

Antecedentes del estudio metabólico de MDPV y metilona. Propuesta de un modelo de biotransformación a través de hongos del género *Cunninghamella*

Eliana A. Silva^{1,2}, Jorge A. Martínez^{1*}

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Av. Carrera 30 # 45-03, Bogotá D. C., Colombia

* Correo electrónico: jmartinezra@unal.edu.co

² Laboratorio de Estupeficientes, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Bogotá, Colombia.

Recibido para evaluación: 23 de agosto del 2016

Aceptado para publicación: 5 de diciembre del 2016

RESUMEN

La (\pm)-3,4-metilendioxipirovalerona (MDPV) y la (\pm)-3,4-metilenedioximetilcatinona (metilona) son algunos de los derivados sintéticos de catinonas más frecuentemente encontrados en productos que se comercializan como “sales de baño”, los cuales hoy en día se emplean como drogas de abuso. Los reportes de casos fatales por consumo de estas sustancias aumentan cada día, y aunque existen algunos estudios farmacológicos y toxicológicos, no son claros los mecanismos de acción y los efectos causados por su consumo recreativo. La implementación de sistemas que permitan conocer el metabolismo de estas drogas en humanos y el diseño de métodos analíticos para su detección son ahora objeto de investigación. Este artículo presenta una revisión bibliográfica acerca de los estudios de biotransformación para MDPV y metilona empleando modelos *in vitro* con microsomas hepáticos humanos, fracciones celulares S9 y modelos *in vivo* con animales de experimentación, así como un posterior análisis de los metabolitos que hay hasta la fecha. Las técnicas analíticas utilizadas para el análisis de metabolitos incluyen cromatografía líquida acoplada a detector selectivo de masas (LC-MS o LC-MS/MS), o la formación de derivados acetilados o sililados para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a detector selectivo de masas (GC-MS). Además, se incluye una propuesta para el estudio del metabolismo para metilona y MDPV a través de hongos del género *Cunninghamella*.

Palabras clave: MDPV, metilona, biotransformación, *Cunninghamella*.

SUMMARY

History of the metabolic study of MDPV and methylone. Proposal of a biotransformation model through fungi of the genus *Cunninghamella*

(±)-3,4-methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (methylone) are some of the most frequent synthetic derivatives of cathinones found in commercial products known as “Bath salts” and which today are used as drugs of abuse. Reports on fatal cases involving the consumption of these substances are raising and although there are some pharmacological and toxicological studies, their action mechanisms and effects due recreational consumption are not very well understood. The implementation of systems that allows the understanding of the metabolism of these drugs in humans and the design of analytical methods for their detection is now the subject of research. This paper shows a bibliographical review of the studies conducted on the biotransformation of methylone and MDPV using *in vitro* models with human hepatic microsomes, cell fractions S9 and *in vivo* models in animals with posterior analysis of the obtained metabolites. The analytical techniques used for the analysis of the metabolites include liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) or the formation of acetylated or dimethyl silylated derivatives for their posterior analysis by gas chromatography (GC-MS). A proposal for the study of the metabolisms of methylone and MDPV through the fungus of the genera *Cunninghamella* is also included.

Keywords: MDPV, methylone, biotransformations, *Cunninghamella*.

INTRODUCCIÓN

Según el informe mundial sobre drogas llevado a cabo en el 2015 y publicado por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), hay un número creciente de países que ha notificado la aparición de una mayor variedad de nuevas sustancias psicoactivas (NPS). El término “nuevas” no se refiere forzosamente a nuevas invenciones, sino a sustancias que han empezado a circular recientemente

en mercados concretos y no están fiscalizadas a nivel mundial. Los datos disponibles acerca de su consumo son inciertos debido al enorme número y diversidad. En el 2014, 95 países habían informado sobre un total de 541 NPS al sistema de alerta temprana de la UNODC. La mayoría de NPS siguieron siendo cannabinoides sintéticos (39%), seguidos por derivados de fenetilaminas y catinonas sintéticas (33%) [1]. De acuerdo con la UNODC, las NPS comprenden varios tipos de sustancias y se pueden clasificar en nueve grupos:

- Aminoindanos: análogos cíclicos de anfetamina, como 2-aminoindano (2-AI) [2].
- Cannabinoides sintéticos: agonistas de receptores de cannabinoides que se venden como mezclas vegetales, e. g. tetrahidrocannabinol (THC), análogos sintéticos como HU-210, y otros como aminoalquilindoles (JWH-018, JWH-073) [3].
- Catinonas sintéticas: β -cetofenetilaminas, químicamente similares a las anfetaminas, con efectos parecidos a la cocaína y anfetaminas como mefedrona, MDPV y metilona [4].
- Sustancias tipo fenciclidina (PCP): Actúan como antagonista de receptores *N*-metil *D*-aspartato (NMDA), como la ketamina.
- Fenetilaminas: anfetamina, MDMA, DOC, 2CB, Bromo-*Dragonfly* y metoximetanfetamina (PMMA), las cuales gracias a su acción sobre el sistema nervioso simpático actúan como agentes adrenérgicos.
- Piperazinas: agonistas del neurotransmisor GABA (ácido γ -aminobutírico), como benzilpiperazina (BZP) y mCPP (1-(3-clorofenil)piperazina).
- Sustancias de origen vegetal: Khat (*Catha edulis*), *Mitragyna speciosa* Korth (Kratom) y *Salvia divinorum*.
- Triptaminas: derivados sintéticos de dimetiltriptamina (DMT), y otras triptaminas de origen natural.
- Finalmente, otros como la 1,3-dimetilamilamina (DMAA) que no se pueden clasificar en ninguno de los grupos anteriores [2-4].

Las catinonas sintéticas surgen en el mercado de las drogas en Europa y Estados Unidos a mediados del 2000, como alternativas legales en productos que se comercializan como sales de baño, fertilizantes para plantas y repelentes para insectos. Estas drogas se caracterizan por ser estimulantes simpaticomiméticos, con acción serotoninérgica y propiedades alucinógenas, generando como principales efectos tóxicos taquicardia, diaforesis, hipertensión y agitación, y psicosis y paranoia como efectos neuropsiquiátricos.

