a raíz de esta autoinhibición, similar a la MDMA de la que se ha descrito comportamiento no lineal. Teniendo en cuenta los resultados contradictorios de su cinética en estudios preclínicos, futuras investigaciones podrían arrojar luz sobre la relación entre la cinética y el involucramiento del CYP2D6. Adicionalmente, podrían realizarse estudios en los que se utilizasen fármacos concretos que inhiban ciertas vías metabólicas para

evaluar el papel del CYP2D6 o administrando fármacos marcadores de actividad metabólica tras la metilona.

Los dos presentes estudios han evaluado la farmacología de la metilona a dosis únicas, por lo que aún se desconoce la cinética y efectos farmacológicos tras dosis múltiples. Este tipo de administración también permitiría profundizar en la toxicidad de la metilona y también contribuiría a verificar si existe una modificación de su cinética debido a la inhibición de su metabolismo.

Debido al escaso número de mujeres en el estudio definitivo, no se han podido examinar las posibles diferencias de sexo en los efectos farmacológicos de la metilona. Sería interesante el estudio de estas posibles diferencias en el futuro.

8. CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo respecto a las hipótesis y objetivos planteados son las siguientes:

1. La administración experimental de metilona demostró su potencial de abuso en humanos, produciendo efectos prototípicos de tipo estimulante:
 - 1.1. Indujo efectos subjetivos de estimulación, sensación de bienestar, euforia y leve alteración de la percepción. Los efectos fueron máximos a las 0,75 h y se disiparon a las 3 h.
 - 1.2. Provocó efectos empatógenos caracterizados por una sensación y deseo de mayor cercanía a los demás, y sentirse abierto y confiado hacia los demás. Los efectos fueron máximos a las 0,75 h y se disiparon a las 3 h.
 - 1.3. Produjo un aumento de la presión arterial, la frecuencia cardíaca y el diámetro pupilar que fueron máximos a las 0,75 h. Los efectos sobre la presión arterial y el diámetro pupilar se normalizaron entre las 4 y 6 h, pero el incremento sobre la frecuencia cardíaca se mantuvo sostenido hasta las 10 h tras la administración de metilona.
2. La metilona administrada a dosis orales de 50, 100, 150 y 200 mg demostró una farmacocinética más rápida que la MDMA con las siguientes características:
 - 2.1. Las concentraciones máximas de metilona se observaron entre las 1,5 y 2 h tras la administración de las diferentes dosis de metilona. El metabolito HMMC mostró una cinética rápida, con concentraciones máximas a entre la 1 y 1,5 h.
 - 2.2. La concentración máxima de MDMA se observó a las 2 h tras la administración de 100 mg de MDMA.
 - 2.3. La semivida de eliminación de la metilona fue de entre 5,8 y 6,9 h, menor que las 12 h correspondientes a la MDMA.

- 2.4. La metilona presentó una cinética lineal en el rango de dosis administradas.
3. La metilona produjo un perfil de efectos farmacológicos de tipo psicoestimulantes y empatógenos similares a los de la MDMA con un inicio más temprano y menor duración. La metilona disminuyó el tiempo de reacción mientras que no se observaron cambios con la MDMA.
 - 3.1. La menor duración de los efectos farmacológicos de la metilona podría explicarse por una semivida de eliminación más corta respecto a la MDMA.
 - 3.2. La similitud del perfil de efectos de la metilona y la MDMA sugeriría un potencial de abuso comparable entre ambas.
4. Todas las dosis orales de metilona administradas en el estudio presentaron buena tolerabilidad y no se observaron acontecimientos adversos graves/inesperados.
5. Como conclusión final, este trabajo demuestra que la metilona presenta un elevado potencial de abuso, en la línea de otras catinonas, MDMA y otros derivados anfetamínicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aarde, S. M., y Taffe, M. A. (2017). «Predicting the Abuse Liability of Entactogen-Class, New and Emerging Psychoactive Substances via Preclinical Models of Drug Self-administration», en *Curr Top Behav Neurosci*, 145-164. doi: 10.1007/7854_2016_54.
- Abebe, W. (2018). Khat: A Substance of Growing Abuse with Adverse Drug Interaction Risks. *J. Natl. Med. Assoc.* 110, 624-634. doi: 10.1016/j.jnma.2018.04.001.
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. 5a edición. Arlington, VA.
- Australian Criminal Intelligence Commission (2020). National Wastewater Drug Monitoring Program Report 10. 1-86. Disponible en: [https://www.acic.gov.au/sites/default/files/2021-10/National Wastewater Drug Monitoring Report 14.pdf](https://www.acic.gov.au/sites/default/files/2021-10/National_Wastewater_Drug_Monitoring_Report_14.pdf). Consultado el 30/03/2023.
- Axelsson, M. A. B., Lövgren, H., Kronstrand, R., Green, H., y Bergström, M. A. (2022). Retrospective identification of new psychoactive substances in patient samples submitted for clinical drug analysis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 131, 420-434. doi: 10.1111/bcpt.13786.
- Banks, M. L., Worst, T. J., y Sprague, J. . (2014). Synthetic Cathinones and amphetamine analogues: What's the rave about? *J Emerg Med* 46, 632-642. doi: 10.1016/j.jemermed.2013.11.104.Synthetic.
- Barrios, L., Grison-Hernando, H., Boels, D., Bouquie, R., Monteil-Ganiere, C., y Clement, R. (2016). Death following ingestion of methylone. *Int. J. Legal Med.* 130, 381-385. doi: 10.1007/s00414-015-1212-4.
- Baumann, M. H., Jr, M. A. A., Partilla, J. S., Sink, J. R., Shulgin, A. T., Daley, P. F., et al. (2012). The designer methcathinone analogs, mephedrone and

- methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology* 37, 1192-1203. doi: 10.1038/npp.2011.304.
- Baumann, M. H., Partilla, J. S., y Lehner, K. R. (2013). Psychoactive «bath salts»: Not so soothing. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 1-5. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.020.
- Baumann, M. H., Walters, H. M., Niello, M., y Sitte, H. H. (2018). Neuropharmacology of Synthetic Cathinones. *Handb. Exp. Pharmacol.* 252, 113-142. doi: 10.1007/164_2018_178.
- Baumann, M. H., Zolkowska, D., Kim, I., Scheidweiler, K. B., Rothman, R. B., y Huestis, M. A. (2009). Effects of dose and route of administration on pharmacokinetics of (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2163-2170. doi: 10.1124/dmd.109.028506.
- Boletín Oficial del Estado (2016). Orden SSI/748/2016. Disponible en: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2016-4737. Consultado el 30/03/2023.
- Bonano, J., Glennon, R., De Felice, L., Banks, M., y Negus, S. (2014). Abuse-related and abuse-limiting effects of methcathinone and the synthetic «bath salts» cathinone analogs methylenedioxypyrovalerone (MDPV), methylone and mephedrone on intracranial self-stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 231, 1-7. doi: 10.1007/s00213-013-3223-5.Abuse-related.
- Bosson, M. G., Van Dijk, J. P., y Niesink, R. J. M. (2005). Methylone and mCPP, two new drugs of abuse? *Addict. Biol.* 10, 321-323. doi: 10.1080/13556210500350794.
- Boulanger-Gobeil, C., St-Onge, M., Laliberté, M., y Auger, P. L. (2012). Seizures and Hyponatremia Related to Ethcathinone and Methylone Poisoning. *J. Med. Toxicol.* 8, 59-61. doi: 10.1007/s13181-011-0159-1.
- Brenneisen, R., Fisch, H., Koelbing, U., Geisshusler, S., y Kalix, P. (1990).

- Amphetamine-like effects in humans of the khat alkaloid cathinone. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30, 825-828. doi: 10.1111/j.1365-2125.1990.tb05447.x.
- Brett, J., Siefried, K. J., Healey, A., Harrod, M. E., Franklin, E., Barratt, M. J., et al. (2022). Wastewater analysis for psychoactive substances at music festivals across New South Wales, Australia in 2019–2020. *Clin. Toxicol.* 60, 440-445. doi: 10.1080/15563650.2021.1979233.
- Busardò, F. P., Gottardi, M., Pacifici, R., Vari, M. R., Tini, A., Volpe, A. R., et al. (2020). Nails analysis for drugs used in the context of chemsex: A pilot study. *J. Anal. Toxicol.* 44, 69. doi: 10.1093/jat/bkz009.
- Calinski, D. M., Kisor, D. F., y Sprague, J. E. (2019). A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on drug pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)*. 236, 881-890. doi: 10.1007/s00213-018-4985-6.
- Camí, J., Farré, M., Mas, M., Roset, P. N., Poudevida, S., Mas, A., et al. (2000). Human pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine («Ecstasy»): psychomotor performance and subjective effects. *J. Clin. Psychopharmacol.* 20, 455-466. doi: 10.1097/00004714-200008000-00010.
- Carbone, P. N., Carbone, D. L., Carstairs, S. D., y Luzi, S. A. (2013). Sudden Cardiac Death Associated With Methylone Use. *Am J Forensic Med Pathol* 34, 26-28. doi: 10.1097/PAF.0b013e31827ab5da.
- Cawrse, B. M., Levine, B., Jufer, R. A., Fowler, D. R., Vorce, S. P., Dickson, A. J., et al. (2012). Distribution of methylone in four postmortem cases. *J. Anal. Toxicol.* 36, 434-439. doi: 10.1093/jat/bks046.
- Centazzo, N., Chojnacki, M. R., Elmore, J. S., Rodriguez, R., Acosta, T., Suzuki, M., et al. (2021). Brain Concentrations of Methylone and Its Metabolites after Systemic Methylone Administration: Relationship to Pharmacodynamic Effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 377, 398-406. doi: 10.1124/jpet.121.000531.

- Cercato, C., Roizenblatt, V., Leança, C., Segal, A., Lopes Filho, A., Mancini, M., et al. (2009). A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of diethylpropion in the treatment of obese subjects. *Int. J. Obes.* 33, 857-65. doi: 10.1038/ijo.2009.124.
- Chary, M., Yi, D., y Manini, A. F. (2018). Candyflipping and other combinations: Identifying drug-drug combinations from an online forum. *Front. Psychiatry* 9, 1-9. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00135.
- Colado, M., Alguacil, L. F., y Farré, M. (2018). «Drogas de abuso», en: *Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA, Portolés A. Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. 19ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 325-344. ISBN 9788498354379.
- Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (PNSD) (2011). *Drogas Emergentes. Informes de la Comisión Clínica*. Disponible en: <https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/publicaciones/catalogo/catalogoPNSD/publicaciones/pdf/InformeDrogasEmergentes.pdf>. Consultado el 30/03/2023.
- Corazza, O., Assi, S., Simonato, P., Corkery, J., Bersani, F. S., Demetrovics, Z., et al. (2013). Promoting innovation and excellence to face the rapid diffusion of novel psychoactive substances in the EU: the outcomes of the ReDNet project. *Hum. Psychopharmacol.* 28, 317-23. doi: 10.1002/hup.2299.
- Cozzi, N. V., Brandt, S. D., Daley, P. F., Partilla, J. S., Rothman, R. B., Tulzer, A., et al. (2013). Pharmacological examination of trifluoromethyl ring-substituted methcathinone analogs. *Eur. J. Pharmacol.* 699, 180-187. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.008.Pharmacological.
- Cozzi, N. V., Sievert, M. K., Shulgin, A. T., Jacob, P., y Ruoho, A. E. (1999). Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by β -ketoamphetamines. *Eur. J. Pharmacol.* 381, 63-69. doi: 10.1016/S0014-

2999(99)00538-5.

- Creehan, K. M., Vandewater, S. A., y Taffe, M. A. (2015). Intravenous self-administration of mephedrone, methylone and MDMA in female rats. *Neuropharmacology* 92, 90-97. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.01.003. Intravenous.
- Dal Cason, T. A., Young, R., y Glennon, R. A. (1997). Cathinone: An investigation of several N-alkyl and methylenedioxy-substituted analogs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58, 1109-1116. doi: 10.1016/S0091-3057(97)00323-7.
- De Felice, L. J., Glennon, R. A., y Negus, S. S. (2014). Synthetic Cathinones: Chemical Phylogeny, Physiology, and Neuropharmacology. *Life Sci.* 97, 20-26. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.029.Synthetic.
- De La Torre, R., y Farré, M. (2004). Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): The limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 505-508. doi: 10.1016/j.tips.2004.08.001.
- de la Torre, R., Farré, M., Navarro, M., Pacifici, R., Zuccaro, P., y Pichini, S. (2004). Clinical Pharmacokinetics of Amfetamine and Related Substances. *Clin. Pharmacokinet.* 43, 157-185. doi: 0312-5963/04/0003-0157/\$31.00/0.
- De La Torre, R., Farré, M., Ortuño, J., Mas, M., Brenneisen, R., Roset, P. N., et al. (2000). Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 104-109. doi: 10.1046/j.1365-2125.2000.00121.x.
- De La Torre, R., Farré, M., Roset, P. N., Pizarro, N., Abanades, S., Segura, M., et al. (2004). Human Pharmacology of MDMA: Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition. *Ther. Drug Monit.* 26, 137-144. doi: 10.1097/00007691-200404000-00009.
- De Sousa Fernandes Perna, E. B., Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Mateus, J., Theunissen, E. L., Kuypers, K. P. C., et al. (2016). Neurocognitive performance following acute mephedrone administration, with and without alcohol. *J.*

Psychopharmacol. 30, 1305-1312. doi: 10.1177/0269881116662635.

Deluca, P., Davey, Z., Corazza, O., Di Furia, L., Farre, M., Flesland, L. H., et al. (2012). Identifying emerging trends in recreational drug use; outcomes from the Psychonaut Web Mapping Project. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39, 221-6. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.07.011.

deRoux, S. J., y Dunn, W. A. (2017). "Bath Salts" the New York City Medical Examiner Experience: A 3-Year Retrospective Review. *J. Forensic Sci.* 62, 695-699. doi: 10.1111/1556-4029.13316.

Desrosiers, N. A., Barnes, A. J., Hartman, R. L., Scheidweiler, K. B., Kolbrich-Spargo, E. A., Gorelick, D. A., et al. (2013). Oral fluid and plasma 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolite correlation after controlled oral MDMA administration. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4067-4076. doi: 10.1007/s00216-013-6848-7.

Dolan, S. B., Chen, Z., Huang, R., y Gatch, M. B. (2018). "Ecstasy" to addiction: Mechanisms and reinforcing effects of three synthetic cathinone analogs of MDMA. *Neuropharmacology* 133, 171-180. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.01.020.

Drug Enforcement Administration (DEA) (2013). Schedules of Controlled Substances: Placement of Methylone Into Schedule I - 21 CFR Part 1308. Disponible en: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2013-04-12/pdf/2013-08673.pdf>. Consultado el 30/03/2023.

Elmore, J. S., Dillon-Carter, O., Partilla, J. S., Ellefsen, K. N., Concheiro, M., Suzuki, M., et al. (2017). Pharmacokinetic Profiles and Pharmacodynamic Effects for Methylone and Its Metabolites in Rats. *Neuropsychopharmacology* 42, 649-660. doi: 10.1038/npp.2016.213.

Engidawork, E. (2017). Pharmacological and Toxicological Effects of *Catha edulis* F. (Khat). *Phyther. Res.* 31, 1019-1028. doi: 10.1002/ptr.5832.

