



FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ADMINISTRACIÓN DE DERIVADOS  
ANFETAMÍNICOS 4-TIO-SUSTITUIDOS *IN VIVO* SOBRE EL SISTEMA  
CARDIOVASCULAR.**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

**DANIELA CAMILA RABY IBACACHE**

Director de Tesis: **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**  
(Universidad de Valparaíso)

Co-director de Tesis: **Dr. Miguel Reyes-Parada**  
(Universidad de Santiago de Chile)

**2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias al financiamiento de los proyectos FONDECYT N°116-0398 del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate y N°117-0662 del Dr. Miguel Reyes-Parada.

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mis papás Fernando y Marcela, quienes me han guiado e impulsado a lograr todos mis sueños, a través de la constancia y esfuerzo, a mis hermanos Bárbara, Marcela, Fernando y Paulina, por ser el mejor equipo de apoyo. Además, este trabajo esta dedicado a la memoria de mi abuelo Rainer J. Puvogel Hirsch.

<b>INDICE</b>	
<b>INDICE DE IMÁGENES Y TABLAS</b> .....	1
<b>RESUMEN.</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.1 Adicción y Sistema de la Recompensa.....	6
1.2 Anfetamina y sus derivados sintéticos.....	8
1.2.1 Anfetamina:.....	8
1.2.2 Derivados Anfetamínicos: .....	10
1.3 Efectos Adversos de Anfetamina y sus Derivados: Efectos Cardiovasculares. .	11
1.4 Efectos Adversos de Derivados Anfetamínicos: Efectos en la temperatura corporal.....	12
1.5 Metiltioanfetamina (MTA).....	13
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
3.1 Objetivo General.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
4.1 Animales.....	17
4.2 Reactivos.....	17
4.3 Procedimientos Experimentales .....	18
4.3.1 Anestesia: .....	18
4.3.2 Protocolo de Medición de Presión Arterial y Frecuencia Cardíaca: .....	18
4.3.3 Selección de Datos: .....	21
4.4 Cálculos y Análisis Estadísticos .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	23
5.1 Frecuencia Cardíaca basal e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol. ....	23

5.2	Presión Arterial Sistólica y Diastólica Pre-Salino, Post- Salino, Pre-Droga e inducida por MTA y derivados 4 y alquil sustituidos, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol. ....	25
5.3	Presión Arterial Media (PAM) Pre-Salino, Post- Salino, Pre-Droga e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol. ....	28
5.4	Temperatura Corporal Pre-Salino, Post- Salino, Pre-Droga e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol. ....	30
5.5	Comparación de frecuencia cardiaca inducida por Anfetamina, versus la administración de MTA, ETA, PTA y MT-But, en ratas hembras y machos. ....	32
5.6	Comparación de la presión arterial sistólica inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos. ....	34
5.7	Comparación de la presión arterial diastólica inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos. ....	36
5.8	Comparación de la presión arterial media inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos. ....	38
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
6.1	Consideraciones metodológicas: Temperatura de la cola del animal. ....	40
6.2	Consideraciones metodológicas: Hidrato de cloral, depresor del sistemacardiovascular. ....	41
6.3	Efectos sobre la frecuencia cardiaca por la administración de MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoprenalina en ratas hembras y machos. ....	41
6.4	Efectos sobre la presión arterial por la administración de MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoprenalina en ratas hembras y machos. ....	43
6.5	Relación Estructura Actividad de los derivados Anfetamínicos. ....	44
6.6	Efectos sobre la temperatura corporal por la administración de MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoprenalina en ratas hembras y machos. Posible síndrome serotoninérgico. ....	46
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>49</b>

## INDICE DE IMÁGENES Y TABLAS

<b>Figura 1. Circuito de la Recompensa .....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 2. Estructuras Derivadas de la Feniletilamina .....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3. Mecanismo de acción de Anfetamina. ....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 4. Estructuras Derivadas de MTA.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 5. Tensiómetro no invasivo CODA™ .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 6. Protocolo y selección de datos .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 7. Frecuencia cardiaca basal e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e isoproterenol. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 8. Presión arterial Sistólica y Diastólica Pre-Salino, Post- Salino, Pre- Droga e inducida por MTA y derivados 4 y alquil sustituidos, Anfetamina, Adrenalina e isoproterenol.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 9. Presión Arterial Media (PAM) Pre- Salino, Post- Salino, Pre-Droga e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 10. Temperatura Corporal Pre- Salino, Post- Salino, Pre- Droga e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 11. Comparación de Frecuencia cardiaca inducida por Anfetamina, versus la administración de MTA, ETA, PTA y MT-But, en ratas hembras y machos. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 12. Comparación de la Presión arterial Sistólica inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But, en ratas hembras y machos.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 13. Comparación de la presión arterial diastólica inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 14. Comparación de la presión arterial media inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos .....</b>	<b>38</b>