Su comercialización, llevada a cabo principalmente a través de Internet, tiendas de barrios y lugares donde se vende tabaco y cigarrillos, ha facilitado su difusión a otros países. Son derivados sintéticos de la catinona (*S*-(-)-2-amino-1-fenil-1-propanona), un alcaloide natural presente como componente activo principal de la hoja de la planta de khat (*Catha edulis*), la cual se consume en el este de África y la península arábiga en forma de té, gracias a sus propiedades estimulantes. Los derivados de catinona están relacionados con la familia de las fenetilaminas a la que pertenece la metilendioxi-metanfetamina (MDMA), y se caracterizan por la presencia de un grupo cetona en la posición β en la cadena lateral. Algunas de las catinonas sintéticas que más frecuentemente se emplean como drogas de abuso son la MDPV, metilona, butilona y mefedrona [5-8]. El aumento en la popularidad y uso de este tipo de drogas en Europa y Estados Unidos se debe, entre otros aspectos, a su fácil adquisición, al desconocimiento de todos sus posibles efectos adversos, sumado a su difícil detección por metodologías clásicas en un laboratorio de toxicología [4].

La determinación de drogas de abuso en toxicología *postmortem* juega un papel importante en la determinación de la causa y la manera de muerte, razón por la cual hoy en día se han desarrollado numerosos modelos, tanto *in vivo*, como *in vitro*, los cuales buscan esclarecer rutas metabólicas, perfiles metabólicos y metabolitos para el mejor entendimiento en la interpretación de los resultados toxicológicos. Este artículo describe los más recientes avances en cuanto a estudios metabólicos de MDPV y metilona, desde el punto de vista de modelos *in vivo* e *in vitro* con el uso de herramientas analíticas modernas, así como sus principales limitaciones.

Los modelos *in vitro* se basan en la utilización de microsomas hepáticos humanos y fracciones celulares S9 (sobrenadante, separado por centrifugación del tejido hepático homogenizado); los modelos *in vivo* se basan en el uso de animales de experimentación. Asimismo, se incluye el análisis de los metabolitos encontrados en muestras de orina de consumidores de este tipo de sustancias [9-11]. Los modelos *in vitro* e *in vivo* tradicionales presentan algunas desventajas, entre las que se encuentran la imposibilidad de evaluar metabolismo de fase II, o el hecho de que al ser homogenizados del contenido celular las enzimas, no constituyen una fuente de cofactores y coenzimas necesarias en la producción de algunos metabolitos, por lo que es necesaria la adición de ellos en las concentraciones adecuadas para el correcto funcionamiento enzimático.

Por otra parte, el mantenimiento del cultivo celular requiere una infraestructura compleja, así como un coste económico elevado, todo lo cual supone inconvenientes añadidos. Los animales de experimentación utilizados en los modelos *in vivo* deben provenir de cepas estandarizadas, y su manejo dentro del laboratorio exige condiciones medioambientales y de nutrición estables que en muchas ocasiones son difíciles de

conseguir [12]. Adicionalmente, la disponibilidad de muestras biológicas de personas consumidoras de este tipo de sustancias es muy limitada. Por esta razón, en esta revisión se incluye una propuesta del estudio del metabolismo para MDPV y metilona con un modelo fúngico *in vitro* alternativo a los mencionados anteriormente. La selección de estas dos moléculas se basa en que son dos de los derivados de catinona más frecuentemente identificados en muestras de sangre y orina de consumidores involucrados en casos fatales o de intoxicación, reportados en Estados Unidos y Europa durante los últimos años [13].

La metilona, una molécula análoga a la de metilendioximetanfetamina ((RS)-1-(1,3-metilenodioxifen-5-il)-N-metilpropan-2-amina), con un grupo cetona en el carbono bencílico, actúa como un inhibidor de la recaptación de monoaminas. Fue sintetizada por primera vez en 1996 como antidepresivo y antiparkinsoniano [14], y a mediados de la década de 2000 se reportó su uso recreativo en Japón, USA y Europa [15]. El metabolismo de metilona ha sido estudiado en orina de rata y orina humana [13].

La MDPV también inhibe la recaptación de monoaminas, y a diferencia de la molécula de metilona contiene un anillo pirrolidínico que incluye un grupo amino terciario, el cual hace la molécula menos polar y, por tanto, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica con mayor facilidad. Fue sintetizada por Boehringer Ingelheim y patentada en 1969 [10, 16, 17], pero en el año 2007 fue retirada del mercado alemán y calificada como droga de abuso. Su metabolismo ha sido estudiado usando microsomas hepáticos humanos, fracciones celulares S9, orina humana [9, 18] y muestras de agua residual [19].

El modelo propuesto incluye el estudio del metabolismo a través de hongos del género *Cunninghamella*, un hongo filamentoso que ha sido aislado del suelo y posee un sistema enzimático similar al de los mamíferos [20], por lo que ha demostrado ser adecuado para el estudio del metabolismo de medicamentos como verapamilo [21], metoprolol [22], naproxeno [23] y amoxapina [24], entre otros. La biotransformación a través de microorganismos ha resultado ser una herramienta importante puesto que sus productos estereo y regioselectivos no son fáciles de obtener por síntesis química [25]. Asimismo, se ha usado también con el fin de obtener metabolitos con actividad biológica mejorada [26]. Aunque en Colombia no hay reportes de casos de consumo de catinonas, sí se ha identificado metilona, etilona y α -pirrolidinovalerona (α -PVP) en productos de consumo ilícito [27]. Lo anterior significa que ya entraron al mercado negro de drogas de abuso en Colombia, pero seguramente pasan desapercibidas debido a que hasta el momento actual no se han desarrollado metodologías analíticas apropiadas que permitan la detección de los metabolitos, o a que algunos de ellos no están disponibles en la base de datos de las librerías que hoy en día se emplean en el país.