- ESPAD Group (2019). *ESPAD Report 2019: Results from European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs.* , ed. EMCDDA Joint Publications Luxembourg: Publications Office of the European Union doi: 10.2810/877033. Disponible en: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13398/2020.3878_EN_04.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2010). *Informe anual 2010: el problema de la drogodependencia en Europa.* Luxembourg: Publications Office of the European Union. Disponible en: https://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_143743_ES_EMCCDDA_AR2011_ES.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2022a). *European Drug Report 2022: Trends and Developments.* Luxembourg: Publications Office of the European Union. Disponible en: <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14644/TDAT22001ENN.pdf>. Consultado el 30/03/2023.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2022b). Global markets, glocal threats.
- Evans-Brown, M., y Sedefov, R. (2017). New psychoactive substances: driving greater complexity into the drug problem. *Addiction* 112, 36-38. doi: 10.1111/add.13528.
- Evans-Brown, M., y Sedefov, R. (2018). «Responding to new psychoactive substances in the european union: Early warning, risk assessment, and control measures», en *Handbook of Experimental Pharmacology* (Springer New York LLC), 3-49. doi: 10.1007/164_2018_160.
- Farré, M., Abanades, S., Roset, P. N., Peiró, A. M., Torrens, M., O'Mathúna, B., et al. (2007). Pharmacological interaction between 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and paroxetine:

- Pharmacological effects and pharmacokinetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 954-962. doi: 10.1124/jpet.107.129056.
- Farré, M., De La Torre, R., Mathúna, B. Ó., Roset, P. N., Peiró, A. M., Torrens, M., et al. (2004). Repeated doses administration of MDMA in humans: Pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)*. 173, 364-375. doi: 10.1007/s00213-004-1789-7.
- Farré, M., Papaseit, E., Fonseca, F., y Torrens, M. (2021). «Addiction of Hallucinogens, Dissociatives, Designer Drugs and “Legal Highs”: Update on Potential Therapeutic Use», en *In: el-Guebaly N, Carrà G, Galanter M, Baldacchino AM, editors. Textbook of Addiction Treatment.* (Switzerland: Springer Nature), 259-279. doi: doi.org/10.1007/978-3-030-36391-8_19.
- Farré, M., Tomillero, A., Pérez-Mañá, C., Yubero, S., Papaseit, E., Roset, P. N., et al. (2015). Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) after repeated doses taken 4h apart Human pharmacology of MDMA after repeated doses taken 4h apart. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25, 1637-1649. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.05.007.
- Flórez Beledo, J., Armijo, J. A., y Mediavilla, Á. (2014). *FARMACOLOGÍA HUMANA*. 6a edición. Barcelona (España): Elsevier Masson. ISBN: 9788445823163.
- Gannon, B. M., Galindo, K. I., Mesmin, M. P., Rice, K. C., y Collins, G. T. (2018). Reinforcing Effects of Binary Mixtures of Common Bath Salt Constituents: Studies with 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV), 3,4-Methylenedioxymethcathinone (methylone), and Caffeine in Rats. *Neuropsychopharmacology* 43, 761-769. doi: 10.1038/npp.2017.141.
- Gatch, M. B., Taylor, C. M., y Forster, M. J. (2013). Locomotor Stimulant and Discriminative Stimulus Effects of “Bath Salt” Cathinones. *Behav. Pharmacol.*

- 24, 437-447. doi: 10.1097/FBP.0b013e328364166d.Locomotor.
- Gearlds, C., Bouldin, J. B., McKinney, M., Schreiner, S., Brown, S. D., y Pond, B. B. (2021). Pharmacokinetics of Synthetic Cathinones Found in Bath Salts in Mouse Brain and Plasma Using High-Pressure Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 46, 771-778. doi: 10.1007/s13318-021-00712-1.
- Gibbons, S., y Zloh, M. (2010). An analysis of the «legal high» mephedrone. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 20, 4135-4139. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.05.065.
- Giné, C. V., Espinosa, I. F., y Vilamala, M. V. (2014). New psychoactive substances as adulterants of controlled drugs. A worrying phenomenon? *Drug Test. Anal.* 6, 819-824. doi: 10.1002/dta.1610.
- Gomila, I., Lendoiro, E., de Castro, A., Elorza, M. Á., Puiguriguer, J., Sahuquillo, L., et al. (2022). Detección no sospechada de catinonas y piperacinas en pacientes consumidores de metanfetamina y anfetamina atendidos en servicios de urgencias hospitalarios. *Emergencias* 34, 174-180.
- González, D., Ventura, M., Caudevilla, F., Torrens, M., y Farré, M. (2013). Consumption of new psychoactive substances in a Spanish sample of research chemical users. *Hum. Psychopharmacol.* 28, 332-340. doi: 10.1002/hup.2323.
- Grecco, G. G., Kisor, D. F., Magura, J. S., y Sprague, J. E. (2017). Impact of common clandestine structural modifications on synthetic cathinone “bath salt” pharmacokinetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 328, 18-24. doi: 10.1016/j.taap.2017.05.010.
- Grecco, G. G., Kisor, D. F., y Sprague, J. E. (2018). Pharmacokinetic data of synthetic cathinones in female Sprague-Dawley rats. *Data Br.* 21, 1045-1050. doi: 10.1016/j.dib.2018.10.073.

- Grov, C., Kelly, B. C., y Parsons, J. T. (2009). Polydrug Use Among Club-Going Young Adults Recruited Through Time-Space Sampling. *Subst. Use Misuse* 44, 848-864. doi: 10.1080/10826080802484702.
- Grupo de expertos Neptune (2015). *Guidance on the Management of Acute and Chronic Harms of Club Drugs and Novel Psychoactive Substances*. London.
- Gutiérrez-López, E., O'Shea Gaya, E., y Colado Megía, M. (2023). «Anfetaminas.», en Colado MI, Farré M, Leza JC, Lizasoain I, directores. *Drogodependencias* 4ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana., 237-249. ISBN: 978-84-9110-706-4.
- Hassan, Z., Bosch, O. G., Singh, D., Narayanan, S., Kasinather, B. V., Seifritz, E., et al. (2017). Novel psychoactive substances-recent progress on neuropharmacological mechanisms of action for selected drugs. *Front. Psychiatry* 8. doi: 10.3389/fpsy.2017.00152.
- Heather, E., Bortz, A., Shimmon, R., y McDonagh, A. M. (2017). Organic impurity profiling of methylone and intermediate compounds synthesized from catechol. *Drug Test. Anal.* 9, 436-445. doi: 10.1002/dta.2140.
- Holze, F., Vizeli, P., Müller, F., Ley, L., Duerig, R., Varghese, N., et al. (2020). Distinct acute effects of LSD, MDMA, and d-amphetamine in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology* 45, 462-471. doi: 10.1038/s41386-019-0569-3.
- Hondebrink, L., Zwartsen, A., y Westerink, R. H. S. (2018). Effect fingerprinting of new psychoactive substances (NPS): What can we learn from in vitro data? *Pharmacol. Ther.* 182, 193-224. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.022.
- Hysek, C. M., Simmler, L. D., Schillinger, N., Meyer, N., Schmid, Y., Donzelli, M., et al. (2014). Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of methylphenidate and MDMA administered alone or in combination. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 371-381. doi: 10.1017/S1461145713001132.

- Ianucci, R. C., y Weiss, R. D. (2022). «Stimulant-Related Disorders», en *En: Boland, R.; Verduin, M. L.; Ruiz, P. Kaplan & Sadock's synopsis of psychiatry* (Filadelfia: Wolters Kluwer), 973-993.
- Iversen, L., White, M., y Treble, R. (2014). Designer psychostimulants: Pharmacology and differences. *Neuropharmacology* 87, 59-65. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.015.
- Jacob, P., y Shulgin, A. T. (1996). Patent for Novel N-substituted-2-amino-3', 4'-methylene-dioxypropiofenones. Patente de Estados Unidos de América con número de publicación WO 96/39133. Asignada a Neurobiological Technologies INC.
- Javadi-Paydar, M., Nguyen, J. D., Vandewater, S. A., Dickerson, T. J., y Taffe, M. A. (2018). Locomotor and reinforcing effects of pentedrone, pentylone and methylone in rats. *Neuropharmacology* 134, 57-64. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.002.
- Jerome, L., Feduccia, A. A., Wang, J. B., Hamilton, S., Yazar-Klosinski, B., Emerson, A., et al. (2020). Long-term follow-up outcomes of MDMA-assisted psychotherapy for treatment of PTSD: a longitudinal pooled analysis of six phase 2 trials. *Psychopharmacology (Berl)*. 237, 2485-2497. doi: 10.1007/s00213-020-05548-2.
- Kamata, H. T., Shima, N., Zaitso, K., Kamata, T., Miki, A., Nishikawa, M., et al. (2006). Metabolism of the recently encountered designer drug, methylone, in humans and rats. *Xenobiotica* 36, 709-723. doi: 10.1080/00498250600780191.
- Karila, L., Billieux, J., Benyamina, A., Lançon, C., y Cottencin, O. (2016). The effects and risks associated to mephedrone and methylone in humans: A review of the preliminary evidences. *Brain Res. Bull.* 126, 61-67. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.03.005.

- Karlsson, L., Andersson, M., Kronstrand, R., y Kugelberg, F. C. (2014). Mephedrone, methylone and 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) induce conditioned place preference in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 115, 411-416. doi: 10.1111/bcpt.12253.
- Kelmendi, B., Pittenger, C., Ching, T., Farré, M., Mandell, B., Stogniew, M., et al. (2022). Clinical Evidence for the Use of Methylone in the Treatment of PTSD: A Case Series with Long-Term Follow-Up. *Ann Clin Case Rep* 7, 2209.
- Khom, S., Nguyen, J. D., Vandewater, S. A., Grant, Y., Roberto, M., y Taffe, M. A. (2021). Self-Administration of Entactogen Psychostimulants Dysregulates Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) and Kappa Opioid Receptor Signaling in the Central Nucleus of the Amygdala of Female Wistar Rats. *Front. Behav. Neurosci.* 15, 1-13. doi: 10.3389/fnbeh.2021.780500.
- Kinyua, J., Negreira, N., Miserez, B., Causanilles, A., Emke, E., Gremeaux, L., et al. (2016). Qualitative screening of new psychoactive substances in pooled urine samples from Belgium and United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 573, 1527-1535. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.124.
- Kirkpatrick, M. G., Baggott, M. J., Mendelson, J. E., Galloway, G. P., Liechti, M. E., Hysek, C. M., et al. (2014). MDMA effects consistent across laboratories. *Psychopharmacology (Berl)*. 231, 3899-3905. doi: 10.1007/s00213-014-3528-z.
- Kolbrich, E. A., Goodwin, R. S., Gorelick, D. A., Hayes, R. J., Stein, E. A., y Huestis, M. A. (2008). Plasma Pharmacokinetics of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine After Controlled Oral Administration to Young Adults. *Ther. Drug Monit.* 30, 320-332. doi: 10.1097/FTD.0b013e3181684fa0.
- Konradi, C., y Hurd, Y. (2023). «Drug Use Disorders and Addiction», en Brunton LL, Knollmann BC, editors. *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* (New York: McGraw Hill), 531-553.

- Krotulski, A. J., Mohr, A. L. A., Fogarty, M. F., y Logan, B. K. (2018). The Detection of Novel Stimulants in Oral Fluid from Users Reporting Ecstasy, Molly and MDMA Ingestion. *J. Anal. Toxicol.* 42, 544-553. doi: 10.1093/jat/bky051.
- Kuypers, K. P. C., Dolder, P. C., Ramaekers, J. G., y Liechti, M. E. (2017). Multifaceted empathy of healthy volunteers after single doses of MDMA: A pooled sample of placebo-controlled studies. *J. Psychopharmacol.* 31, 589-598. doi: 10.1177/0269881117699617.
- Kuypers, K. P. C., Wingen, M., Samyn, N., Limbert, N., y Ramaekers, J. G. (2007). Acute effects of nocturnal doses of MDMA on measures of impulsivity and psychomotor performance throughout the night. *Psychopharmacology (Berl)*. 192, 111-119. doi: 10.1007/s00213-006-0679-6.
- Liakoni, E., Müller, S., Stoller, A., Ricklin, M., Liechti, M. E., y Exadaktylos, A. K. (2017). Presentations to an urban emergency department in Bern, Switzerland associated with acute recreational drug toxicity. *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* 25, 1-9. doi: 10.1186/s13049-017-0369-x.
- López-Arnau, R., Martínez-Clemente, J., Carbó, M., Pubill, D., Escubedo, E., y Camarasa, J. (2013). An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new drug of abuse, methylone, a synthetic cathinone sold as «bath salts». *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 45, 64-72. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.04.007.
- López-Arnau, R., Martínez-Clemente, J., Pubill, D., Escubedo, E., y Camarasa, J. (2012). Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: Butylone, mephedrone and methylone. *Br. J. Pharmacol.* 167, 407-420. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01998.x.
- Luethi, D., Kolaczynska, K. E., Walter, M., Suzuki, M., Rice, K. C., Blough, B. E., et al. (2019). Metabolites of the ring-substituted stimulants MDMA, methylone and MDPV differentially affect human monoaminergic systems. *J.*

- Psychopharmacol.* 33, 831-841. doi: 10.1177/0269881119844185.
- Madras, B. K. (2017). The Growing Problem of New Psychoactive Substances (NPS). *Curr Top Behav Neurosci* 32, 1-18. doi: 10.1007/7854.
- Martínez-Clemente, J., López-Arnau, R., Carbó, M., Pubill, D., Camarasa, J., y Escubedo, E. (2013). Mephedrone pharmacokinetics after intravenous and oral administration in rats: Relation to pharmacodynamics. *Psychopharmacology (Berl)*. 229, 295-306. doi: 10.1007/s00213-013-3108-7.
- Mas, M., Farré, M., De la Torre, R., Roset, P. N., Ortuño, J., Segura, J., et al. (1999). Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 136-145.
- Matthews, A., Sutherland, R., Peacock, A., Van Buskirk, J., Whittaker, E., Burns, L., et al. (2017). I like the old stuff better than the new stuff? Subjective experiences of new psychoactive substances. *Int. J. Drug Policy* 40, 44-49. doi: 10.1016/j.drugpo.2016.11.004.
- McIntyre, I. M., Hamm, C. E., Aldridge, L., y Nelson, C. L. (2013). Acute methylone intoxication in an accidental drowning - A case report. *Forensic Sci. Int.* 231, 8-10. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.06.005.
- Miner, N. B., O'Callaghan, J. P., Phillips, T. J., y Janowsky, A. (2017). The combined effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and selected substituted methcathinones on measures of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 61, 74-81. doi: 10.1016/j.ntt.2017.02.003.
- Mitchell, J. M., Bogenschutz, M., Lilienstein, A., Harrison, C., Kleiman, S., Parker-Guilbert, K., et al. (2021). MDMA-assisted therapy for severe PTSD: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Nat. Med.* 27, 1025-1033. doi: 10.1038/s41591-021-01336-3.
- Mithoefer, M. C., Feduccia, A. A., Jerome, L., Mithoefer, A., Wagner, M., Walsh, Z.,

- et al. (2019). MDMA-assisted psychotherapy for treatment of PTSD: study design and rationale for phase 3 trials based on pooled analysis of six phase 2 randomized controlled trials. *Psychopharmacology (Berl)*. 236, 2735-2745. doi: 10.1007/s00213-019-05249-5.
- Mithoefer, M. C., Grob, C. S., y Brewerton, T. D. (2016). Novel psychopharmacological therapies for psychiatric disorders: Psilocybin and MDMA. *The Lancet Psychiatry* 3, 481-488. doi: 10.1016/S2215-0366(15)00576-3.
- Mithoefer, M. C., Mithoefer, A. T., Feduccia, A. A., Jerome, L., Wagner, M., Wymer, J., et al. (2018). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-assisted psychotherapy for post-traumatic stress disorder in military veterans, firefighters, and police officers: a randomised, double-blind, dose-response, phase 2 clinical trial. *The Lancet Psychiatry* 5, 486-497. doi: 10.1016/S2215-0366(18)30135-4.
- Mohr, A. L. A., Friscia, M., Yeakel, J. K., y Logan, B. K. (2018). Use of synthetic stimulants and hallucinogens in a cohort of electronic dance music festival attendees. *Forensic Sci. Int.* 282, 168-178. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.11.017.
- Mueller, D. M., y Rentsch, K. M. (2012). Generation of metabolites by an automated online metabolism method using human liver microsomes with subsequent identification by LC-MS(n), and metabolism of 11 cathinones. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2141-2151. doi: 10.1007/s00216-011-5678-8.
- Mueller, M., Kolbrich, E. A., Peters, F. T., Maurer, H. H., McCann, U. D., Huestis, M. A., et al. (2009a). Direct Comparison of (\pm) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") Disposition and Metabolism in Squirrel Monkeys and Humans. *Ther. Drug Monit.* 31, 367-373. doi: 10.1097/FTD.0b013e3181a4f6c2.