## RESUMEN

Fármacos derivados de anfetamina han sido utilizados para el tratamiento de patologías como la narcolepsia, el déficit atencional con hiperactividad y la obesidad. Estos fármacos han demostrado ser muy efectivos. Sin embargo, los efectos adversos que producen, especialmente a nivel cardiovascular, hacen que se descontinúe su uso. Actualmente no se han desarrollado nuevos fármacos derivados anfetamínicos para las patologías antes mencionadas con un mejor perfil de seguridad, lo que plantea para la química médica un desafío farmacológico y terapéutico muy interesante. En este contexto, nuestro grupo de investigación se ha propuesto evaluar la actividad cardiovascular *in vivo* de una serie homologa de derivados anfetamínicos 4-tio sustituidos (MTA, ETA y PTA) y de un derivado 4-metiltio sustituido en la cadena alquílica (Mt-But), utilizando un tensiómetro no invasivo CODA™ para el registro de parámetros cardiovasculares. Nuestros resultados demostraron que la administración intraperitoneal de los derivados 4-tio sustituidos producen una activación cardíaca, evidenciada como un aumento en frecuencia cardíaca y presión arterial. Sin embargo, estos aumentos fueron significativamente menores a los observados con la administración de anfetamina y fármacos adrenérgicos como adrenalina e isoprenalina. Cabe señalar, que MT-But no afectó los parámetros cardiovasculares antes señalados. Nuestros resultados demuestran que derivados anfetamínicos pueden ser diseñados con un mejor perfil de seguridad cardiovascular. Sin embargo, estudios posteriores deben ser realizados para demostrar su eficacia a nivel del Sistema Nervioso Central,

especialmente para evaluar si las sustituciones afectan la liberación de neurotransmisores dependiente de transportadores de monoaminas o a través de la inhibición de rutas metabólicas de neurotransmisores monoaminérgicos.

**ABSTRACT**

Amphetamine derivative drugs have been used for the treatment of pathologies like narcolepsy, attentional deficit with hyperactivity and obesity. These drugs have demonstrated to be very effective. Nevertheless, the adverse effects that they produce, especially on the cardiovascular level, make their use to be terminated. Actually, new drugs amphetaminic derivatives haven't been developed to treat the pathologies mentioned with a great safety profile, which is a very big pharmacological and therapeutic challenge for the medical chemistry and also very interesting. In this context, our investigation group have proposed to evaluate the cardiovascular activity in vivo of the homologue series of amphetaminic derivatives 4-thio substituted (MTA, ETA y PTA) and one derivative 4-methyl thio substituted in the alkylic chain (MT-but), using a non-invasive tensiometer CODA™ for the recording of the cardiovascular parameters. Our results showed that the intraperitoneal administration of the amphetaminic derivatives 4-thio substituted produced a cardiac activation, evidenced as an increase in cardiac frequency and arterial pressure. However, this increases were significantly minor to the ones observed with the administration of amphetamine and adrenergic drugs like adrenaline and isoprelin. MT-But did not affect the cardiovascular parameters mentioned before. Our results demonstrate that amphetaminic derivatives can be designed with a better cardiovascular safety profile. Nonetheless, posterior studies should be made to demonstrate its efficacy at central nervous system level, especially to evaluate if this substitutions affect the

neurotransmitter release depending on the monoamine transporters or through the inhibition of metabolic pathways of monoaminergic neurotransmitters.