METODOLOGÍA

La consulta de literatura científica para la elaboración de esta revisión se llevó a cabo empleando los motores de búsqueda PubMed y Science Direct, con los términos de búsqueda: “3,4-methylenedioxypropylone”, “MDPV”, “3,4-methylenedioxypropylone”, “methyline” y “Cunninghamella” de manera individual, o junto con el término “metabolism”. Se revisaron un total de 66 textos completos de artículos originales, cinco específicos para el estudio del metabolismo de MDPV y cinco para metilona. Además, se examinó la sección de referencias de los mismos para identificar los estudios adicionales más relevantes. La investigación solo incluye artículos disponibles en inglés que fueron publicados desde 1992 hasta el 15 de agosto del 2016.

Metabolismo de (±)-3,4-metilendioxi-*propylone* (MDPV)

Usando microsomas hepáticos y fracciones celulares S9 hepáticas humanas para CYP450 de fase I, y las enzimas uridina 5(-difosfoglucuronosiltransferasa) y sulfotransferasa para fase II, Strano *et al.* evaluaron el metabolismo de MDPV *in vitro*. La identificación de los metabolitos se realizó por medio del análisis de sus derivados TMS por GC-MS y análisis de sobrenadantes por cromatografía líquida con analizador de cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-QTOF). Como ruta de biotransformación se propone una vía metabólica similar a la de MDMA, la cual consiste en la apertura del anillo metilendioxi seguido por *O*-desmetilación a fin de producir un grupo catecol, que posteriormente es metilado por acción de la catecol-*O*-metiltransferasa (COMT). El autor presenta dos principales metabolitos de MDPV: 3,4-dihidroxi-*propylone* (3,4-catecol-PV), producto de la *O*-desmetilación del anillo 3,4- metilendioxi, y 4-hidroxi-3-metoxi-*propylone* (4-OH-3-MeO-PV), resultado de la *O*-metilación de 3,4-catecol-PV. En la figura 1 se pueden apreciar los principales metabolitos de MDPV encontrados en la literatura consultada. Los experimentos sobre el metabolismo de fase II demostraron que estos metabolitos se conjugan por sulfatación (50%) y glucuronidación (40%). Asimismo, las muestras sometidas a metabolismo de fase I y fase II mostraron que aproximadamente el 7% se metaboliza a 3,4-catecol-PV, el 10% a 4-OH-3-MeO-PV, y el 80% de MDPV permanece inalterado, aunque mencionan los autores que este porcentaje puede deberse al exceso de MDPV añadido a las muestras [9].

Meyer *et al.* identificaron metabolitos de fase I y II de MDPV en muestras de orina de rata, tomadas 24 horas después de haber sido administrada con de MDPV (20 mg/Kg). En este estudio se describe la formación de diferentes metabolitos (se describen entre paréntesis con el nombre que el autor les asignó) a través de varias rutas metabólicas propuestas: por la pérdida de grupo metileno del anillo 3,4-metilendioxi demetilenil-MDPV, demetilenil-*N,N*-bis-dealquil-MDPV, demetilenil-oxo-MDPV y

demetilenil-alquil-hidroxi-MDPV; por hidroxilación de la cadena lateral de propilo demetilenil-metil-alquil-hidroxi-MDPV y demetilenil-alquil-hidroxi-MDPV, con posterior oxidación a la correspondiente cetona demetilenil-metil-carboxi-oxo-MDPV y carboxi-oxo-MDPV; por hidroxilación de la posición 2 del anillo de pirrolidina seguido de deshidrogenación a la correspondiente lactama demetilenil-metil-oxo-MDPV, oxo-MDPV y demetileniloxo-MDPV; por hidroxilación del anillo fenilo (demetilenil-metil-fenil-hidroxi-MDPV); por hidroxilación de la posición 2 del anillo de pirrolidina y posterior apertura del anillo para formar el respectivo aldehído alifático, seguido por la oxidación a ácido carboxílico carboxi-oxo-MDPV, demetilenil-metil-carboxi-oxo-MDPV; y por degradación de aminas primarias demetilenil-metil-N,N-bisdealquil-MDPV y demetilenil-N,N-bis-dealquil-MDPV). Además, se identifica MDPV sin metabolizar. Meyer *et al.* también identifican metabolitos en orina humana después de la ingesta de una cantidad desconocida de MDPV. Estos metabolitos son: demetilenil-MDPV, demetilenil-metil-MDPV, demetilenil-oxo-MDPV, demetilenil-metil-oxo-MDPV, oxo-MDPV, demetilenil-metil-hidroxi-alquilo-MDPV, demetilenilhidroxi-alquil-MDPV y demetil-metil-N,N-bisdealkil-MDPV. Asimismo, el autor realizó la identificación de metabolitos usando GC-MS para derivados acetilados y trimetilsilano, posteriormente confirmados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HR-MS) [28].

Sebastien *et al.* describen la validación de un método analítico para la determinación y cuantificación de MDPV y sus metabolitos mayoritarios (3,4-catecol-PV) y (4-OH-3-MeO-PV), por LC-HR-MS en plasma de rata previamente administrada con MDPV, con un límite de cuantificación de 0.25 μL [11]. Bertol *et al.* reportaron la presencia de metabolitos de fase I y fase II en un paciente de 27 años, quien dijo haber consumido MDPV adquirido a través de Internet. El análisis por LC-HR-MS y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-HR-MS/MS), reveló la presencia de MDPV en concentración de 55 ng/mL, y la presencia de siete metabolitos de fase I y de seis metabolitos de fase II previamente identificados por Meyer. *et al.* Este estudio demostró que los metabolitos mayoritarios son demetilenil-metil MDPV (el mismo 4-OH-3-MeO-PV) para fase I, y demetil-enil-MDPV glucurónido para la fase II, según la nomenclatura empleada por Meyer *et al.* [28]. Murray *et al.* identificaron concentraciones de 670 ng/mL en orina y de 82 ng/mL en el suero en un paciente de 40 años que murió 42 horas después de ingresar en el servicio de urgencias con comportamiento agresivo, delirante y signos vitales alterados. Los familiares informaron que se había producido un cambio en su hábito de consumo de cocaína a sales de baño. El análisis de orina por GC-MS reveló la presencia de paracetamol, cafeína, lidocaína, trimetoprim y MDPV. La confirmación de la presencia de catinona fue llevada a cabo por LC-MS/MS empleando el deuterado d8-MDPV como estándar interno, y la extracción se llevó a cabo con ácido trifluoroacético (TFA) [30].