- Mueller, M., Yuan, J., Felim, A., Neudörffer, A., Peters, F. T., Maurer, H. H., et al. (2009b). Further studies on the role of metabolites in (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonergic neurotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2079-2086. doi: 10.1124/dmd.109.028340.
- Nagai, F., Nonaka, R., y Satoh Hisashi Kamimura, K. (2007). The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 559, 132-137. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.075.
- Napoletano, F., Schifano, F., Corkery, J. M., Guirguis, A., Arillotta, D., Zangani, C., et al. (2020). The Psychonauts' World of Cognitive Enhancers. *Front. Psychiatry* 11. doi: 10.3389/fpsy.2020.546796.
- Nedahl, M., Johansen, S. S., y Linnet, K. (2019). Postmortem brain-blood ratios of amphetamine, cocaine, ephedrine, mdma and methylphenidate. *J. Anal. Toxicol.* 43, 378-384. doi: 10.1093/jat/bky110.
- Nencini, P., Ahmed, A. M., y Elmi, A. S. (1986). Subjective effects of khat chewing in humans*. *Drug Alcohol Depend.* 18, 97-105.
- Nguyen, J. D., Grant, Y., Creehan, K. M., Vandewater, S. A., y Taffe, M. A. (2017). Escalation of intravenous self-administration of methylone and mephedrone under extended access conditions. *Addict. Biol.* 22, 1160-1168. doi: 10.1111/adb.12398.
- O'Shea, E., Vidal Casado, R., y Colado Megía, M. (2023a). «Drogas de diseño: MDMA», en Colado MI, Farré M, Leza JC, Lizasoain I, directores. *Drogodependencias*. 4ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana), 251-265. ISBN: 978-84-9110-706-4.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA) (2021a). Estudios 2021 - Encuesta sobre uso de drogas en enseñanzas secundarias en España (ESTUDES), 1994-2021. Disponible en: https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/ESTUDES_2021

- _Informe_de_Resultados.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA) (2021b). Informe 2021: alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Encuesta sobre alcohol y drogas en España (EDADES) 1995-2019/2020. Disponible en: https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/2019-20_Informe_EDADES.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- Olesti, E., Farré, M., Carbó, M., Papaseit, E., Perez-Mañá, C., Torrens, M., et al. (2019). Dose-Response Pharmacological Study of Mephedrone and Its Metabolites: Pharmacokinetics, Serotonergic Effects, and Impact of CYP2D6 Genetic Variation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 106, 596-604. doi: 10.1002/cpt.1417.
- Ot'alora G, M., Grigsby, J., Poulter, B., Van Derveer, J. W., Giron, S. G., Jerome, L., et al. (2018). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: A randomized phase 2 controlled trial. *J. Psychopharmacol.* 32, 1295-1307. doi: 10.1177/0269881118806297.
- Palamar, J. J., Acosta, P., Calderón, F. F., Sherman, S., y Cleland, C. M. (2017a). Assessing self-reported use of new psychoactive substances: The impact of gate questions. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 43, 609-617. doi: 10.1080/00952990.2017.1322094.
- Palamar, J. J., Barratt, M. J., Ferris, J. A., y Winstock, A. R. (2016). Correlates of new psychoactive substance use among a self-selected sample of nightclub attendees in the United States. *Am. J. Addict.* 25, 400-407. doi: 10.1111/ajad.12403.
- Palamar, J. J., Salomone, A., Gerace, E., Di Corcia, D., Vincenti, M., y Cleland, C. M. (2017b). Hair testing to assess both known and unknown use of drugs amongst ecstasy users in the electronic dance music scene. *Int. J. Drug*

Policy 48, 91-98. doi: 10.1016/j.drugpo.2017.07.010.

Papaseit, E., Farré, M., Schifano, F., y Torrens, M. (2014). Emerging drugs in Europe. *Curr. Opin. Psychiatry* 27, 243-250. doi: 10.1097/YCO.0000000000000071.

Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., y Farré, M. (2023). «Nuevas sustancias psicoactivas», en Colado M, Farré M, Leza JC, Lizasoain I, directores. *Drogodependencias*. 4ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana), 285-290. ISBN: 978-84-9110-706-4.

Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Mateus, J. A., Pujadas, M., Fonseca, F., Torrens, M., et al. (2016). Human pharmacology of mephedrone in comparison with MDMA. *Neuropsychopharmacology* 41, 2704-2713. doi: 10.1038/npp.2016.75.

Patel, K., Allen, S., Haque, M. N., Angelescu, I., Baumeister, D., y Tracy, D. K. (2016). Bupropion: a systematic review and meta-analysis of effectiveness as an antidepressant. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 6, 99-144. doi: 10.1177/2045125316629071.

Peacock, A., Bruno, R., Gisev, N., Degenhardt, L., Hall, W., Sedefov, R., et al. (2019). New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses. *Lancet* 394, 1668-1684. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32231-7.

Pearson, J. M., Hargraves, T. L., Hair, L. S., Massucci, C. J., Frazee, C. C., Garg, U., et al. (2012). Three fatal intoxications due to methylone. *J. Anal. Toxicol.* 36, 444-451. doi: 10.1093/jat/bks043.

Pedersen, A. J., Petersen, T. H., y Linnet, K. (2013). In vitro metabolism and pharmacokinetic studies on methylone. *Drug Metab. Dispos.* 41, 1247-1255. doi: 10.1124/dmd.112.050880.

Peiró, A. M., Farré, M., Roset, P. N., Carbó, M., Pujadas, M., Torrens, M., et al.

- (2013). Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) after repeated doses taken 2 h apart. *Psychopharmacology (Berl)*. 225, 883-893. doi: 10.1007/s00213-012-2894-7.
- Piao, Y. S., Hall, F. S., Moriya, Y., Ito, M., Ohara, A., Kikura-Hanajiri, R., et al. (2015). Methylone-induced hyperthermia and lethal toxicity: Role of the dopamine and serotonin transporters. *Behav. Pharmacol.* 26, 345-352. doi: 10.1097/FBP.000000000000135.
- Pizarro, N., Ortuno, J., Farre, M., Hernandez-Lopez, C., Pujadas, M., Llebaria, A., et al. (2002). Determination of MDMA and its Metabolites in Blood and Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Analysis of Enantiomers by Capillary Electrophoresis. *J. Anal. Toxicol.* 26, 157-165. doi: 10.1093/jat/26.3.157.
- Poyatos, L., Papaseit, E., Olesti, E., Pérez-Mañá, C., Ventura, M., Carbón, X., et al. (2021). A Comparison of Acute Pharmacological Effects of Methylone and MDMA Administration in Humans and Oral Fluid Concentrations as Biomarkers of Exposure. *Biology (Basel)*. 10, 788. doi: 10.3390/biology10080788.
- Poyatos, L., Torres, A., Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Hladun, O., Núñez-Montero, M., et al. (2022). Abuse Potential of Cathinones in Humans: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* 11. doi: 10.3390/jcm11041004.
- Prosser, J. M., y Nelson, L. S. (2012). The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. *J. Med. Toxicol.* 8, 33-42. doi: 10.1007/s13181-011-0193-z.
- Ramaekers, J. G., y Kuypers, K. P. C. (2006). Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on behavioral measures of impulsivity: Alone and in combination with alcohol. *Neuropsychopharmacology* 31, 1048-1055. doi: 10.1038/sj.npp.1300894.

- Richeval, C., Wille, S. M. R., Nachon-Phanithavong, M., Samyn, N., Allorge, D., y Gaulier, J. michel (2018). New psychoactive substances in oral fluid of French and Belgian drivers in 2016. *Int. J. Drug Policy* 57, 1-3. doi: 10.1016/j.drugpo.2018.03.013.
- Salomone, A., Palamar, J. J., Gerace, E., Di Corcia, D., y Vincenti, M. (2017). Hair testing for drugs of abuse and new psychoactive substances in a high-risk population. *J. Anal. Toxicol.* 41, 376-381. doi: 10.1093/jat/bkx020.
- Sandtner, W., Stockner, T., Hasenhuetl, P. S., Partilla, J. S., Seddik, A., Zhang, Y. W., et al. (2016). Binding mode selection determines the action of ecstasy homologs at monoamine transporters. *Mol. Pharmacol.* 89, 165-175. doi: 10.1124/mol.115.101394.
- Schifano, F., Di Furia, L., Forza, G., Minicuci, N., y Bricolo, R. (1998). MDMA ('ecstasy') consumption in the context of polydrug abuse: A report on 150 patients. *Drug Alcohol Depend.* 52, 85-90. doi: 10.1016/S0376-8716(98)00051-9.
- Schifano, F., Napoletano, F., Arillotta, D., Zangani, C., Gilgar, L., Guirguis, A., et al. (2020). The clinical challenges of synthetic cathinones. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 86, 410-419. doi: 10.1111/bcp.14132.
- Schindler, C. W., Thorndike, E. B., Goldberg, S. R., Lehner, K. R., Cozzi, N. V., Brandt, S. D., et al. (2016). Reinforcing and neurochemical effects of the "bath salts" constituents 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and 3,4-methylenedioxy-N-methylcathinone (methydone) in male rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 233, 1981-1990. doi: 10.1007/s00213-015-4057-0.
- Schmid, Y., Vizeli, P., Hysek, C. M., Prestin, K., Meyer Zu Schwabedissen, H. E., y Liechti, M. E. (2016). CYP2D6 function moderates the pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylene-dioxymethamphetamine in a

- controlled study in healthy individuals. *Pharmacogenet. Genomics* 26, 397-401. doi: 10.1097/FPC.0000000000000231.
- Segura, M., Ortun, J., Mclure, J. A., Roset, P. N., Segura, J., y Torre, R. De (2001). 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A Major in Metabolite in Humans. *Synthesis (Stuttg.)*, 1203-1208.
- Segura, M., Pichini, S., Peir, A. M., Roset, P. N., Pacifici, R., Zuccaro, P., et al. (2005). Contribution of Cytochrome P450 2D6 to 3,4-Disposition in Humans Use of Paroxetine as a Metabolic Inhibitor Probe. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 649-660.
- Sessa, B., Higbed, L., y Nutt, D. (2019). A review of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-assisted psychotherapy. *Front. Psychiatry* 10, 1-7. doi: 10.3389/fpsy.2019.00138.
- Shimomura, E. T., Briones, A. J., Warren, W. S., Addison, J. W., Knittel, J. L., Shoemaker, S. A., et al. (2016). Case report of methylone, oxymorphone and ethanol in a fatality case with tissue distribution. *J. Anal. Toxicol.* 40, 543-545. doi: 10.1093/jat/bkw045.
- Silber, B. Y., Croft, R. J., Papafotiou, K., y Stough, C. (2006). The acute effects of d-amphetamine and methamphetamine on attention and psychomotor performance. *Psychopharmacology (Berl)*. 187, 154-169. doi: 10.1007/s00213-006-0410-7.
- Simmler, L. D., Buser, T. A., Donzelli, M., Schramm, Y., Dieu, L. H., Huwyler, J., et al. (2013). Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 168, 458-470. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02145.x.
- Simmler, L. D., Rickli, A., Hoener, M. C., y Liechti, M. E. (2014). Monoamine transporter and receptor interaction profiles of a new series of designer cathinones. *Neuropharmacology* 79, 152-160. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.008.

- Sogawa, C., Sogawa, N., Ohya, K., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Sora, I., et al. (2011). Methylone and Monoamine Transporters: Correlation with Toxicity. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 58-62. doi: 10.2174/157015911795017425.
- Štefková, K., Židková, M., Horsley, R. R., Pinterová, N., Šíchová, K., Uttl, L., et al. (2017). Pharmacokinetic, ambulatory, and hyperthermic effects of 3,4-methylenedioxy-n-methylcathinone (Methylone) in rats. *Front. Psychiatry* 8, 1-11. doi: 10.3389/fpsyt.2017.00232.
- Steuer, A. E., Schmidhauser, C., Tingelhoff, E. H., Schmid, Y., Rickli, A., Kraemer, T., et al. (2016). Impact of cytochrome P450 2D6 function on the chiral blood plasma pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its Phase I and II metabolites in humans. *PLoS One* 11, 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0150955.
- Studerus, E., Vizeli, P., Harder, S., Ley, L., y Liechti, M. E. (2021). Prediction of MDMA response in healthy humans: a pooled analysis of placebo-controlled studies. *J. Psychopharmacol.* 35, 556-565. doi: 10.1177/0269881121998322.
- Suplicy, H., Boguszewski, C. L., Dos Santos, C. M. C., Do Desterro De Figueiredo, M., Cunha, D. R., y Radominski, R. (2014). A comparative study of five centrally acting drugs on the pharmacological treatment of obesity. *Int. J. Obes.* 38, 1097-1103. doi: 10.1038/ijo.2013.225.
- Therapeutic Goods Administration (2023). Notice of final decision to not amend the current Poisons Standard in relation to psilocybin and MDMA. Disponible en: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/2023-02/notice-of-final-decision-to-amend-or-not-amend-the-current-poisons-standard-june-2022-acms-38-psilocybine-and-mdma.pdf>. Consultado el 30/03/2023.
- Toennes, S. W., Harder, S., Schramm, M., Niess, C., y Kauert, G. F. (2003). Pharmacokinetics of cathinone, cathine and norephedrine after the chewing

- of khat leaves. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56, 125-130. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.01834.x.
- Toennes, S. W., y Kauert, G. F. (2002). Excretion and detection of cathinone, cathine, and phenylpropanolamine in urine after khat chewing. *Clin. Chem.* 48, 1715-1719. doi: 10.1093/clinchem/48.10.1715.
- U.S. Drug Enforcement Administration Diversion Control Division (2014). National Forensic Laboratory Information System: Year 2013 Annual Report. Disponible en: https://nida.nih.gov/sites/default/files/2013_Annual_Report.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- U.S. Drug Enforcement Administration Diversion Control Division (2015). National Forensic Laboratory Information System: Year 2014 Annual Report. Disponible en: https://nida.nih.gov/sites/default/files/Year_2014_Annual_Report.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- U.S. Drug Enforcement Administration Diversion Control Division (2016). Special Report: Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones Reported in NFLIS, 2013–2015. Disponible en: https://nida.nih.gov/sites/default/files/Year_2014_Annual_Report.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- United Nations (1961). Single convention on narcotic drugs, 1961.
- United Nations (1971). Convention on Psychotropic Substances, 1971.
- United Nations (2015). The international drug control conventions: Schedules of the convention on psychotropic substances of 1971, as at 4 November 2015. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/Int_Drug_Control_Conventions/1971_Schedules/Revision1_2015/ST_CND_1_ADD2_Rev1_e_V1600359.pdf. Consultado el 30/03/2023.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2013). Informe Mundial sobre las Drogas 2013. Oficina de publicación de las Naciones Unidas Disponible en: https://www.unodc.org/doc/wdr2013/World_Drug_Report_

2013_Spanish.pdf. Consultado el 30/03/2023.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2022). World Drug Report 2022: Drug Market Trends Cocaine, Amphetamine-Type Stimulants, New Psychoactive Substances. United Nations publication.

Valente, M. J., Guedes De Pinho, P., De Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., Carvalho, M., João, M., et al. (2014). Khat and synthetic cathinones: A review. *Arch. Toxicol.* 88, 15-45. doi: 10.1007/s00204-013-1163-9.

Vandewater, S. A., Creehan, K. M., y Taffe, M. A. (2015). Intravenous self-administration of entactogen-class stimulants in male rats. *Neuropharmacology* 99, 538-545. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.030.

Vizeli, P., Schmid, Y., Prestin, K., Meyer zu Schwabedissen, H. E., y Liechti, M. E. (2017). Pharmacogenetics of ecstasy: CYP1A2, CYP2C19, and CYP2B6 polymorphisms moderate pharmacokinetics of MDMA in healthy subjects. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27, 232-238. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.01.008.

Warner-Schmidt, J., Pittenger, C., Stogniew, M., Mandell, B., Olmstead, S. J., y Kelmendi, B. (2023). Methylone, a rapid acting entactogen with robust anxiolytic and antidepressant-like activity. *Front. Psychiatry* 13, 1-13. doi: 10.3389/fpsy.2022.1041277.

Warrick, B. J., Wilson, J., Hedge, M., Freeman, S., Leonard, K., y Aaron, C. (2012). Lethal Serotonin Syndrome After Methylone and Butylone Ingestion. *J. Med. Toxicol.* 8, 65-68. doi: 10.1007/s13181-011-0199-6.

Watterson, L. R., Hood, L., Sewalia, K., Tomek, S. E., Yahn, S., Johnson, C. T., et al. (2012). The Reinforcing and Rewarding Effects of Methylone, a Synthetic Cathinone Commonly Found in "Bath Salts". *J. Addict. Res. Ther.* doi: 10.4172/2155-6105.S9-002.The.

Watterson, L. R., y Olive, M. F. (2014). Synthetic Cathinones and Their Rewarding

- and Reinforcing Effects in Rodents. *Adv. Neurosci.* 2014, 1-9. doi: 10.1155/2014/209875.
- Widler, P., Mathys, K., Brenneisen, R., Kalix, P., y Fisch, H. (1994). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of khat: A controlled study. *Clin Pharmacol Ther* 55, 556-62.
- Wilkes, S. (2008). The use of bupropion SR in cigarette smoking cessation. *Int. J. COPD* 3, 45-53. doi: 10.2147/copd.s1121.
- World Health Organization (WHO) (2006). Assessment of khat (*Catha edulis* Forsk).
- World Health Organization (WHO) (2014). Methylone (bk - MDMA). Critical Review Report. Geneva.
- Zaami, S., Giorgetti, R., Pichini, S., Pantano, F., Marinelli, E., y Busardò, F. P. (2018). Synthetic cathinones related fatalities: An update. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 268-274. doi: 10.26355/eurrev-201801-14129.
- Zangani, C., Schifano, F., Napoletano, F., Arillotta, D., Gilgar, L., Guirguis, A., et al. (2020). The e-Psychonauts' «Spiced» World; Assessment of the Synthetic Cannabinoids' Information Available Online. *Curr. Neuropharmacol.* 18, 966-1051. doi: 10.2174/1570159X18666200302125146.

9. ANEXO

9 ANEXO

9.1 Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans. Supplementary material

Poyatos, L., Pérez-Mañá, C., Hladun, O., Núñez-Montero, M., de la Rosa, G., Martín, S., Barriocanal, A. M., Carabias, L., Kelmendi, B., Taoussi, O., Busardò, F. P., Fonseca, F., Torrens, M., Pichini, S., Farré, M., & Papaseit, E. (2023). Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans. *Frontiers in pharmacology*, *14* (February), 1122861. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1122861>

Supplementary Material

Pharmacological effects of methylone and MDMA in humans

Lourdes Poyatos^{1,2}, Clara Pérez-Mañá^{1,2*}, Olga Hladun^{1,2}, Melani Núñez-Montero^{1,2}, Georgina de la Rosa^{1,2}, Soraya Martín¹, Ana Maria Barriocanal¹, Lydia Carabias³, Benjamin Kelmendi⁴, Omayema Taoussi⁵, Francesco Paolo Busardò⁵, Francina Fonseca^{6,7}, Marta Torrens^{7,8}, Simona Pichini⁹, Magí Farré^{1,2*†}, Esther Papaseit^{1,2†}

* **Correspondence:** Clara Pérez-Mañá: cperezm.mn.ics@gencat.cat; Magí Farré: mfarre.germanstrias@gencat.cat

Supplementary Table 1. Summary of results (n=17; mean ± standard deviation) of AUC and time-course on physiological measures, subjective effects, and psychomotor performance with statistically significant differences between the three administered conditions (methylone 200 mg, MDMA 100 mg and placebo).

		Methylone	MDMA	Placebo	ANOVA	Tukey	
		Multiple comparison-Tukey			F	p	
Physiological effects							
Systolic blood pressure	AUC _{0-6h} (mmHg·h)	69.70 ± 33.70	52.80 ± 50.29	-25.44 ± 24.86	29.117	<0.001	B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{B,C} , 2 ^{B,C} , 3 ^{B,C} , 4 ^{B,c} , 6 ^{B,c}			16.337	<0.001	
Diastolic blood pressure	AUC _{0-6h} (mmHg·h)	13.10 ± 36.27	19.07 ± 28.77	-3.38 ± 23.35	2.574	0.092	NS
	T-C	0.75 ^{B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{B,C} , 2 ^{B,C}			6.465	<0.001	
Heart rate	AUC _{0-6h} (bpm·h)	84.21 ± 63.74	62.72 ± 63.39	0.22 ± 33.86	12.423	<0.001	B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{B,C} , 2 ^{B,C} , 3 ^{B,C} , 4 ^{B,C} , 6 ^B , 8 ^{A,B} , 10 ^b			10.237	<0.001	
Temperature	AUC _{0-6h} (°C·h)	1.13 ± 0.92	0.74 ± 1.09	0.59 ± 1.37	1.347	0.274	NS
	T-C	1.5 ^b , 2 ^{a,B} , 3 ^B , 4 ^b			1.700	0.027	
Pupil diameter	AUC _{0-6h} (mm·h)	4.88 ± 2.71	10.78 ± 4.74	-0.67 ± 1.20	53.766	<0.001	A,B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{B,C} , 1 ^{A,B,C} , 1.5 ^{A,B,C} , 2 ^{A,B,C} , 3 ^{A,B,C} , 4 ^{A,B,C} , 6 ^{A,C} , 8 ^{a,C}			28.883	<0.001	
Visual Analog Scales (VAS)							
Intensity	AUC _{0-6h} (mm·h)	45.09 ± 29.76	69.01 ± 53.98	0.68 ± 2.45	16.204	<0.001	B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{a,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{A,B,C} , 2 ^{A,C} , 2.5 ^{A,C}			13.507	<0.001	

Stimulated	AUC _{0-6h} (mm·h)	46.75 ± 33.31	68.51 ± 57.73	0.71 ± 2.31	13.284	<0.001	B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{A,B,C} , 2 ^{A,C} , 2.5 ^c			11.995	<0.001	
High	AUC _{0-6h} (mm·h)	53.69 ± 38.95	79.14 ± 61.58	0.51 ± 2.03	16.768	<0.001	B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{A,B,C} , 2 ^{A,b,C} , 2.5 ^{A,C}			13.970	<0.001	
Good effects	AUC _{0-6h} (mm·h)	60.04 ± 44.29	83.42 ± 70.58	0.63 ± 2.48	16.763	<0.001	B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{a,B,C} , 2 ^{A,B,C} , 2.5 ^{A,C} , 3 ^c			13.078	<0.001	
Bad effects	AUC _{0-6h} (mm·h)	2.18 ± 4.62	11.38 ± 24.81	0	3.441	0.044	c
	T-C	1 ^c , 2 ^{A,C}			1.612	0.036	
Liking	AUC _{0-6h} (mm·h)	59.73 ± 42.59	83.91 ± 69.81	0.94 ± 3.79	16.198	<0.001	B,C
	T-C	0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{A,B,C} , 2 ^{A,b,C} , 2.5 ^{A,C}			12.748	<0.001	
Change in distances	AUC _{0-6h} (mm·h)	3.80 ± 7.82	24.16 ± 39.58	0	5.207	0.011	a,c
	T-C	0.75 ^{a,C} , 1 ^{A,C} , 1.5 ^{A,C}			3.913	<0.001	
Change in colors	AUC _{0-6h} (mm·h)	4.24 ± 9.79	11.42 ± 31.99	0	1.789	0.183	NS
	T-C	0.75 ^{A,B} , 1 ^{a,C} , 1.5 ^C			2.097	0.003	
Change in shapes	AUC _{0-6h} (mm·h)	1.21 ± 3.45	10.46 ± 28.70	0	1.967	0.156	NS
	T-C	1 ^C , 1.5 ^{A,C} , 2 ^{a,c}			2.147	0.002	
Changes in lights	AUC _{0-6h} (mm·h)	7.18 ± 15.39	19.38 ± 30.52	0.26 ± 1.09	4.443	0.020	c
	T-C	0.75 ^{a,B,c} , 1 ^{A,B,C} , 1.5 ^{A,C} , 2 ^c			4.404	<0.001	
Drowsiness	AUC _{0-6h} (mm·h)	29.56 ± 55.45	39.23 ± 65.39	6.43 ± 16.80	3.067	0.060	NS
	T-C	1.5 ^c , 2 ^{a,C} , 3 ^{B,C}			2.020	0.005	
Focused	AUC _{0-6h} (mm·h)	14.25 ± 18.39	16.65 ± 25.09	0.64 ± 2.64	4.505	0.019	c
	T-C	0.75 ^{A,B} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{b,C} , 2 ^{A,C}			4.230	<0.001	
Dizziness	AUC _{0-6h} (mm·h)	8.65 ± 16.87	23.21 ± 21.85	0	10.019	<0.001	a,C
	T-C	0.5 ^b , 0.75 ^{b,C} , 1 ^{A,C} , 1.5 ^{A,C} , 2 ^C			5.489	<0.001	
Confusion	AUC _{0-6h} (mm·h)	11.12 ± 27.81	19.99 ± 28.09	0	4.126	0.025	c
	T-C	0.75 ^{B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^C , 2 ^{A,C}			2.714	<0.001	
Different body	AUC _{0-6h}	26.49 ± 29.94	42.92 ± 58.24	0.46 ± 1.73	6.274	0.005	C

feeling	(mm·h)						
	T-C		0.5 ^{a,B} , 0.75 ^{B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{A,b,C} , 2 ^c		5.258	<0.001	
Different surroundings	AUC _{0-6h} (mm·h)	7.23 ± 15.48	19.48 ± 40.01	0	2.848	0.073	NS
	T-C		0.75 ^B , 1 ^{b,C} , 1.5 ^{A,C} , 2 ^{a,c}		2.752	<0.001	
Open	AUC _{0-6h} (mm·h)	53.15 ± 52.11	58.68 ± 53.04	1.00 ± 4.12	10.541	<0.001	B,C
	T-C		0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{A,B,C} , 2 ^{a,b,C}		10.064	<0.001	
Trust	AUC _{0-6h} (mm·h)	49.95 ± 48.39	54.00 ± 57.62	0.99 ± 4.06	8.371	0.001	B,C
	T-C		0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{B,C} , 2 ^{b,C}		6.653	<0.001	
Feeling close to others	AUC _{0-6h} (mm·h)	48.72 ± 50.52	58.08 ± 66.11	1.03 ± 4.24	7.655	0.002	b,C
	T-C		0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{a,B,C} , 2 ^{b,C} , 3 ^c		7.248	<0.001	
I want to be with other people	AUC _{0-6h} (mm·h)	63.41 ± 65.55	84.29 ± 99.55	1.03 ± 4.24	8.090	0.001	b,C
	T-C		0.5 ^{A,B} , 0.75 ^{A,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{B,C} , 2 ^{A,B,C} , 3 ^c		9.029	<0.001	
I want to hug someone	AUC _{0-6h} (mm·h)	52.13 ± 70.86	61.43 ± 74.37	0.69 ± 2.85	6.981	0.003	b,C
	T-C		0.5 ^{a,b} , 0.75 ^{a,B,C} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{B,C} , 2 ^{B,C} , 3 ^c		5.605	<0.001	
SDRQ questionnaire							
How pleasant was the substance	AUC _{0-10h} (score·h)	12.65 ± 6.87	11.47 ± 7.24	1.18 ± 3.76	22.501	<0.001	B,C
	T-C		1 ^{B,C}		22.501	<0.001	
How much you wanted to use it in that moment	AUC _{0-10h} (score·h)	11.74 ± 7.02	8.53 ± 7.86	0.88 ± 3.64	14.970	<0.001	B,C
	T-C		1 ^{a,B,C}		15.064	<0.001	
ARCI inventory							
ARCI PCAG	AUC _{0-6h} (score·h)	3.21 ± 9.49	7.03 ± 9.50	0.41 ± 2.69	4.684	0.016	c
	T-C		1 ^A , 2 ^{A,C} , 3 ^C , 4 ^{b,c}		2.844	0.001	
ARCI MBG	AUC _{0-6h} (score·h)	12.41 ± 9.91	16.71 ± 13.95	0.85 ± 3.27	13.912	<0.001	B,C
	T-C		1 ^{B,C} , 2 ^{a,B,C} , 3 ^{A,C}		12.525	<0.001	
ARCI LSD	AUC _{0-6h} (score·h)	1.50 ± 3.03	2.38 ± 4.24	-0.68 ± 1.31	6.309	0.005	C
	T-C		1 ^{B,C}		7.280	<0.001	
ARCI BG	AUC _{0-6h} (score·h)	3.47 ± 5.56	1.76 ± 6.79	1.12 ± 3.01	1.260	0.297	NS
	T-C		1 ^{A,B} , 2 ^{A,B}		5.377	<0.001	

ARCI A	AUC _{0-6h} (score·h)	6.59 ± 4.80	9.97 ± 7.75	0.85 ± 1.92	13.575	<0.001	B,C
	T-C		1 ^{B,C} , 2 ^{a,B,C} , 3 ^{A,C}		12.022	<0.001	
VESSPA questionnaire							
VESSPA S	AUC _{0-6h} (score·h)	1.31 ± 1.95	2.33 ± 2.81	0.11 ± 0.26	5.671	0.008	C
	T-C		1 ^{A,C} , 2 ^{a,b,C} , 3 ^{b,C}		4.236	<0.001	
VESSPA ANX	AUC _{0-6h} (score·h)	4.33 ± 3.56	4.35 ± 2.87	0.39 ± 1.10	14.733	<0.001	B,C
	T-C		1 ^{A,B,C} , 2 ^{B,C} , 3 ^{B,C} , 4 ^{b,C}		12.397	<0.001	
VESSPA CP	AUC _{0-6h} (score·h)	0.07 ± 0.17	0.41 ± 0.66	0	5.467	0.009	a,c
	T-C		1 ^{A,C}		5.442	<0.001	
VESSPA SOC	AUC _{0-6h} (score·h)	2.83 ± 2.54	3.75 ± 3.45	0.18 ± 0.65	11.333	<0.001	B,C
	T-C		1 ^{B,C} , 2 ^{a,B,C} , 3 ^{A,C}		9.584	<0.001	
VESSPA ACT	AUC _{0-6h} (score·h)	2.72 ± 2.40	3.12 ± 2.98	0.20 ± 0.81	9.083	0.001	B,C
	T-C		1 ^{B,C} , 2 ^{B,C} , 3 ^C		10.524	<0.001	
VESSPA PS	AUC _{0-6h} (score·h)	0.43 ± 0.72	0.73 ± 1.39	0.04 ± 0.16	3.580	0.040	c
	T-C		1 ^{B,C} , 2 ^C , 3 ^c		3.014	<0.001	
Psychomotor performance							
Mean reaction time	AUC _{0-2h} (ms·h)	-16.73 ± 38.83	41.79 ± 68.89	27.59 ± 38.85	8.040	0.001	A,b
	T-C		1 ^{A,B} , 2 ^{A,B}		4.269	0.004	
Maddox wing	AUC _{0-6h} (diopter·h)	-2.17 ± 5.92	-4.60 ± 5.21	0.26 ± 1.23	6.022	0.006	C
	T-C		0.75 ^{B,c} , 1 ^{B,C} , 1.5 ^{B,C} , 2 ^{A,B,C} , 3 ^{A,C} , 4 ^c		4.606	<0.001	

Abbreviations: T-C (time course), ARCI PCAG (sedation), MBG (euphoria), BG (intellectual efficiency), and A (amphetamine-like effects), VESSPA-SSE S (sedation), ANX (psychosomatic anxiety), CP (changes in perception), SOC (pleasure and sociability), ACT (activity and energy), and PS (psychotic symptoms), ms (milliseconds). AUC is area under the curve, expressed as mean ± standard deviation. Differences among AUC were calculated with a one-way ANOVA (degrees of freedom 2 and 32 for all variables) and post-hoc Tukey's multiple comparisons test. Differences among time course (0-10 h) were calculated with two-way ANOVA and post-hoc Tukey's multiple comparisons test. The degrees of freedom were 2 and 352 for physiological effects, 2 and 384 for VAS "intensity (any effect)", "stimulated", "high", "good effects", "bad effects", and "liking", 2 and 352 for the rest of VAS, 2 and 64 for SDRQ and psychomotor performance, and 2 and 224 for ARCI and VESSPA. Statistical differences in AUC and time course between conditions are indicated as: "a" (p<0.05) or "A" (p<0.01) for methylone vs MDMA, "b" (p<0.05) or "B" (p<0.01) for methylone vs placebo, "c" (p<0.05) or "C" (p<0.01) for MDMA vs placebo.