Empleando cromatografía líquida con ionización por electrospray y sistema de detección de masas con trampa iónica (LC-ESI-ITMS), Xueguo identificó los metabolitos mayoritarios de MDPV como metilcatecolpirovalerona y catecolpirovalerona, mediante un análisis simultáneo de metabolitos de metcatinona (MC), 3,4-metilenedioximetcatinona (MDMC), 3,4-metilenedioxi-pirovalerone (MDPV) y 4'-metil- α -pirrolidinopropiofenona (MPPP), usando microsomas hepáticos de rata fracción S9 [31].

Por su parte, en otro estudio realizado por Mardal y Meyer [19] se analiza la biotransformación de MDPV a través de microorganismos presentes en aguas residuales. El propósito de esa investigación fue estudiar las rutas de biotransformación de MDPV. El estudio se llevó a cabo mediante un proceso de incubación con agua residual de una planta local a la cual se adicionó una solución de MDPV. Las muestras se trataron por extracción en fase sólida, y posteriormente se analizaron en un espectrómetro de masas con trampa de iones Orbitrap. Las reacciones de biotransformación observadas fueron: desmetilación seguida por *O*-metilación, hidroxilación en el anillo fenilo, hidroxilación en el anillo pirrolidínico seguida de metilación u oxidación y *N*-desmetilación e hidroxilación en la parte alquílica. En total, se identificaron 12 productos de biotransformación después de 10 días de incubación. Este estudio indicó que demetilenil-metil-MDPV es el metabolito más abundante en orina humana y, por tanto, podría ser empleado como marcador en aguas residuales.

Metabolismo de (\pm)-3,4-metilenedioximetilcatinona (metilona)

Empleando LC-ESI-MS y GC-MS, Kamata *et al.* desarrollaron un método para la determinación simultánea de metilona y sus metabolitos 3,4-metilendioximetilcatinona (MDC) y 4-hidroxi-3-metoximetilcatinona (4-OH-3-MeO-MC), también denominado HMMC, y 3-hidroxi-4-metoximetilcatinona (3-OH-4-MeO-MC) en orina humana y de rata, previa derivatización con TFA. Las muestras fueron hidrolizadas y luego extraídas con una mezcla de cloroformo y 2-propanol. Se explica la formación de MDC por *N*-demetilación de la amina primaria correspondiente, y la formación de HMMC o 3-OH-4-MeO-MC por demetilenación y posterior *O*-metilación de un grupo OH del anillo bencénico. El metabolito de fase I más abundante es HMMC; pero además se describen metabolitos de fase II. Kamata también considera una propuesta hecha por Brenneisen *et al.* [32], en la cual se sugiere que las catinonas que poseen grupo β -ceto sufren ceto reducción para formar el correspondiente aminoalcohol, en este caso, 3,4-metilendioxiefedrina (MDEP); sin embargo, en los estudios llevados a cabo por el autor no se encuentra MDEP [32]. En un estudio similar, Kamata *et al.* detectaron los metabolitos ya mencionados, y agrega que predomina la glucoronidación sobre la sulfatación en los estudios de metabolismo en fase II en orina de rata, mientras la sulfatación predomina sobre la glucuronidación en estudios humanos [14, 36].

Desarrollando un sistema de extracción automatizado en línea para experimentos con microsomas hepáticos humanos, Mueller *et al.* identificaron el normetabolito MDC (figura 2), pero no los productos de desmetilación HMCC y 3-OH-4-Me-O-MC. Sus resultados muestran que utilizando enzimas recombinantes, la metilona se metaboliza principalmente por CYP2D6, con alguna contribución de CYP1A2, CYP2B6, y CYP2C19 [33].

López-Arnau *et al.* confirmaron la presencia de MDC, 4-OH-3-MeO-MC y 3-OH-4-MeO-MC. Mediante LC/MS y LC-MS/MS determinaron las concentraciones de estos metabolitos en plasma de ratas después de la administración oral de metilona. Además, los autores proponen rutas metabólicas como *N*-desmetilación, hidroxilación alifática o la desmetilación de un intermediario que por *O*-metilación en posición 3 ó 4 forma 4-OH-3-MeO-MC ó 3-OH-4-MeO-MC, respectivamente. Tanto Kamata, como López, identifican 4-OH-3-MeO-MC y 3-OH-4-MeO-MC, dos compuestos que tienen la misma fórmula química ($C_{11}H_{15}NO_3$) y espectro de masas, y debido a la posición del grupo hidroxilo presentan diferentes tiempos de retención. López describe otro metabolito que corresponde a 3'-hidroxi-metilendioximetcatinona (3'-OH-MDMC), de fórmula $C_{11}H_{13}NO_4$, resultado de hidroxilación alifática [34].

Metabolismo de drogas de síntesis a través de hongos del género *Cunninghamella*

Esta revisión surge como una propuesta para estudiar el metabolismo de nuevas drogas de abuso, mediante un sistema *in vitro* alternativo a los tradicionales que comprende el uso de hongos del género *Cunninghamella*, el cual ha sido evaluado para estudiar el metabolismo de diversos xenobióticos. El empleo de microorganismos como modelos para el estudio del metabolismo mamífero fue desarrollado hace más de cuatro décadas, con el uso de un grupo de diferentes especies de hongos y bacterias que tienen la capacidad de biotransformar compuestos aromáticos mediante la formación de metabolitos hidroxilados por mecanismos similares al de los mamíferos [39]. Hoy en día existen numerosas investigaciones que documentan el uso de microorganismos como modelos de biotransformación para la evaluación de un sinnúmero de sustancias con relevancia farmacológica. Dependiendo del tipo de biotransformación que se desea estudiar existen una gran variedad de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias (algunas especies de los géneros *Actinoplanes*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*), levaduras (algunas especies de los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomices*),