9.2 A comparison of acute pharmacological effects of methylone and MDMA administration in humans and oral fluid concentrations as biomarkers of exposure

Poyatos, L., Papaseit, E., Olesti, E., Pérez-Mañá, C., Ventura, M., Carbón, X., Grifell, M., Fonseca, F., Torrens, M., de la Torre, R., & Farré, M. (2021). A comparison of acute pharmacological effects of methylone and MDMA administration in humans and oral fluid concentrations as biomarkers of exposure. *Biology*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/biology10080788>

Article

A Comparison of Acute Pharmacological Effects of Methylone and MDMA Administration in Humans and Oral Fluid Concentrations as Biomarkers of Exposure

Lourdes Poyatos ^{1,2,†}, Esther Papaseit ^{1,2,*,†}, Eulalia Olesti ^{3,4,†}, Clara Pérez-Mañá ^{1,2,†}, Mireia Ventura ^{5,†}, Xoán Carbón ⁵, Marc Grifell ^{5,6,7}, Francina Fonseca ^{6,7}, Marta Torrens ^{6,7,†}, Rafael de la Torre ^{3,4,†} and Magí Farré ^{1,2,†}

- ¹ Department of Clinical Pharmacology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (HUGTIP-IGTP), 08916 Badalona, Spain; lpoyatos@igtp.cat (L.P.); cperezmn.mn.ics@gencat.cat (C.P.-M.); mfarre.germanstrias@gencat.cat (M.F.)
 - ² Department of Pharmacology, Therapeutics and Toxicology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Cerdanyola del Vallés, Spain
 - ³ Integrative Pharmacology and Systems Neuroscience Research Group, Neurosciences Research Program, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), 08003 Barcelona, Spain; eulaliaom@gmail.com (E.O.); rtorre@imim.es (R.d.l.T.)
 - ⁴ Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), 08003 Barcelona, Spain
 - ⁵ Energy Control, Associació Benestar i Desenvolupament, 08041 Barcelona, Spain; mireia@energycontrol.org (M.V.); nps@energycontrol.org (X.C.); maregrifellguardia@gmail.com (M.G.)
 - ⁶ Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Cerdanyola del Vallés, Spain; mffonseca@parcdesalutmar.cat (F.F.); mtorrens@parcdesalutmar.cat (M.T.)
 - ⁷ Institut de Neuropsiquiatria i Adiccions (INAD), Parc de Salut Mar, 08003 Barcelona, Spain
- * Correspondence: epapaseit.germanstrias@gencat.cat
† These authors share first authorship.
‡ These authors share last authorship.



Citation: Poyatos, L.; Papaseit, E.; Olesti, E.; Pérez-Mañá, C.; Ventura, M.; Carbón, X.; Grifell, M.; Fonseca, F.; Torrens, M.; de la Torre, R.; et al. A Comparison of Acute Pharmacological Effects of Methylone and MDMA Administration in Humans and Oral Fluid Concentrations as Biomarkers of Exposure. *Biology* **2021**, *10*, 788. <https://doi.org/10.3390/biology10080788>

Academic Editor: Sergio Scaccianoce

Received: 22 July 2021

Accepted: 14 August 2021

Published: 17 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Methylone is a synthetic cathinone that is usually used as a substitute for conventional psychostimulants, such as MDMA. Chemically, methylone is considered the β -keto analogue of MDMA, with which it presumably shares similar pharmacological effects. To date, the available data about the human pharmacology of methylone in humans are very scarce and are mainly derived from user experiences, published in internet forums or intoxication reports. Thus, an observational–naturalistic study was conducted to evaluate the acute pharmacological effects and determine biomarkers of exposure in oral fluid of methylone after oral self-administration in comparison to MDMA. Methylone induced the prototypical psychostimulant and empathogenic effects commonly associated with MDMA, although they were of lower intensity. Oral fluid concentrations of methylone can be considered a suitable biomarker of acute exposure, and oral fluid has been proven to be a useful biological matrix of detection.

Abstract: Considered the β -keto analogue of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy), 3,4-Methylenedioxymethcathinone (methylone) is a synthetic cathinone. Over the years, methylone has been used as a substitute for conventional psychostimulants, such as MDMA. To date, little is known about the human pharmacology of methylone; the only available information has been provided by surveys or published intoxication reports. In the present observational–naturalistic study, we evaluate the acute subjective and physiological effects of methylone after oral self-administration in comparison to MDMA in healthy poly-drug users. Fourteen participants (10 males, 4 females) selected their single oral doses of methylone from 100 to 300 mg ($n = 8$, mean dose 187.5 mg) or MDMA from 75 to 100 mg ($n = 6$, mean dose 87.5 mg) based on their experience. Study variables were assessed at 0, 1, 2, and 4 h (h) and included vital signs (non-invasive blood pressure, heart rate, cutaneous temperature) and subjective effects using visual analogue scales (VAS), the 49-item Addiction Research Centre Inventory (ARCI) short form, and the Evaluation of the Subjective Effects

of Substances with Abuse Potential (VESSPA-SSE) questionnaire. Additionally, oral fluid concentrations of methylone and MDMA were determined. Acute pharmacological effects produced by methylone followed the prototypical psychostimulant and empathogenic profile associated with MDMA, although they were less intense. Methylone concentrations in oral fluid can be considered a useful biomarker to detect acute exposure in oral fluid. Oral fluid concentrations of MDMA and methylone peaked at 2 h and concentrations of MDMA were in the range of those previously described in controlled studies. Our results demonstrate that the potential abuse liability of methylone is similar to that of MDMA in recreational subjects.

Keywords: methylone (3,4-methylenedioxymethcathinone); MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine); new psychoactive substances (NPS); synthetic cathinones; bath salts; psychostimulants

1. Introduction

Over the last few years, new psychoactive substances (NPS) have become a trend among substance users seeking non-illegal alternatives to classical illicit drugs. For this reason, these substances are also known as “legal highs”, although, in the market, they are also advertised as bath salts, plant foods, or fertilizer, and are labelled as “not for human consumption” to bypass regulations [1,2]. For the first time, in 2019, synthetic cathinones were one of the most frequently reported groups of NPS to the European Union Early Warning System according to the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) [3]. These synthetic substances are chemically related to cathinone, a compound with psychostimulant effects, found in the khat plant (*Catha edulis*) [4,5]. In the last decade, numerous new synthetic cathinone derivatives have emerged given the high dynamism of the NPS market. Some of the most well-known derivatives are methylone (3,4-methylenedioxymethcathinone), mephedrone (4-methylmethcathinone), and MDPV (3,4-methylenedioxypropylone).

Methylone, also known as MDMC, M1, and bk-MDMA, is a ring-substitute β -keto analogue of the well-known 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) [6]. Since its first appearance as a “room odorizer” in smartshops, methylone gained popularity as a substitute for the traditional MDMA [7]. Methylone resembles MDMA in its mechanism of action, as methylone acts on the monoaminergic system, inducing the reversal or inhibiting the activity of monoamine reuptake transporters. These actions on the monoaminergic system result in increased extracellular brain levels of monoamines, such as dopamine, norepinephrine, and, mainly, serotonin [8–12]. In this area, there are some discrepancies regarding the potency of its effects on the monoaminergic transporters. Results from an in vitro study suggested that methylone had a selectivity comparable to that of mephedrone and MDMA but displayed a lower potency on transporter-mediated release [8]. Another study concluded that methylone was the most potent serotonin and dopamine uptake inhibitor compared to mephedrone and butylone [13]. Methylone and other cathinones, such as mephedrone, butylone, and ethylone, act as nonselective monoamine uptake inhibitors, similar to cocaine, and have effects on serotonin release similar to MDMA [14]. In general, methylone acts on monoaminergic transporters with potency and selectivity comparable to that of MDMA [8]. Methylone and other cathinones also can activate 5-HT_{2A} receptors and increase extracellular dopamine [13].

Methylone is metabolized in the liver, principally by the enzymatic activity of CYP2D6, located in cytochrome P450, with a limited contribution of CYP1A2, CYP2B6, and CYP2C19 [15]. Similarly to MDMA, its metabolism results in the formation of O-demethylated metabolites (HHMC, 3,4-methylenedioxy-N-methylcathinone; HMMC, 4-hydroxy-3-methoxy-Nmethylcathinone) and an N-demethylated metabolite (MDC, 3,4-methylenedioxycathinone) [16,17]. The activity of methylone seems to be related to brain concentrations of methylone and MDC but not its hydroxylated metabolites [18].

Whereas MDMA is the fourth most commonly used recreative substance worldwide according to the UNODC, information about methylone prevalence is scarce. Globally, an estimate of 20.5 million people reported use of MDMA in the last year in 2018 [19]. In the European Union, approximately 2.7 million people aged 15–64 were estimated to have used MDMA in the previous year [3]. On the other hand, the use of methylone as an adulterant and its rebranding as other psychostimulant substances hinder the determination of its prevalence of use, since this unintentional use is not reflected in surveys [20,21]. Most of the information regarding the prevalence of the use of methylone comes from seizure data or reported intoxications. According to the National Forensic Laboratory Information System (NFLIS) data, methylone was the most reported synthetic cathinone (33.35%) in the USA between 2013 and 2015 [22].

Similarly to other synthetic cathinones, methylone can be administered via different routes, including oral, intranasal (insufflation), intravenous, sublingual, and rectal administration. The most common route is oral consumption of tablets or pills containing methylone. In accordance with recreative drug user reports, doses up to 100 mg are considered to be low, doses from 100 mg to 200 mg are moderate, and doses above 200 mg are considered to be high. After oral administration of methylone, users described the onset of effects at 15–60 min after administration, with peak effects occurring at 60–90 min and a total duration of effects of 3–5 h [23]. A frequent pattern of use, also similar to other cathinones, is to firstly administer a large dose followed by smaller re-doses in order to extend the effects [23,24].

According to user reports, methylone also displays a similar but milder range of effects compared to MDMA that encompasses stimulation, calm euphoria, a sense of well-being and happiness, alertness, reduced fatigue, heightened empathy, and entactogenic effects (sense of oneness) [25,26]. Among the published cases of intoxication involving methylone [27–32], a patient that visited the emergency department after using 1.0–1.5 g of methylone presented vomiting, palpitations, agitation, sweating, paresthesia, muscle twitching, tremors, and vertigo [33]. Other adverse effects associated with methylone intoxication are hyperthermia, anxiety, seizures, psychosis, hallucinations, and suicidal ideation [6].

Oral fluid concentrations of amphetamine derivatives are considered a suitable biomarker for the detection of their acute use, and they have been useful in cases of intoxication and driving under the influence of substances [34,35]. In the case of MDMA, there is evidence of a correlation between the oral fluid and blood concentrations [36,37]. However, there are no previous reports evaluating the possible usefulness of methylone oral fluid concentrations as a biomarker of acute exposure.

To date, little is known about the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of methylone in humans. The purpose of our observational study was to assess the acute pharmacological effects and oral fluid concentrations of methylone as a biomarker of exposure in recreational users after oral administration in a naturalistic environment. The subjective and physiological effects and oral fluid concentrations of methylone are compared to those of its non- β -analogue MDMA, which was also administered in similar conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Participants

Fourteen healthy volunteers were included (10 males and 4 females). The subjects were recreative drug users that had previous experience with MDMA and/or synthetic cathinones at least once in their lifetime. Exclusion criteria included a history of any serious medical or mental disorder, including substance use disorder (except nicotine), serious adverse reactions to MDMA and/or synthetic cathinones, and use of chronic medication.

Participants were recruited by word-of-mouth through Energy Control. The protocol of this study was approved by the Parc de Salut Mar Clinical Research Ethics Committee (ref. 2016/6700/I). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Spanish legislation. All participants were fully informed of the purpose and procedures

of the study and they were provided with a written informed consent form before enrolling in the study.

2.2. Design and Treatments

The study was designed as a non-controlled prospective observational study in a naturalistic setting with methylone and MDMA self-administration. The methodology, including procedures and evaluations, coincides with previous observational–naturalistic studies aimed at evaluating the acute effects of other NPS [38–40]. Six subjects (5 M, 1 F) self-administered MDMA and 8 subjects (5 M, 3 F) self-administered methylone. Each subject participated only in one session. Participants brought their own substance obtained from an unknown source, which was tested by Energy Control, a harm reduction organization that provides a drug checking service to drug users. Pills containing methylone and MDMA were analyzed by gas chromatography associated with mass spectrometry (GC/MS), a technique that traces the presence of the most frequent drugs of abuse, such as MDMA, cocaine, heroin, amphetamine and methamphetamine, LSD, and multiple NPS (methylone, mephedrone, and other synthetic cathinones, synthetic cannabinoids, tryptamines, among others). The testing of the pills showed a more than 95% purity of methylone and MDMA, as well as the absence of toxic components or adulterants [38–40].

In both sessions, participants selected the dose of methylone or MDMA according to their previous drug use experience. Doses of methylone could be selected from a range (75–300 mg) that was previously defined according to the consulted literature [23]. The WHO Expert Committee on Drug Dependence (Thirty-Sixth Meeting, Geneva, Switzerland, 16–20 June 2014) established that 60 mg of methylone was the threshold dose and doses over 250 mg were often related to very strong activity [23]. Some users have reported uses of 300 mg of methylone as a common dose [www.erowid.org] (accessed on 15 June 2021). The mean of the selected doses of MDMA was 87.50 mg (3 subjects ingested 75 mg (2 males and 1 female), 3 males 100 mg). In the other study session, methylone doses ranged from 100 to 300 mg, with a mean of 187.50 mg. Based on their dose selection, 1 male ingested 100 mg, 2 subjects 150 mg (1 male and 1 female), 4 subjects 200 mg (2 males and 2 females), and 1 male 300 mg.

2.3. Procedures

Sessions were conducted in a private club closed to the public for the study, where participants were summoned at 15:00 h and stayed until the end of the session at 20:00 h. Upon arrival, urine samples were collected to detect the presence of any conventional drug (benzodiazepines, barbiturates, morphine, cocaine, amphetamines, methamphetamine, MDMA, marijuana, phencyclidine) with Instant-View, Multipanel 10 Test Drug Screen (Alfa Scientific Designs Inc., Poway, CA, USA). Subjects were not allowed to use any recreational drug 2 days prior to the session or consume alcohol and caffeinated beverages in the previous 24 h. Participants received instructions and training on the procedures and questionnaires used throughout the sessions.

The sessions were conducted in a naturalistic setting. Participants were allowed to talk, read, listen to music, or play games, except during the evaluation times. However, they were asked to refrain from talking about the effects of the substance. All the subjects were evaluated simultaneously at baseline, 1, 2, and 4 h after administration of methylone or MDMA, which occurred approximately at 16:00 h. At each time point, evaluations were followed in a specific order: physiological effects, oral fluid collection, and subjective effects scales and questionnaires.

2.4. Physiological Effects

Non-invasive systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and heart rate (HR) were measured with subjects in the sitting position, using an automatic Omron monitor at baseline, 1, 2, and 4 h (h) after self-administration. Cutaneous temperature was determined at the same time points.

2.5. Subjective Effects

Subjective effects were evaluated at baseline, 1, 2, and 4 h after self-administration using visual analogue scales (VAS), the Addiction Research Center Inventory (ARCI), and the Evaluation of Subjective Effects of Substances with Abuse Potential questionnaire (VESSPA-SSE).

Visual analogue scales (100 mm, from “not at all” to “extremely”) contained 30 items that subjects were asked to rate, such as: intensity, stimulated, high, good effects, liking, happiness, drunkenness, changes in colors, changes in shapes, changes in lights, hallucinations (seeing lights or spots), hallucinations (seeing of animals), changes in hearing, hallucinations (hearing sounds or voices), different or changed body feeling, unreal body feeling, changes in distances, different surroundings, unreal surroundings, confusion, fear, depression or sadness, drowsiness, dizziness, bad effects, headache, sickness, vertigo, shortness of breath, and face flushing [38–40].

The standardized ARCI 49-item short form is a true/false questionnaire used to evaluate the subjective effects of drugs of abuse. This inventory includes five subscales that assess pentobarbital–chlorpromazine–alcohol-like effects (PCAG, sedation), morphine–benzedrine-like effects (MBG, euphoria), lysergic acid diethylamide-like effects (LSD, dysphoria), benzedrine-like effects (BG, intellectual efficiency), and amphetamine-like effects (A, increased energy) [38–40].

The VESSPA-SSE is a questionnaire sensitive to subjective effects related to stimulants such as MDMA that includes six subscales: sedation (S), psychosomatic anxiety (ANX), changes in perception (CP), pleasure and sociability (SOC), activity and energy (ACT), and psychotic symptoms (PS) [38–40].

2.6. Oral Concentrations

In both sessions, oral fluid samples were collected with Salivette to determine methylone and MDMA concentrations in oral fluid at baseline, 1 h, 2 h, and 4 h. All samples were centrifuged after collection and stored frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Methylone and MDMA oral fluid concentrations were quantified via liquid chromatography tandem–mass spectrometry (LC–MS/MS) [38–40].

2.7. Statistical Analysis

The determination of the sample size was based on the methodology of bioequivalence studies, which resulted in 5–6 subjects needed, considering an alpha risk of 0.05, a power of 80%, with a difference of at least 35% between MDMA to methylone in the intensity/high effect and with 20% of variability.

Vital signs (SBP, DBP, and HR) and subjective effects (VAS, ARCI, and VESSPA-SSE) were baseline-adjusted. Maximum effects and the time in which maximum effects appeared were determined, and the area under the curve ($\text{AUC}_{0-4\text{h}}$) was calculated with the trapezoidal rule.

For oral fluid concentrations of MDMA and methylone, only a descriptive analysis was presented showing main pharmacokinetics data such as the maximum concentration (C_{max}), the time required to reach maximum concentrations (T_{max}), and $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$. These parameters were calculated using the Pharmacokinetic Functions for Microsoft Excel (Joel Usansky, Atul Desai, and Diane Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA, USA).

The following stages in the statistical analysis comprised 4 tests. Firstly, a two-way ANOVA with dose and gender as factors was conducted to determine whether the difference in doses or gender had an impact on the acute effects of methylone or MDMA. In the case of methylone, out of all variables analyzed, only 17 out of 131 variables that corresponded to effects with low scores were found to be significant. For MDMA, none of the variables were significant. Thus, given that any of the main effects associated with methylone or MDMA showed significant differences related to dose and gender, all

participants were grouped independently of these factors considering just one group of methylone and MDMA.

Secondly, the comparison of E_{max} and AUC_{0-4h} values of physiological and subjective effects between MDMA and methylone was performed with an independent samples *t*-test. T_{max} values were compared with the non-parametric Mann–Whitney *U*-test.

Thirdly, to find possible significant changes from baseline, a Dunnett multiple comparison test was conducted to compare each time point with baseline in both drug conditions (0–1 h, 0–2 h, 0–4 h).

Finally, to compare the time-course of all the pharmacological effects between methylone and MDMA, they were evaluated with a two-way ANOVA test with time and drug condition as factors. When these results were significant, a Tukey post-hoc test compared the differences in each time point between conditions.

Statistical analysis was carried out using PASW Statistics version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant when the resulting *p* value was <0.05.

3. Results

Table 1 provides a summary with the statistically significant results (E_{max} , T_{max} , AUC_{0-4h}) of the physiological and subjective effects after methylone and MDMA self-administration. Oral fluid concentrations of both substances are presented in Table 2.

Table 1. Summary of the statistically significant results on physiological and subjective effects after methylone ($n = 8$) and MDMA ($n = 6$) self-administration. Only variables with some statistically significant differences in any of the parameters (E_{max} , T_{max} , AUC_{0-4h}) and Dunnett’s test are presented.

Parameters		Mean \pm SD		T-Student	Dunnett’s Test	
		Methylone	MDMA	<i>p</i> Value	Methylone	MDMA
Physiological effects						
SBP (mmHg)	E_{max}	31.25 \pm 14.77	46.83 \pm 20.83	0.126		
	T_{max}	1.5 (1.0–4.0)	2.0 (1.0–2.0)	0.659	a, b, c	a, b
	AUC_{0-4h}	80.81 \pm 42.89	107.67 \pm 44.34	0.275		
DBP (mmHg)	E_{max}	19.63 \pm 13.96	32.17 \pm 11.29	0.097		
	T_{max}	2.0 (1.0–4.0)	2.0 (1.0–2.0)	0.150	a, b, c	a, b
	AUC_{0-4h}	55.19 \pm 31.02	78.92 \pm 30.33	0.178		
HR (bpm)	E_{max}	20.50 \pm 19.78	10.67 \pm 18.22	0.360		
	T_{max}	3.0 (1.0–4.0)	3.0 (1.0–4.0)	0.436	a	NS
	AUC_{0-4h}	52.06 \pm 39.16	23.83 \pm 38.73	0.205		
Subjective effects						
VAS intensity (mm)	E_{max}	20.0 \pm 16.48	47 \pm 11.19	0.005		
	T_{max}	2.0 (1.0–2.0)	1.5 (1.0–2.0)	0.411	a, b	a, b
	AUC_{0-4h}	45.88 \pm 43.66	111.33 \pm 36.34	0.012		
VAS stimulated (mm)	E_{max}	22.50 \pm 18.81	50.17 \pm 17.12	0.015		
	T_{max}	2.0 (1.0–4.0)	1.5 (1.0–4.0)	0.160	b	a, b
	AUC_{0-4h}	50.56 \pm 47.38	113.17 \pm 40.92	0.024		
VAS high (mm)	E_{max}	24.0 \pm 21.28	60.17 \pm 14.96	0.004		
	T_{max}	2.0 (1.0–4.0)	1.5 (1.0–2.0)	0.032	a, b	a, b
	AUC_{0-4h}	55.06 \pm 53.54	136.92 \pm 41.05	0.009		
VAS good effects (mm)	E_{max}	35.63 \pm 30.63	67.83 \pm 16.51	0.039		
	T_{max}	2.0 (1.0–2.0)	1.5 (1.0–2.0)	0.548	a, b	a, b
	AUC_{0-4h}	74.06 \pm 67.08	167.67 \pm 54.01	0.016		

Table 1. Cont.

	Parameters	Mean ± SD		T-Student	Dunnett's Test	
		Methylone	MDMA	p Value	Methylone	MDMA
VAS content (mm)	E _{max}	35.25 ± 30.38	74.50 ± 18.96	0.017		
	T _{max}	1.5 (1.0–2.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.133	a, b	a, b, c
	AUC _{0–4h}	80.06 ± 82.59	186.25 ± 52.39	0.018		
VAS change in lights (mm)	E _{max}	4.88 ± 4.82	20.00 ± 25.11	0.118		
	T _{max}	1.0 (0.0–2.0)	1.5 (0.0–4.0)	0.491	a, b	NS
	AUC _{0–4h}	10.88 ± 11.85	40.00 ± 53.35	0.156		
VAS different body feeling (mm)	E _{max}	22.25 ± 20.60	50.33 ± 22.59	0.032		
	T _{max}	2.0 (0.0–4.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.258	NS	a
	AUC _{0–4h}	44.13 ± 43.86	95.25 ± 53.40	0.072		
VAS different surrounding (mm)	E _{max}	4.38 ± 7.50	17.33 ± 17.68	0.085		
	T _{max}	0.5 (0.0–4.0)	1.0 (0.0–1.0)	0.581	NS	a
	AUC _{0–4h}	5.69 ± 10.39	27.33 ± 39.71	0.161		
VAS dizziness (mm)	E _{max}	2.13 ± 2.53	13.00 ± 9.84	0.010		
	T _{max}	0.5 (0.0–4.0)	1.0 (0.0–4.0)	0.034	a	NS
	AUC _{0–4h}	2.63 ± 3.02	20.17 ± 20.68	0.034		
VAS headache (mm)	E _{max}	20.25 ± 28.93	5.83 ± 7.68	0.261		
	T _{max}	3.0 (0.0–4.0)	1.0 (0.0–4.0)	0.629	c	NS
	AUC _{0–4h}	23.63 ± 28.94	10.58 ± 18.86	0.357		
VAS face flushing (mm)	E _{max}	31.25 ± 21.91	45.00 ± 22.74	0.275		
	T _{max}	2.0 (1.0–4.0)	1.5 (1.0–4.0)	0.406	b	a
	AUC _{0–4h}	64.50 ± 56.75	89.33 ± 58.31	0.439		
ARCI PCAG (score)	E _{max}	−1.25 ± 1.58	−0.83 ± 3.54	0.771		
	T _{max}	1.0 (1.0–4.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.105	a	NS
	AUC _{0–4h}	−2.75 ± 3.73	−1.58 ± 8.39	0.730		
ARCI MBG (score)	E _{max}	7.5 ± 5.13	8.0 ± 3.35	0.839		
	T _{max}	2.0 (1.0–2.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.011	a, b	a, b
	AUC _{0–4h}	16.63 ± 13.21	20.83 ± 10.05	0.528		
ARCI BG (score)	E _{max}	4.63 ± 3.34	4.67 ± 2.25	0.979		
	T _{max}	2.0 (1.0–4.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.030	a, b	a, b
	AUC _{0–4h}	10.06 ± 7.83	9.83 ± 6.38	0.954		
ARCI A (score)	E _{max}	5.38 ± 3.29	5.83 ± 1.17	0.752		
	T _{max}	1.5 (1.0–4.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.106	a, b	a, b, c
	AUC _{0–4h}	12.56 ± 7.77	15.75 ± 2.79	0.360		
VESSPA S (score)	E _{max}	3.38 ± 2.50	2.83 ± 2.23	0.683		
	T _{max}	4.0 (1.0–4.0)	1.0 (1.0–1.0)	0.061	b, c	a, c
	AUC _{0–4h}	7.06 ± 6.45	5.92 ± 6.09	0.742		
VESSPA ANX (score)	E _{max}	7.50 ± 4.69	6.67 ± 4.37	0.741		
	T _{max}	3.0 (1.0–4.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.019	b, c	a, b
	AUC _{0–4h}	17.94 ± 11.17	16.50 ± 8.82	0.800		
VESSPA SOC (score)	E _{max}	12.25 ± 8.31	14.50 ± 5.96	0.585		
	T _{max}	2.0 (1.0–2.0)	1.0 (1.0–2.0)	0.298	a, b	a, b
	AUC _{0–4h}	31.31 ± 25.40	38.67 ± 17.84	0.557		
VESSPA ACT (score)	E _{max}	9.75 ± 6.25	13.33 ± 4.84	0.268		
	T _{max}	1.0 (1.0–2.0)	1.5 (1.0–2.0)	0.877	a, b	a, b
	AUC _{0–4h}	24.44 ± 17.87	32.58 ± 15.71	0.393		
VESSPA PS (score)	E _{max}	2.63 ± 2.20	1.33 ± 1.21	0.221		
	T _{max}	1.0 (0.0–2.0)	2.0 (0.0–2.0)	0.362	b	NS
	AUC _{0–4h}	5.63 ± 5.58	2.25 ± 2.36	0.192		

Abbreviations: Area under the curve (AUC), visual analogue scales (VAS), Addiction Research Center Inventory (ARCI) (PCAG (sedation), MBG (euphoria), BG (intellectual efficiency), and A (increased energy)), Evaluation of Subjective Effects of Substances with Abuse Potential questionnaire (VESSPA-SSE) (sedation (S), psychosomatic anxiety (ANX), pleasure and sociability (SOC), activity and energy (ACT), and psychotic symptoms (PS)), not significant (NS). Results of C_{max} and AUC_{0–4h} are presented as mean ± standard deviation, T_{max} is shown as median (min–max). To compare the T-C with baseline values, a post-hoc Dunnett's test for multiple comparisons was performed. Statistical differences between conditions are indicated as "a" (times 0–1 h), "b" (times 0–2 h), "c" (times 0–4 h). Significant T-Student $p < 0.05$ values are marked in bold.

Table 2. Concentrations of methylone ($n = 8$) and MDMA ($n = 6$) in oral fluid.

Oral Fluid Concentrations	Methylone	MDMA
Cmax	15,514.00 \pm 9748.86	2936.37 \pm 2761.57
Tmax	2.0 (2.0–2.0)	2.0 (2.0–4.0)
AUC _{0–4 h}	40,623.79 \pm 20,001.70	6586.44 \pm 5229.92

Abbreviations: Area under the curve (AUC). Results of Cmax (ng/mL) and AUC_{0–4h} (ng/mL·h) are presented as mean \pm standard deviation, Tmax (h) is shown as median (min–max).

3.1. Participants

In total, 14 subjects (10 males, 4 females) were selected to participate in the study. Eight subjects (5 males, 3 females) were included for the self-administration of methylone. Participants had a mean age of 30 ± 5 years (range 23–37), weighed 64.88 ± 9.20 kg (range 54.0–78.0), and had a mean body mass index (BMI) of 22.24 ± 3.50 kg/m² (range 16.48–26.03). The mean dose of methylone was 187.50 ± 58.25 mg (range 100–300), which, adjusted to weight, resulted in 2.97 ± 0.99 mg/kg (range 1.28–4.35). At the beginning of the session, urine samples were collected to determine previous drug use. All subjects tested negative in the urine drug tests.

Six participants (5 males, 1 female) were included for the self-administration of MDMA. Participants had a mean age of 29 ± 6 years (range 22–38), weighed a mean of 65.33 ± 8.45 kg (range 54.0–75.0), and had a mean BMI of 22.41 ± 3.17 kg/m² (range 16.48–25.65). The mean dose of MDMA was 87.50 ± 13.69 mg (range 75–100), which, adjusted to weight, resulted in 1.35 ± 0.19 mg/kg (range 1.00–1.54). Five subjects obtained negative results in the urine test and one subject tested positive for cannabis. This participant reported that their last cannabis use was 48 h prior to the session, as specified in our selection criteria.

In both cases, all selected participants reported previous experience with psychostimulants (including MDMA, amphetamines, NPS/synthetic cathinones, cocaine), cannabis, and hallucinogens. See Table S1 for history of drug use.

3.2. Physiological Effects

With respect to physiological effects, both methylone and MDMA produced a statistically significant increase in SBP and DBP compared to baseline over the first 2 h, although this significant effect was prolonged to 4 h in the case of methylone (see Figure 1). Regarding HR, only methylone showed a significant increase in the first hour. Neither of the substances caused significant variations in temperature.

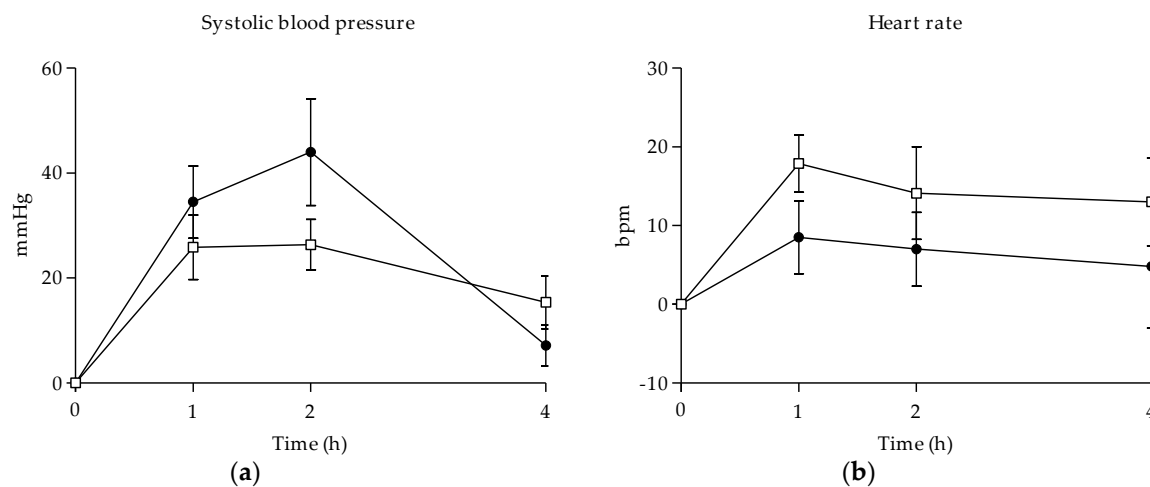


Figure 1. Time course of systolic blood pressure (a) and heart rate (b) after methylone and MDMA oral administration. (□, 100–300 mg methylone ($n = 8$); ●, 75–100 mg MDMA ($n = 6$); mean, standard error).

In addition, the maximum effects on SBP and BDP were higher after the administration of MDMA, whereas methylone showed higher maximal effects on HR (see Table 1). However, no significant differences between methylone and MDMA were detected in Emax, AUC_{0–4h}, and Tmax of the cardiovascular effects.

3.3. Subjective Effects

Methylone and MDMA produced significant subjective effects, which were collected in VAS, ARCI, and VESSPA-SSE. Overall, subjects reported subjective effects starting at 1 h, with maximum values ranging from 1 h to 2 h; hence, most of these effects had almost disappeared at 4 h.

When compared to baseline, both substances caused significant changes in VAS measures, reflecting stimulant-like effects (“intensity”, “stimulated”, “high”, “good effects”, “liking”, “content”, “drunkenness”), changes in perception (“changes in lights” (methylone), “different or changed body feeling” (MDMA), “different surroundings” (MDMA)), and face flushing. Subjects also mentioned slight feelings of dizziness and headache after methylone and MDMA administration (see Table 1 and Figure 2) [38–40]. When comparing both conditions, marked differences were detected in maximum effects, AUC_{0–4h}, and at several T-C points in scales related to stimulant-like effects and body perception, with higher values after MDMA administration.