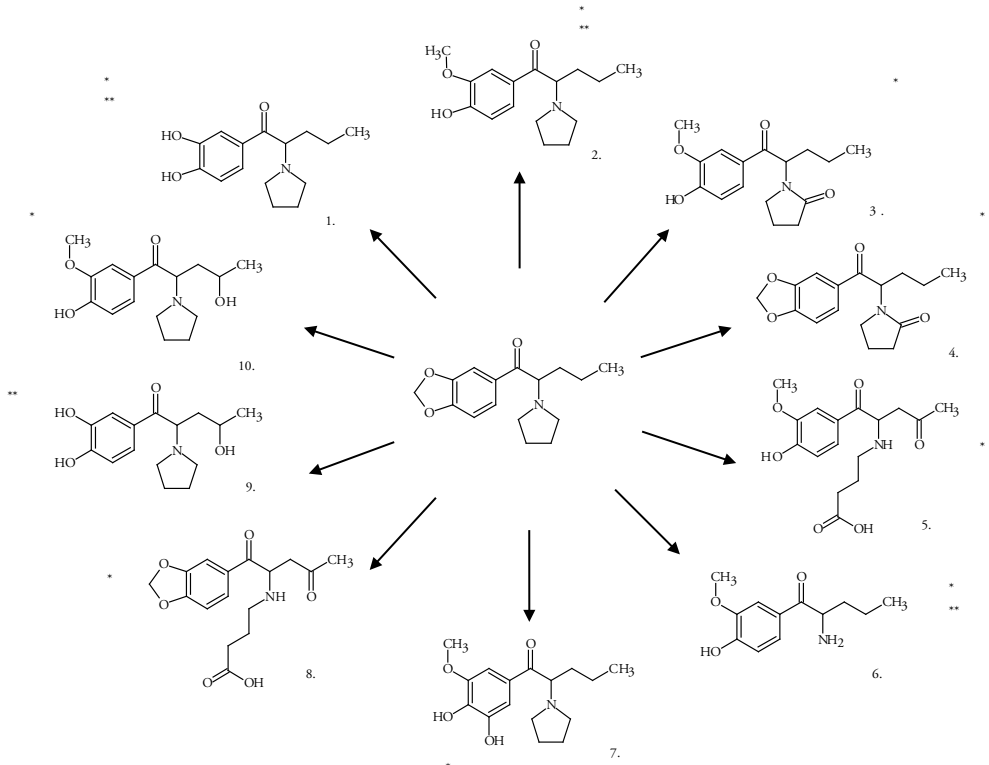


Fig. 1. Metabolitos de MDPV. Metabolitos encontrados en literatura para MDPV empleando cultivos celulares y animales de experimentación. 1. Demetilenil-MDPV(3,4-catecol-PV); 2. Demetilenil-metil-MDPV (4-OH-3-MeO-PV); 3. Demetilenil-metil-oxo-MDPV; 4. oxo-MDPV; 5. Demetilenil-metil-alquil-hidroxi-MDPV; 6. Carboxi-oxo-MDPV; 7. Demetilenil-metil-carboxi-oxo-MDPV; 8. Demetilenil-metil-N,N-bisdealquil-MDPV; 9. Demetilenil-N,N-bisdealquil-MDPV; 10. Demetilenil-oxo-MDPV; 11. Demetilenil-alquil-hidroxi-MDPV; 12. Demetilenil-metil-fenil-hidroxi-MDPV. Nombre dado por Meyer *et al.* [10], entre paréntesis nombre dado por Strano *et al.* [9]. * Adaptado de Meyer *et al.* [10], ** Adaptado de Strano *et al.* [9].

y hongos (*Actinomucor*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Chaetomiun Cunninghamella*, *Curvularia*, *Curvularia*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Heminthosporium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thamnidium*, *Verticillium*, *Whetzelinia*), que pueden ser empleados como modelos de biotransformación [40]. Debido a la similitud entre el sistema de monooxigenasa dependiente del citocromo P450 de los microorganismos y el humano, el patrón de metabolización (metabolitos de fase I y de fase II) encontrado en incubaciones con microorganismos —en la mayoría de los casos— es también similar.