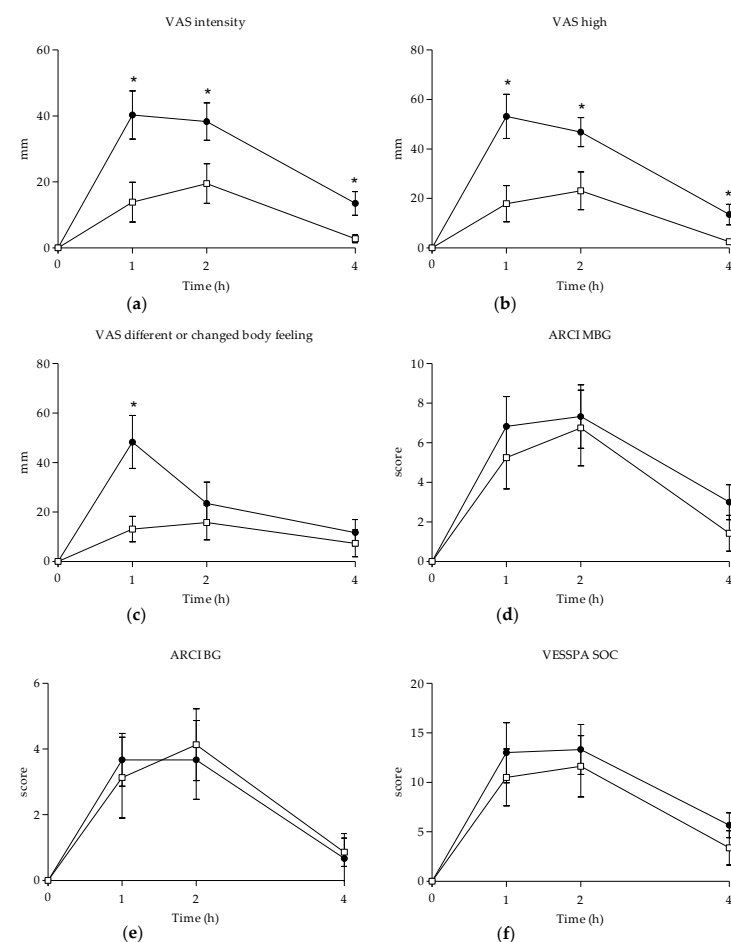


Figure 2. Summary of the time course of subjective effects collected through VAS (intensity (a), high (b), different or changed body feeling (c)), ARCI (MBG (euphoria) (d), BG (intellectual efficiency) (e)), and VESSPA-SSE (SOC (pleasure and sociability) (f)) questionnaires after methylone and MDMA oral administration. (□, 100–300 mg methylone ($n = 8$); ●, 75–100 mg MDMA ($n = 6$); mean, standard error). Statistical differences of $p < 0.05$ between conditions are indicated with “*”. See text for abbreviations.

Regarding the ARCI questionnaire, significant differences from baseline were detected between substances for subscales MBG (euphoria), BG (intellectual efficiency and energy), and A (amphetamine). Subjects who self-administered methylone also reported significant changes in the PCAG subscale (sedation). When comparing methylone and MDMA, peak scores in MBG and BG subscales were very similar, although with significantly earlier onset (T_{max}) after MDMA administration (see Table 1 and Figure 2). However, no statistical differences in maximal effects, AUC_{0-4h} , and T-C points in any of the subscales were observed.

In relation to VESSPA-SSE, methylone and MDMA produced significant changes compared to baseline in some subscales, such as S (sedation), ANX (anxiety), SOC (pleasure and sociability), and ACT (activity and energy). The most relevant effects caused by both conditions with the highest scores of maximum effects were SOC and ACT. However, no statistically significant differences were found in peak effects, AUC_{0-4h} , or T-C points between the two substances in any of the subscales (see Table 1 and Figure 2). The only significant difference was the time of maximum values for the ANX subscale, which showed an earlier onset for MDMA.

The selected doses of both substances were well-tolerated, and no serious adverse effects appeared.

3.4. Oral Fluid Concentrations

Oral fluid concentrations of methylone increased rapidly until maximum concentrations were reached at 2 h, with a mean C_{max} of $15,514.00 \pm 9748.86$ ng/mL. The AUC_{0-4h} obtained from the concentrations was $40,623.79 \pm 20,001.70$ ng/mL·h. Concentrations of methylone started to rapidly decrease at 4 h (see Table 2 and Figure 3).

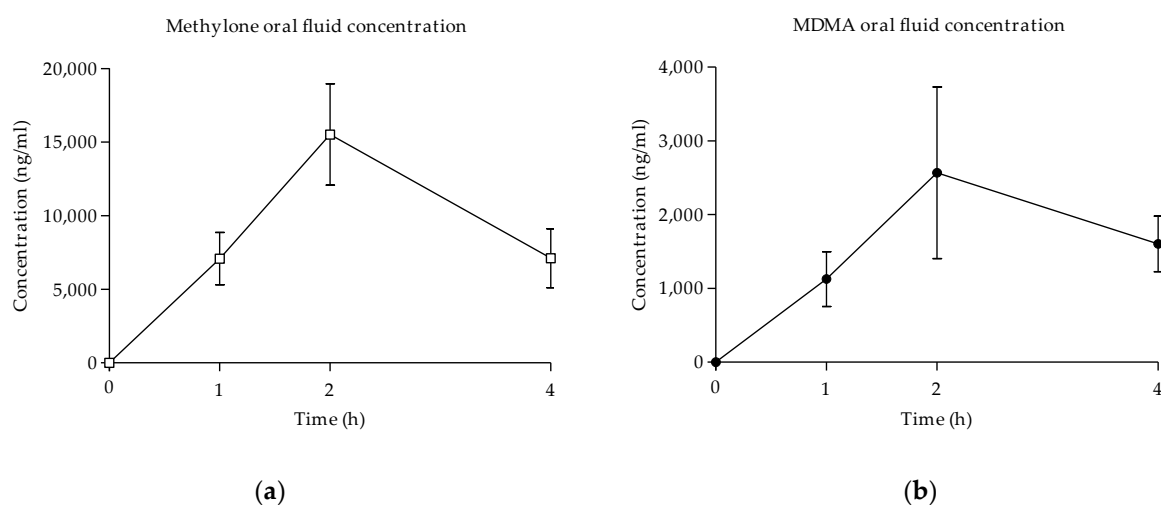


Figure 3. Evolution of concentrations of methylone (a) and MDMA (b) in oral fluid over time (□, 100–300 mg methylone ($n = 8$); ●, 75–100 mg MDMA ($n = 6$); mean, standard error).

In the case of MDMA, oral fluid concentrations increased until they reached their peak at 2 h after administration in all the subjects, with a mean C_{max} of 2936.37 ± 2761.57 ng/mL. MDMA obtained an AUC_{0-4h} of 6586.44 ± 5229.92 ng/mL·h. Concentrations of MDMA in oral fluid started to decrease at 4 h (see Table 2 and Figure 3).

In both cases, subjects ended the sessions with remaining concentrations of methylone or MDMA in oral fluid.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first observational study that evaluates the acute physiological and subjective effects of methylone in humans and compares its pharmacological profile with MDMA. Moreover, the other purpose of this study was to

determine oral fluid concentrations of methylone and see how they relate to the time course of the pharmacological effects.

Our main finding is that the oral administration of methylone in a naturalistic setting exhibits prototypical psychostimulant and empathogenic effects in healthy and experienced recreational drug users. Methylone and traditional MDMA showed similar pharmacological effects.

Methylone and MDMA produced perceptible increases in SBP and DBP, with higher effects after MDMA administration, although differences between them were not statistically significant. Interestingly, maximum effects in SBP occurred earlier in time after methylone intake (1.5 h), and this rise was also further extended in time (4 h) compared to MDMA, which caused higher effects at 2 h that returned to baseline values at the end of the session. Regarding HR, methylone induced a higher increase than MDMA at 1 h after administration. These findings are consistent with previous methylone intoxication reports which described tachycardia and hypertension as some of the clinical manifestations [41]. In the case of MDMA, cardiovascular effects are in line with previous studies under controlled conditions that reported marked increases in SBP, DBP, and HR [42–45].

As expected, methylone and MDMA displayed prototypical psychostimulant and empathogenic effects, extensively described for MDMA [42–49]. In general, subjective effects appeared in the first hour in both conditions and reached maximum values at 2 h after methylone administration, whereas most of these effects peaked earlier, at 1.5 h, in the case of MDMA administration. This finding slightly differs from user reports, which define maximum effects at 1 or 1.5 h after methylone administration [23]. Methylone produced increases in VAS related to stimulation and well-being (stimulation, high, content, good effects), although these effects were half as intense as those produced by MDMA. A possible explanation for these differences could be that the doses selected are not comparable, meaning that methylone was underdosed; however, the tested doses were similar to those most frequently selected by habitual users. For this reason, our data suggest that common doses of methylone produce similar subjective effects to MDMA, although they are milder. In relation to the effects related to perceptual alterations, subjects under methylone influence did not report marked differences, contrary to those participants that self-administered MDMA, who experienced significant changes in body feeling and surroundings.

The profile of physiological and subjective effects produced by methylone in our naturalistic setting was in line with preliminary data obtained from a dose-finding study administering oral doses of 50–150 mg of methylone in a controlled environment [50].

In relation to the effects obtained through ARCI and VESSPA-SSE, methylone showed a similar profile to MDMA and other psychostimulant substances such as amphetamines and mephedrone. Methylone scored predominantly in ARCI subscales related to euphoria (MBG), intellectual efficiency and energy (BG), and in amphetamine-like effects (A). In the same manner, VESSPA-SSE results reflect an increase in activity and energy (ACT) and pleasure and sociability (SOC). However, those stimulant effects usually sought by recreative users also coexisted with sedation and anxiety. Overall, coinciding with previous user reports, most of the subjective effects exhibited by methylone disappeared 4 h after administration [44].

As previously mentioned, there is no published information about the pharmacokinetic profile of methylone in humans to use as a comparison with our findings; the only data available come from studies in rodents [51]. According to the results of our analysis, in oral fluid, methylone reached peak concentrations of $15,514.00 \pm 9748.86$ ng/mL while MDMA obtained maximum levels of 2936.37 ± 2761.57 ng/mL. Overall, concentrations were not comparable given the great difference between conditions. In both sessions, all the subjects reached maximum levels of methylone and MDMA at 2 h after self-administration and decreased at 4 h.

Our results of the oral fluid concentrations of MDMA are similar to those previously published after the administration of 100 mg of MDMA [36,37] and 1–1.6 mg/kg [52].

Previous studies evaluating concentrations of MDMA in oral fluid and blood reported highly variable oral fluid to blood (OF/B) ratios, with concentrations notably higher in oral fluid. This ratio showed a maximum value of 18.1 ± 7.9 (range 10.3–32.3) at 1.5 h after a 100 mg dose of MDMA [36,37]. Other study evaluating oral fluid and plasma correlation reported a median overall OF/B of 5.2 (range 0.1–40.4) after administering the low dose (1.0 mg/kg) and a OF/B of 6.0 (range 0.4–52.3) following the high dose of MDMA (1.6 mg/kg) [52]. Although oral fluid and blood concentrations exhibited a statistically significant correlation, we cannot confirm that blood concentrations can be predicted from oral fluid concentrations due to the high variability of OF/B ratios [52]. Our MDMA oral fluid concentrations would theoretically correspond to the range of concentrations described in previous studies, obtaining a C_{max} in plasma of approximately 205 ng/mL.

Currently, there is no study with synthetic cathinones that examines OF/B ratios. However, previous studies on the oral administration of mephedrone provide independent pharmacokinetic data of oral fluid concentrations and blood concentrations that allow us to estimate the OF/B ratios of mephedrone. After comparing the C_{max} values of mephedrone collected from a controlled study and an observational study, OF/B ratios resulted in values of 49.43, 4.28, and 11.73 following oral mephedrone doses of 100, 150, and 200 mg, respectively [40,53]. Using data from a study that compared blood concentrations of mephedrone and MDMA, estimated OF/B ratios were found to be 22.28 after a 200 mg mephedrone dose and 22.40 after a 100 mg MDMA dose [40,44]. There are no previously published results about blood concentrations of methylone in experimental or observational studies. The OF/B ratio of methylone cannot be calculated from our results because of a lack of blood concentrations. When comparing the time course of oral fluid concentrations and acute effects, peak concentrations of methylone coincide with the maximum subjective effects, which also appeared at 2 h. Although it is still unclear whether oral fluid concentrations fully correlate with those in blood, this non-invasive sample collection was considered the most suitable for the design of the experiment as an observational study in a naturalistic environment. These results also demonstrate that oral fluid concentrations are a suitable, non-invasive, alternative biomarker that can be used to identify acute methylone use.

Additionally, this observational study also provided unique preliminary data about the acute effects and oral fluid concentrations of mephedrone, another synthetic cathinone closely related to methylone, administered by oral and intranasal routes [40]. Mephedrone effects were also in line with the typical profile of psychostimulants, although the maximum values of subjective effects after oral administration were higher compared to methylone and showed close similarity to those of MDMA. These results suggest that even though both synthetic cathinones and their non- β -analogue share a clinical profile, the intensity of their effects differs, given that those induced by methylone are milder compared to those of MDMA and mephedrone. The difference observed in methylone and MDMA's effects can be explained in part by their molecular activity. Methylone has exhibited some affinity for binding 5-HT_{2A} receptors but at significantly lower potencies than MDMA. Methylone has been described as a partial agonist at the 5-HT_{1A} receptor, with weak antagonist effects on 5-HT_{2C} receptors, contrary to MDMA, which is considered a partial agonist rather than an antagonist [54,55].

Moreover, mephedrone also produced similar stimulant-like effects to MDMA in controlled conditions, but with a more rapid onset and shorter duration of effects [44]. This would be contrary to our results, which showed that the maximum effects induced by methylone appeared later compared to MDMA. However, further investigations of methylone administration in controlled conditions are required to confirm the findings obtained in this observational study.

This study has limitations typically associated with observational–naturalistic designs. The study was non-placebo-controlled (negative control) and open-label, since participants selected their doses according to their experience; hence, its design makes it susceptible to an expectancy bias. Moreover, the naturalistic environment could have influenced their subjective reports. Concentrations of methylone and MDMA were only analyzed

in oral fluid. Blood samples were not collected in order to maintain the naturalistic setting. Another limitation to consider was the low sample size, which decreased the statistical power of the study. Additionally, sessions were divided into a few time-point evaluations. More evaluations would have allowed us to define a more complete time course of pharmacological effects and oral fluid pharmacokinetics. Finally, subjects were not genotyped for the genetic polymorphism of CYP2D6 involved in methylone and MDMA metabolism, which could have had an impact on the outcomes of the study.

However, despite its limitations, this design of study is useful and provides valuable information about novel or emergent substances of which there are still no available data in humans. Moreover, the MDMA effects observed in this study are consistent with those described in previous experimental studies administering MDMA [44]. In the same way, this consistency between results obtained from a naturalistic and an experimental study was proven in the administration of mephedrone [40,44] or THC [56,57]. With this in mind, the following strengths of the study should also be considered. Firstly, the sample included participants of both genders. Moreover, subjects were free to select their doses based on their preference and previous experience. All the measurements were taken with validated methodology (questionnaires and rating scales) and determinations were made with validated analytic techniques. The pharmacological effects of methylone were compared with those of a well-known psychostimulant, such as MDMA, which was administered in similar conditions. Finally, the study was conducted in a naturalistic setting, so that the experience mimicked a more recreational scenario compared to controlled studies.

5. Conclusions

This observational–naturalistic study constitutes an initial preliminary approach to the determination of the acute effects and oral fluid concentrations of methylone after the oral administration of known doses of methylone. Our findings suggest that the pharmacological effects produced by methylone follow the prototypical psychostimulant and empathogenic profile associated with MDMA, including euphoria, stimulation, alteration of perception, and an increase in energy and sociability. Although the subjective effects were similar, those induced by methylone were less intense and peaked later in time compared to MDMA. Oral fluid concentrations of methylone changed in time following the same pattern as the time course of the acute effects, peaking at 2 h after administration. These results confirm that methylone can be considered a suitable biomarker of exposure and that oral fluid is, in the same way, a useful biological matrix to monitor and detect recent methylone use. Finally, our results suggest that the abuse liability and toxicity of methylone is similar to that of MDMA.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biology10080788/s1>, Table S1: Summary of sociodemographic and history of substances use data of participants self-administering methylone ($n = 8$) and MDMA ($n = 6$).

Author Contributions: M.F., M.T., R.d.I.T., M.V. and M.G. conceptualized the study design; M.F., E.P., E.O., M.V. and M.G. collected the data; R.d.I.T. and E.O. analyzed the oral fluid; M.V. and X.C. analyzed the methylone and MDMA contents; L.P., E.P. and C.P.-M. analyzed the data. L.P., E.P., E.O., C.P.-M., M.V., X.C., M.G., F.F., M.T., R.d.I.T. and M.F. wrote, revised and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Fondo de Investigación en Salud (FIS)-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), FIS PI17/01962 and FIS PI20/00879), ISCIII-Red de Trastornos Adictivos RTA (RD16/0017/0003 and RD16/0017/0010), The European Commission [HOME/2014/JDRU/AG/DRUG/7082, Predicting Risk of Emerging Drugs with In silico and Clinical Toxicology (PREDICT)] and AGAUR Gencat Suport Grups de Recerca (2017 SGR 316 and 2017 SGR 530); Lourdes Poyatos has a predoctoral PFIS fellowship (ISC-III, FI18/00179).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and Spanish legislation and approved by the Parc de Salut Mar Clinical Research Ethics Committee (ref. 2016/6700/I).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to Pol Quintana for his valuable assistance throughout the clinical study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Banks, M.L.; Worst, T.J.; Sprague, J. Synthetic Cathinones and amphetamine analogues: What's the rave about? *J. Emerg. Med.* **2014**, *46*, 632–642. [[CrossRef](#)]
2. Evans-Brown, M.; Sedefov, R. Responding to new psychoactive substances in the european union: Early warning, risk assessment, and control measures. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: New York, NY, USA, 2018; Volume 252, pp. 3–49.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report—Trends and Developments*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2020; ISBN 978-92-9497-544-7.
4. Valente, M.J.; Guedes De Pinho, P.; De Lourdes Bastos, M.; Carvalho, F.; Carvalho, M. Khat and synthetic cathinones: A review. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 15–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Karila, L.; Megarbane, B.; Cottencin, O.; Lejoyeux, M. Synthetic Cathinones: A New Public Health Problem. *Curr. Neuropharmacol.* **2014**, *13*, 12–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Prosser, J.M.; Nelson, L.S. The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. *J. Med. Toxicol.* **2012**, *8*, 33–42. [[CrossRef](#)]
7. Bossong, M.G.; Van Dijk, J.P.; Niesink, R.J.M. Methylone and mCPP, two new drugs of abuse? *Addict. Biol.* **2005**, *10*, 321–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Baumann, M.H.; Ayestas, M.A.; Partilla, J.S.; Sink, J.R.; Shulgin, A.T.; Daley, P.F.; Brandt, S.D.; Rothman, R.B.; Ruoho, A.E.; Cozzi, N.V. The Designer Methcathinone Analogs, Mephedrone and Methylone, are Substrates for Monoamine Transporters in Brain Tissue. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37*, 1192–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Štefková, K.; Židková, M.; Horsley, R.R.; Pinterová, N.; Šichová, K.; Uttl, L.; Balíková, M.; Danda, H.; Kuchar, M.; Páleníček, T. Pharmacokinetic, ambulatory, and hyperthermic effects of 3,4-methylenedioxy-n-methylcathinone (Methylone) in rats. *Front. Psychiatry* **2017**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
10. Hondebrink, L.; Zwartsen, A.; Westerink, R.H.S. Effect fingerprinting of new psychoactive substances (NPS): What can we learn from in vitro data? *Pharmacol. Ther.* **2018**, *182*, 193–224. [[CrossRef](#)]
11. Cozzi, N.V.; Sievert, M.K.; Shulgin, A.T.; Jacob, P.; Ruoho, A.E. Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by β -ketoamphetamines. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *381*, 63–69. [[CrossRef](#)]
12. Sogawa, C.; Sogawa, N.; Ohyama, K.; Kikura-Hanajiri, R.; Goda, Y.; Sora, I.; Kitayama, S. Methylone and Monoamine Transporters: Correlation with Toxicity. *Curr. Neuropharmacol.* **2011**, *9*, 58–62. [[CrossRef](#)]
13. López-Arnau, R.; Martínez-Clemente, J.; Pubill, D.; Escubedo, E.; Camarasa, J. Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: Butylone, mephedrone and methylone. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 407–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Simmler, L.D.; Buser, T.A.; Donzelli, M.; Schramm, Y.; Dieu, L.H.; Huwyler, J.; Chaboz, S.; Hoener, M.C.; Liechti, M.E. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 458–470. [[CrossRef](#)]
15. Pedersen, A.J.; Petersen, T.H.; Linnet, K. In vitro metabolism and pharmacokinetic studies on methylone. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 1247–1255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Schmid, Y.; Vizeli, P.; Hysek, C.M.; Prestin, K.; Meyer Zu Schwabedissen, H.E.; Liechti, M.E. CYP2D6 function moderates the pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylene-dioxymethamphetamine in a controlled study in healthy individuals. *Pharm. Genom.* **2016**, *26*, 397–401. [[CrossRef](#)]
17. Elmore, J.S.; Dillon-Carter, O.; Partilla, J.S.; Ellefsen, K.N.; Concheiro, M.; Suzuki, M.; Rice, K.C.; Huestis, M.A.; Baumann, M.H. Pharmacokinetic Profiles and Pharmacodynamic Effects for Methylone and Its Metabolites in Rats. *Neuropsychopharmacology* **2017**, *42*, 649–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Centazzo, N.; Chojnacki, M.R.; Elmore, J.S.; Rodriguez, R.; Acosta, T.; Suzuki, M.; Rice, K.C.; Baumann, M.H.; Concheiro, M. Brain Concentrations of Methylone and Its Metabolites after Systemic Methylone Administration: Relationship to Pharmacodynamic Effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, *377*, 398–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *World Drug Report 2020. Drug Use and Health Consequences*; Sales No. E.20.XI.6; United Nations Publications: Vienna, Austria, 2020; ISBN 9789211483451.
20. Madras, B.K. The Growing Problem of New Psychoactive Substances (NPS). *Curr. Top Behav. Neurosci.* **2017**, *32*, 1–18. [[CrossRef](#)]
21. Palamar, J.J.; Acosta, P.; Calderón, F.F.; Sherman, S.; Cleland, C.M. Assessing self-reported use of new psychoactive substances: The impact of gate questions. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* **2017**, *43*, 609–617. [[CrossRef](#)]
22. National Forensic Laboratory Information System (NFLIS). *Special Report: Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones Reported in NFLIS, 2013–2015*; U.S. Drug Enforcement Administration: Springfield, IL, USA, 2016; p. 12.

23. World Health Organization (WHO). *Methylone (bk-MDMA). Critical Review Report*; WHO: Geneva, Switzerland, 2014.
24. De Felice, L.J.; Glennon, R.A.; Negus, S.S. Synthetic Cathinones: Chemical Phylogeny, Physiology, and Neuropharmacology. *Life Sci.* **2014**, *97*, 20–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Watterson, L.R.; Burrows, B.T.; Hernandez, R.D.; Moore, K.N.; Grabenauer, M.; Marusich, J.A.; Olive, M.F. Effects of α -pyrrolidinopentiophenone and 4-methyl-N-ethylcathinone, two synthetic cathinones commonly found in second-generation “bath salts,” on intracranial self-stimulation thresholds in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2015**, *18*, 1–7. [[CrossRef](#)]
26. Karila, L.; Billieux, J.; Benyamina, A.; Lançon, C.; Cottencin, O. The effects and risks associated to mephedrone and methylone in humans: A review of the preliminary evidences. *Brain Res. Bull.* **2016**, *126*, 61–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cawrse, B.M.; Levine, B.; Jufer, R.A.; Fowler, D.R.; Vorce, S.P.; Dickson, A.J.; Holler, J.M. Distribution of methylone in four postmortem cases. *J. Anal. Toxicol.* **2012**, *36*, 434–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Boulanger-Gobeil, C.; St-Onge, M.; Laliberté, M.; Auger, P.L. Seizures and Hyponatremia Related to Ethcathinone and Methylone Poisoning. *J. Med. Toxicol.* **2012**, *8*, 59–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. McIntyre, I.M.; Hamm, C.E.; Aldridge, L.; Nelson, C.L. Acute methylone intoxication in an accidental drowning—A case report. *Forensic Sci. Int.* **2013**, *231*, 8–10. [[CrossRef](#)]
30. Shimomura, E.T.; Briones, A.J.; Warren, W.S.; Addison, J.W.; Knittel, J.L.; Shoemaker, S.A.; King, T.D.; Bosty, T.Z. Case report of methylone, oxymorphone and ethanol in a fatality case with tissue distribution. *J. Anal. Toxicol.* **2016**, *40*, 543–545. [[CrossRef](#)]
31. Barrios, L.; Grison-Hernando, H.; Boels, D.; Bouquie, R.; Monteil-Ganiere, C.; Clement, R. Death following ingestion of methylone. *Int. J. Leg. Med.* **2016**, *130*, 381–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. deRoux, S.J.; Dunn, W.A. “Bath Salts” the New York City Medical Examiner Experience: A 3-Year Retrospective Review. *J. Forensic Sci.* **2017**, *62*, 695–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Liakoni, E.; Müller, S.; Stoller, A.; Ricklin, M.; Liechti, M.E.; Exadaktylos, A.K. Presentations to an urban emergency department in Bern, Switzerland associated with acute recreational drug toxicity. *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* **2017**, *25*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gjerde, H.; Langel, K.; Favretto, D.; Verstraete, A.G. Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *256*, 42–45. [[CrossRef](#)]
35. Busardo, F.P.; Pichini, S.; Pellegrini, M.; Montana, A.; Lo Faro, A.F.; Zaami, S.; Graziano, S. Correlation between Blood and Oral Fluid Psychoactive Drug Concentrations and Cognitive Impairment in Driving under the Influence of Drugs. *Curr. Neuropharmacol.* **2017**, *16*. [[CrossRef](#)]
36. Navarro, M.; Pichini, S.; Farré, M.; Ortuño, J.; Roset, P.N.; Segura, J.; De La Torre, R. Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: Correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH. *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 1788–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pichini, S.; Navarro, M.; Farré, M.; Ortuño, J.; Nolasco Roset, P.; Pacifici, R.; Zuccaro, P.; Segura, J.; de la Torre, R. On-Site Testing of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) in Saliva with Drugwipe and Drugread: A Controlled Study in Recreational Users. *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 147–176. [[CrossRef](#)]
38. González, D.; Riba, J.; Bouso, J.C.; Gómez-Jarabo, G.; Barbanoj, M.J. Pattern of use and subjective effects of *Salvia divinorum* among recreational users. *Drug Alcohol Depend.* **2006**, *85*, 157–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Papaseit, E.; Olesti, E.; Pérez-Mañá, C.; Torrens, M.; Grifell, M.; Ventura, M.; Pozo, O.J.; de Sousa Fernandes Perna, E.B.; Ramaekers, J.G.; de la Torre, R.; et al. Acute Effects of 2C-E in Humans: An Observational Study. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Papaseit, E.; Olesti, E.; Pérez-Mañá, C.; Torrens, M.; Fonseca, F.; Grifell, M.; Ventura, M.; de la Torre, R.; Farré, M. Acute pharmacological effects of oral and intranasal mephedrone: An observational study in humans. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Warrick, B.J.; Wilson, J.; Hedge, M.; Freeman, S.; Leonard, K.; Aaron, C. Lethal Serotonin Syndrome After Methylone and Butylone Ingestion. *J. Med. Toxicol.* **2012**, *8*, 65–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Studerus, E.; Vizeli, P.; Harder, S.; Ley, L.; Liechti, M.E. Prediction of MDMA response in healthy humans: A pooled analysis of placebo-controlled studies. *J. Psychopharmacol.* **2021**, *35*, 556–565. [[CrossRef](#)]
43. Kirkpatrick, M.G.; Baggott, M.J.; Mendelson, J.E.; Galloway, G.P.; Liechti, M.E.; Hysek, C.M.; De Wit, H. MDMA effects consistent across laboratories. *Psychopharmacology* **2014**, *231*, 3899–3905. [[CrossRef](#)]
44. Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Mateus, J.A.; Pujadas, M.; Fonseca, F.; Torrens, M.; Olesti, E.; De La Torre, R.; Farre, M. Human pharmacology of mephedrone in comparison with MDMA. *Neuropsychopharmacology* **2016**, *41*, 2704–2713. [[CrossRef](#)]
45. Holze, F.; Vizeli, P.; Müller, F.; Ley, L.; Duerig, R.; Varghese, N.; Eckert, A.; Borgwardt, S.; Liechti, M.E. Distinct acute effects of LSD, MDMA, and d-amphetamine in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology* **2020**, *45*, 462–471. [[CrossRef](#)]
46. Clark, C.M.; Frye, C.G.; Wardle, M.C.; Norman, G.J.; de Wit, H. Acute effects of MDMA on autonomic cardiac activity and their relation to subjective prosocial and stimulant effects. *Psychophysiology* **2015**, *52*, 429–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kuypers, K.P.C.; Dolder, P.C.; Ramaekers, J.G.; Liechti, M.E. Multifaceted empathy of healthy volunteers after single doses of MDMA: A pooled sample of placebo-controlled studies. *J. Psychopharmacol.* **2017**, *31*, 589–598. [[CrossRef](#)]
48. van Wel, J.H.P.; Kuypers, K.P.C.; Theunissen, E.L.; Bosker, W.M.; Bakker, K.; Ramaekers, J.G. Effects of acute MDMA intoxication on mood and impulsivity: Role of the 5-HT₂ and 5-HT₁ receptors. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Bershad, A.K.; Mayo, L.M.; Van Hedger, K.; McGlone, F.; Walker, S.C.; de Wit, H. Effects of MDMA on attention to positive social cues and pleasantness of affective touch. *Neuropsychopharmacology* **2019**, *44*, 1698–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Poyatos, L.; Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Martín, S.; Hladun, O.; Vila, A.; Siles, A.; Fuster, D.; Barriocanal, A.M.; Pichini, S.; et al. Human pharmacology of methylone: A pilot phase I dose-finding study. European Association of Clinical Pharmacology and Therapeutics. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2021**, *77*, 8. [[CrossRef](#)]
51. López-Arnau, R.; Martínez-Clemente, J.; Carbó, M.; Pubill, D.; Escubedo, E.; Camarasa, J. An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new drug of abuse, methylone, a synthetic cathinone sold as “bath salts”. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2013**, *45*, 64–72. [[CrossRef](#)]
52. Desrosiers, N.A.; Barnes, A.J.; Hartman, R.L.; Scheidweiler, K.B.; Kolbrich-Spargo, E.A.; Gorelick, D.A.; Goodwin, R.S.; Huestis, M.A. Intramural Research Program National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health 251 Bayview Boulevard, Suite 200 Room 05A-721. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 4067–4076. [[CrossRef](#)]
53. Olesti, E.; Farré, M.; Carbó, M.; Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Torrens, M.; Yubero-Lahoz, S.; Pujadas, M.; Pozo, Ó.J.; de la Torre, R. Dose-Response Pharmacological Study of Mephedrone and Its Metabolites: Pharmacokinetics, Serotonergic Effects, and Impact of CYP2D6 Genetic Variation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2019**, *106*, 596–604. [[CrossRef](#)]
54. López-Arnau, R.; Martínez-Clemente, J.; Pubill, D.; Escubedo, E.; Camarasa, J. Serotonergic impairment and memory deficits in adolescent rats after binge exposure of methylone. *J. Psychopharmacol.* **2014**, *28*, 1053–1063. [[CrossRef](#)]
55. Eshleman, A.J.; Wolfrum, K.M.; Hatfield, M.G.; Johnson, R.A.; Murphy, K.V.; Janowsky, A. Substituted methcathinone differ in transporter and receptor interactions. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1803–1815. [[CrossRef](#)]
56. La Maida, N.; Papaseit, E.; Martínez, L.; Pérez-Mañá, C.; Poyatos, L.; Pellegrini, M.; Pichini, S.; Pacifici, R.; Ventura, M.; Galindo, L.; et al. Acute pharmacological effects and oral fluid biomarkers of the synthetic cannabinoid ur-144 and thc in recreational users. *Biology* **2021**, *10*, 257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Busardò, F.P.; Pérez-Acevedo, A.P.; Pacifici, R.; Mannocchi, G.; Gottardi, M.; Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Martín, S.; Poyatos, L.; Pichini, S.; et al. Disposition of phytocannabinoids, their acidic precursors and their metabolites in biological matrices of healthy individuals treated with vaporized medical cannabis. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