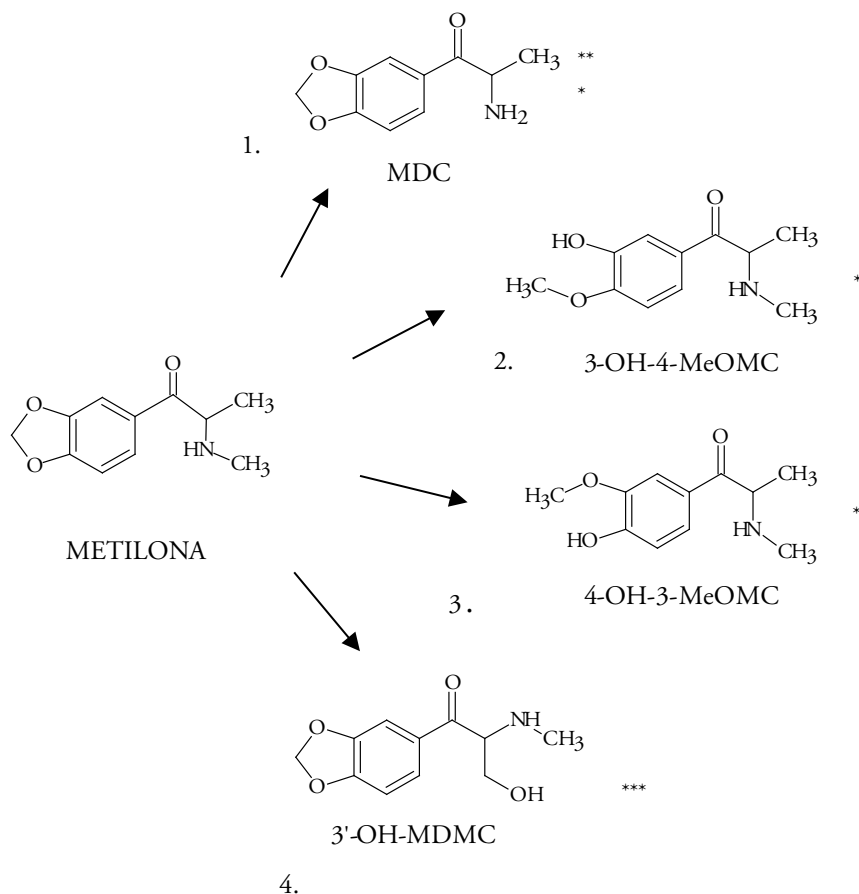


Figura 2. Metabolitos de metilona. Metabolitos encontrados en literatura para metilona empleando cultivos celulares y animales de experimentación. 1. 3,4-metilendioxicatinona (MDC); 2. 3-Hidroxi-4-metoximetcatinona (3-OH-4-MeO-MC); 3. 4-Hidroxi-3-metoximetcatinona (4-OH-3-MeO-MC) o también denominado como HMMC 4. 3'-Hidroxi-metilendioximetcatinona (3'-OH-MDMC). * Adaptado de Kamata *et al.* [14], ** Adaptado de Mueller *et al.* [33], *** Adaptado por López *et al.* [34].

Además, se han descrito numerosas ventajas con el uso de microorganismos como modelos de biotransformación en relación con modelos animales o cultivos celulares, entre las cuales se pueden destacar su bajo costo, la facilidad para llevar a cabo el ensayo, la facilidad para su reproductibilidad, la disponibilidad de un set amplio de microorganismos, la fácil caracterización e identificación de los metabolitos debido a su elevada producción durante el ensayo, y más sencillo comparado con los cultivos celulares [41, 42].

Como microorganismos eucarióticos, los hongos poseen un sistema citocromo P450 que actúa de manera mecánicamente similar al sistema mamario, razón por la cual estos han sido ampliamente utilizados como modelos de biotransformación de diferentes sustancias. Tal vez, uno de los géneros de hongos más ampliamente empleados corresponde al género *Cunninghamella*, y en especial a la especie *C. elegans*, la cual tiene la habilidad de producir hidroxilaciones aromáticas y no aromáticas, carboxilaciones, *N*-oxidaciones, *N*-desalquilaciones, *N*-acetilaciones, metilhidroxilaciones y epoxidaciones, entre otras reacciones [43-47]. *C. elegans* es un hongo zigomiceto del orden mucoral [47], encontrado en suelo, material vegetal y animal, especialmente en el mar Mediterráneo y zonas subtropicales, extensamente empleado como modelo fúngico de biotransformación sobre una amplia gama de xenobióticos [48]. El género *Cunninghamella* contiene 14 especies, siendo las más comunes las especies *C. elegans*, *C. echinulata*, y la especie patógena en humanos y animales, *C. Bertholletiae* [49]. *C. elegans* posee la habilidad para degradar regio y estereo selectivamente diferentes clases de xenobióticos en metabolitos de fase I y fase II, de manera similar al sistema enzimático mamífero. Entre estos pueden ser mencionados varios fármacos [21-25, 50-57], hidrocarburos poliaromáticos y contaminantes [58-62], drogas de abuso [63] y pesticidas [64-66] en metabolitos de fase I y fase II [36-38]. La mayoría de estos trabajos tienen como objetivo primordial el estudio del metabolismo mamario o la preparación de nuevos metabolitos activos, más que el estudio de detoxificación de los xenobióticos. En la biotransformación de xenobióticos por *C. elegans* se ha evidenciado la presencia de diferentes enzimas, dentro de las cuales se pueden destacar citocromo P450 monooxigenasas, incluyendo la familia CYP51, glutatión S-transferasa, aril PAPS sulfotransferasas, UDP-glucoronil transferasas y glucosil transferasas, detectadas en fracciones citosólicas y microsomales [47]. Teniendo en cuenta que el metabolismo de MDPV y metilona ha sido escasamente estudiado, y hasta la fecha no existe ninguna referencia sobre el uso del género *Cunninghamella* como modelo de biotransformación de dichas drogas, se propone su uso como método alternativo a los modelos *in vitro* e *in vivo* que hasta la fecha se han desarrollado.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la escasa bibliografía disponible acerca del metabolismo de MDPV y metilona (cinco artículos para cada sustancia), se determina que los metabolitos principales son 3,4-catecol-PV y 4-OH-3-MeO-PV para MDPV, y 4-OH-3-MeO-MC y 3-OH-4-MeO-MC para metilona. Las técnicas cromatográficas altamente sensibles empleadas para el análisis de metabolitos permiten detectar concentraciones del orden de ng/mL. Los análisis fueron llevados a cabo en modelos *in vivo* e *in vitro*, que incluyen

principalmente microsomas hepáticos, así como animales de experimentación. Hasta el momento de esta revisión no existen referencias sobre el uso especies del hongo *Cunninghamella* para el estudio de metabolismo de MDPV o metilona, constituyendo una alternativa viable, económica y sencilla que podría permitir profundizar en los procesos de biotransformación de estas drogas de abuso.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. UNODC, Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el delito “Informe Mundial sobre las Drogas 2015. Resumen Ejecutivo”, UNODC Research, 2015.
2. UNODC, Afiche: Categorías de nuevas sustancias psicoactivas vendidas en el mercado. Laboratory and Forensic Science, 2014.
3. K.A. Seely, J. Lapoint, J. H. Moran, L. Fattore, Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.*, **39**, 234-243 (2012).
4. J.M. Prosser, L.S. Nelson, The toxicology of bath salts: A review of synthetic cathinones, *J. Med. Toxicol.*, **8**, 33-42 (2012).
5. K. Miotto, J. Striebel, A.K. Cho, C. Wang, Clinical and pharmacological aspects of bath salt use: A review of the literatura and case reports, *Drug Alcohol Depend.*, **132**, 1-12 (2013).
6. K. Liveri, M.A. Constantinou, M. Afxentiou, P. Kanari, A fatal intoxication related to MDPV and pentedrone combined with antipsychotic and antidepressant substances in Cyprus, *Forensic Sci. Int.*, **265**, 160-165 (2016).
7. UNODC, Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances NPS Substance Groups, URL: <https://www.unodc.org/LSS/Substance?testType=NPS>, consultado el 2 de febrero de 2016.
8. S. Gibbons, M. Zloh, An analysis of the ‘legal high’ mephedrone, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **20**, 4135-4139 (2010).

9. S. Strano-Rossi, A.B. Cadwallader, X. de la Torre, F. Botrè, Toxicological determination and *in vitro* metabolism of the designer drug methylenedioxypropylvalerone (MDPV) by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectr.*, **24**(18), 2706-2714 (2010).
10. M.R. Meyer, P. Du, F. Schuster, H.H. Maurer, Studies on the metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxypropylvalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS, *J. Mass Spectrom.*, **45**(12), 1426-1442 (2010).
11. S. Anizan, K. Ellefsen, M. Concheiro, M. Suzuki, K.C. Rice, M.H. Baumann, M.A. Huestis, 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and metabolites quantification in human and rat plasma by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **827**, 54-63 (2014).
12. F.T. Peters, M.R. Meyer, In vitro approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds, *Drug Test. Anal.*, **3**(7-8), 483-495 (2011).
13. S.F. Imam, H. Patel, M. Mahmoud, N. A. Prakash, M.S. King, Bath salts intoxication: A case series, *J. Emerg. Med.*, **45**(3), 361-365 (2013).
14. H.T. Kamata, N. Shima, K. Zaitso, T. Kamata, M. Nishikawa, M. Katagi *et al.*, Simultaneous analysis of new designer drug, methylone, and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Japan J. Forensic Sci. Tech.*, **12**(1), 97-106 (2007).
15. Expert Committee on Drug Dependence, Methylone (bk-MDMA), Critical Review Report, World Health Organization, Geneva, 16-20 June, 2014.
16. A. Dines, D. Wood, P. Dargan, Technical Report on 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (3,4-methylenedioxypropylvalerone, MDPV), Lisbon: European Monitoring Centre for Drug and Addiction EMCDDA, 2014.
17. Boehringer Ingelheim, α -Substituted-ketones and processes for their preparation, British patent, 1969, 23.1:149, 366.
18. M. Coppola, R. Mondola, 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV): Chemistry, pharmacology and toxicology of a new designer drug of abuse marketed online, *Toxicol. Lett.*, **208**, 12-15 (2012).

19. M. Mardal, M. Meyer, Studies on the microbial biotransformation of the novel psychoactive substance methylenedioxypropylvalerone (MDPV) in wastewater by means of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry/mass spectrometry, *Sci. Total Environ.*, **493**, 588-595 (2014).
20. S. Asha, M. Vidyavathi, *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review, *Biotechnol. Adv.*, **27**, 16-29 (2009).
21. L. Sun, H. Huang, L. Liu, D. Zhong, Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(5), 2722-2727 (2004).
22. B. Ma, H. Huang, X. Chen, Y. Sun, L. Lin, D. Zhong, Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*, *Acta Pharmacol. Sin.*, **28**(7), 1067-1074 (2007).
23. D. Zhong, L. Sun, L Liu, H. Huang, Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species, *Acta Pharmacol. Sin.*, **24**(5), 442-447 (2003).
24. J. Moody, D. Zhang, T.M. Heinze, C.E. Cerniglia, Transformation of amoxapine by *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(8), 3646-3649 (2000).
25. Y. Toyokazu, M. Kito, M. Tsujii, N. Toru, Microbial synthesis of a proton pump inhibitor by enantioselective oxidation of a sulfide into its corresponding sulfoxide by *Cunninghamella echinulata* MK40, *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1217-1222 (2001).
26. E. Baydoun, M. Karam, A. Wahab, M.S. Ahmed, M.S. Ahmad, C. Samreen *et al.*, Microbial transformation of nandrolone with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana* and evaluation of leishmaniacidal activity of transformed products, *Steroids*, **88**, 95-100 (2014).
27. Sistema de Alerta tempranas: Detección de nuevas sustancias psicoactivas en Colombia. Bogotá D.C., Observatorio de drogas de Colombia, 2015.
28. M. Meyer, P. Du, F. Schuster, H.H. Maurer, Studies on the metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-propylvalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS, *J. Mass Spectrom.*, **45**(12), 1426-1442 (2010).

29. E. Bertol, F. Mari, R.B. Berto, G. Mannaioni, F. Vaiano, D. Favretto, A mixed MDPV and benzodiazepine intoxication in a chronic drug abuser: Determination of MDPV metabolites by LC-HRMS and discussion of the case, *Forensic Sci. Internat.*, **243**, 149-155 (2014).
30. B. Murray, C. Murphy, M. Beuhler, Death following recreational use of designer drug “bath salts” containing 3,4-methylenedioxypropylone (MDPV), *J. Med. Toxicol.*, **8**(1), 69-75 (2012).
31. C. Xueguo, Simultaneous determination of four designer drugs and their major-metabolites by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, **992**, 1-7 (2015).
32. R. Brenneisen, S. Geissshusler, X. Shorno, Metabolism of cathinone to (-)-norephedrine and (-)-norpseudoephedrine, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 298-300 (1986).
33. D. M. Mueller, K. M. Rentsch, Generation of metabolism 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**(6), 2141-2151 (2012).
34. R. López-Arnau, J. Martínez-Clemente, M. Carbó, D. Pubill, E. Escubedo, J. Camarasa, An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new drug of abuse, methylone, a synthetic cathinone sold as “bath salts”, *Prog. Neuro-Psychoph.*, **45**, 64-72 (2013).
35. C.E. Cerniglia, J.B. Sutherland, S.A. Crow, Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. En: “Microbial Degradation of Natural Products”, Editado por: G. Winkelmann G., VCH, Weinheim, 1992, p. 193-217.
36. M. Hezari, P.J. Davis, 9 Models of mammalian metabolism: N-demethylation of furosemide to yield the mammalian metabolite CSA using *Cunninghamella*, *Drug Metab.*, **20**, 882-888 (1992).
37. D. Zhang, Y. Yang, J. Leakey, C. Cerniglia, Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella*: *Elegans* for the metabolism of xenobiotics, *FEMS Microbiol. Lett.*, 221-226 (1996).
38. R.V. Smith, J.P. Rosazza, Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**(2), 551-558 (1974).

39. R. Azerad, Microbial models for drug metabolism, *Adv. Biochem. Engineer./Biotechnol.*, **63**, 169-218 (1999).
40. C.D. Murphy, Drug metabolism in microorganisms. *Biotechnol. Lett.*, **37** 19-28(2015).
41. S. Asha, M. Vidyavathi, *Cunninghamella*: a microbial model for drug metabolism studies: A review, *Biotechnol. Adv.*, **27**, 16-29 (2009).
42. R.E. Betts, D.E. Walters, J.P. Rosazza, Microbial transformations of antitumor compounds. 1. Conversion of acronycine to 9-hydroxyacronycine by *Cunninghamella echinulata*, *J. Med. Chem.*, **17**, 599-602 (1974).
43. D. Zhang, F.E. Evans, J.P. Freeman, Y. Yang, J. Deck, C.E. Cerniglia, Formation of mammalian metabolites of cyclobenzaprine by the fungus, *Cunninghamella elegans*, *Chem.-Biol. Interact.*, **102**, 79-92 (1996).
44. B.C. Foster, R.T. Coutts, F.M. Pasutto, A. Mozayani, Microbial metabolism of phenelzine and pheniprazine, *Life Sciences*, **42**, 285-292 (1988).
45. D. Zhang, F.E. Evans, J.P. Freeman, B. Duhart, C.E. Cerniglia, Biotransformation of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 1417-1425 (1995).
46. D. Zhang, Y. Yang, J.E. Leakey, C.E. Cernigli, Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics, *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 221-226 (1996).
47. Y.Z. Zhu, Y.S. Keum, L. Yang, H. Lee, H. Park, J.H. Kim, Metabolism of a fungicide mepanipyrim by soil fungus *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, *J. Agricult. Food Chem.*, **58**, 12379-12384 (2010).
48. S. Asha, M. Vidyavathi, *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - A review, *Biotechnol. Adv.*, **27**, 16-29 (2009).
49. D. Zhang, F.E. Evans, J.P. Freeman, Y. Yang, J. Deck, C.E. Cerniglia, Formation of mammalian metabolites of cyclobenzaprine by the fungus, *Cunninghamella elegans*, *Chem.-Biol. Interact.*, **102**, 79-92 (1996).
50. D. Zhang, F.E. Evans, J.P. Freeman, B. Duhart, C.E. Cerniglia, Biotransformation of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*, *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 1417-1425 (1995).

51. J.D. Moody, J.P. Freeman, P.P. Fu, C.E. Cerniglia, Biotransformation of mirtazapine by *Cunninghamella elegans*, *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 1274-1279 (2002).
52. B. Ma, H.H. Huang, X.Y. Chen, Y.M. Sun, L.H. Lin, D.F. Zhong, Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*, *Acta Pharmacol. Sin.*, **28** 1067-1074 (2007).
53. J.D. Moody, D. Zhang, T.M. Heinze, C.E. Cerniglia, Transformation of amoxapine by *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3646-3649 (2000).
54. J.D. Moody, J.P. Freeman, C.E. Cerniglia, Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*, *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1157-1164 (1999).
55. D. Zhang, J.P. Freeman, J.B. Sutherland, A.E. Walker, Y. Yang, C.E. Cerniglia, Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 798-803 (1996).
56. D. Zhang, E.B. J.R. Hansen, J. Deck, T.M. Heinze, A. Henderson, W.A. Korfmacher, C.E. Cerniglia, Fungal transformations of antihistamines: Metabolism of cyproheptadine hydrochloride by *Cunninghamella elegans*, *Xenobiotica*, **27** 301-315 (1997).
57. C.E. Cerniglia, S.K. Yang, Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 119-124 (1984).
58. J.V. Pothuluri, J.P. Freeman, F.E. Evans, C.E. Cerniglia, Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3654-3659 (1992).
59. C.E. Cerniglia, D.T. Gibson, Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 363-370 (1977).
60. C.E. Cerniglia, K.J. Lambert, D.W. Miller, J.P. Freeman, Transformation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 111-118 (1984).
61. C.E. Cerniglia, P.P. Fu, S.K. Yang, Metabolism of 7-methylbenz[a]anthracene and 7-hydroxymethylbenz[a]anthracene by *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 682-689 (1982).

62. S. Watanabe, U. Kuzhiumparambil, Z. Winiarski, S. Fu. Biotransformation of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073 and AM2201 by *Cunninghamella elegans*, *Forensic Sci. Internat.*, **261**, 33-42 (2016).
63. Y.Z. Zhu, Y.S. Keum, L. Yang, H. Lee, H. Park, J.H. Kim, Metabolism of a fungicide mepanipyrim by soil fungus *Cunninghamella elegans* ATCC36112, *J. Agricult. Food Chem.*, **58**, 12379-12384 (2010).
64. M. Hangler, B. Jensen, S Ronhede, S.R. Sorensen, Inducible hydroxylation and demethylation of the herbicide isoproturon by *Cunninghamella elegans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **268**, 254-260 (2007).
65. J.V. Pothuluri, F.E. Evans, D.R. Doerge, M.I. Churchwell, C.E. Cerniglia, Metabolism of metolachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*, *Arch. Environ. Contaminat. Toxicol.*, **32**, 117-125 (1997).
66. D. Zhang, Y. Yang, J.E. Leakey, C.E. Cerniglia, Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics, *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 221-226 (1996).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

E.A. Silva, J.A. Martínez, Antecedentes del estudio metabólico de MDPV y metilona. Propuesta de un modelo de biotransformación a través de hongos del género *Cunninghamella*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(3), 484-502 (2016).