## 1. INTRODUCCIÓN

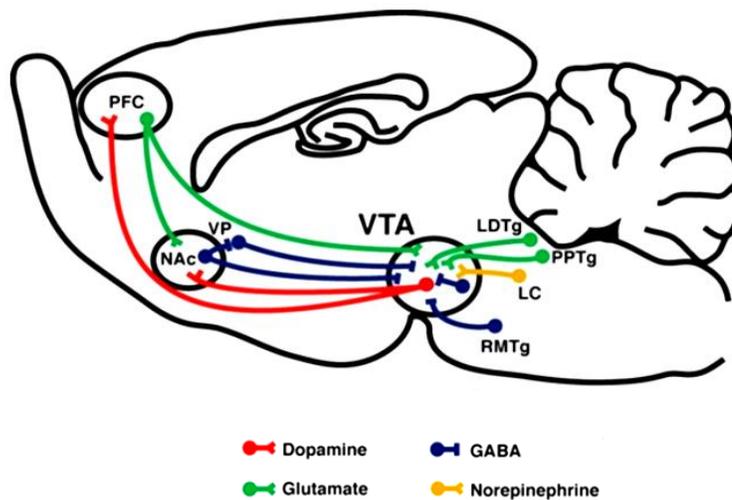
### 1.1 Adicción y Sistema de la Recompensa.

La adicción o dependencia es un cuadro clínico patológico, caracterizado por una compulsión por buscar y tomar la sustancia adictiva, perdiendo el límite en la ingesta de la droga, y donde se presenta un estado emocional negativo (disforia, ansiedad e irritabilidad), durante periodos de abstinencia [1-3]. Las drogas de abuso producen refuerzos positivos o negativos. Los primeros se manifiestan por una sensación de tensión o excitación antes de cometer el acto impulsivo (consumir la sustancia adictiva) y obtener placer, mientras que los refuerzos negativos se presentan como un estado de estrés y ansiedad, por no tener la droga a disposición, provocando trastornos compulsivos [2, 4] . La transición a la adicción desde el uso recreacional de drogas de abuso, implica cambios en la neuroplasticidad cerebral, producto de un consumo repetitivo de la droga, determinando así la tolerancia y el síndrome de abstinencia. Dicho síndrome consiste en elementos motivacionales claves como la irritabilidad crónica, el dolor emocional, el malestar general, la pérdida de la motivación, entre otros síntomas [1, 4, 5] . En este contexto, el “*craving*” o avidez corresponde a los deseos urgentes por buscar y obtener la droga, llevando así a una recaída en el consumo [2].

A nivel neurofisiológico esta plasticidad observada en el proceso adictivo involucra varias áreas cerebrales, en donde neurotransmisores como la dopamina (DA) y el glutamato (GLU), participan en el fortalecimiento o debilitamiento de las sinapsis del

circuito de la recompensa [6]. El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico o circuito de la recompensa, es el circuito neuroanatómico responsable de la percepción final del placer [7] frente a diversos estímulos, tales como la ingesta de alimentos, líquidos y el sexo, entre otros [8-10]. Neuroquímicamente los recompensantes naturales y las drogas de abuso producen liberación de DA en el Núcleo Accumbens (NAcc) y en la corteza prefrontal [1, 5]. La liberación de DA en estas áreas está regulada por interneuronas GABAérgicas del área tegmental ventral (VTA), que en ausencia de estímulos recompensantes inhiben la liberación de DA. Por otro lado, el fortalecimiento sináptico inducido por las drogas de abuso en NAcc se ha asociado a la inserción de receptores AMPA y NMDA para GLU, a través de la activación de receptores dopaminérgicos que llevan a la activación del factor transcripcional CREB [11].

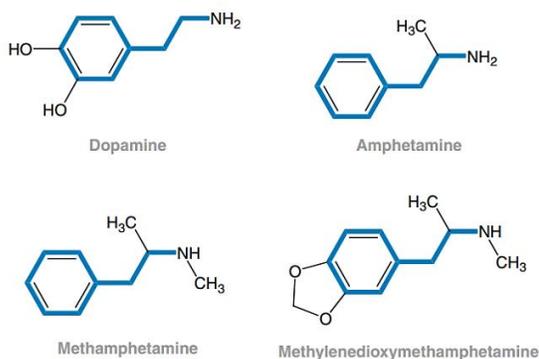
**Figura 1. Circuito de la Recompensa.** Figura tomada de Morikawa y cols. [12]



## 1.2 Anfetamina y sus derivados sintéticos.

1.2.1 **Anfetamina:** Su nombre IUPAC corresponde a 1-fenilpropan-2-amina, pero su D.C.I. de anfetamina deriva del acrónimo en inglés “**α-methyl-phenethyl-amine**”. Los derivados anfetamínicos pertenece a un conjunto de compuestos que comparten como estructura base un anillo fenilo, unido mediante una cadena lateral de 2 carbonos a un grupo amino (Fig.2).

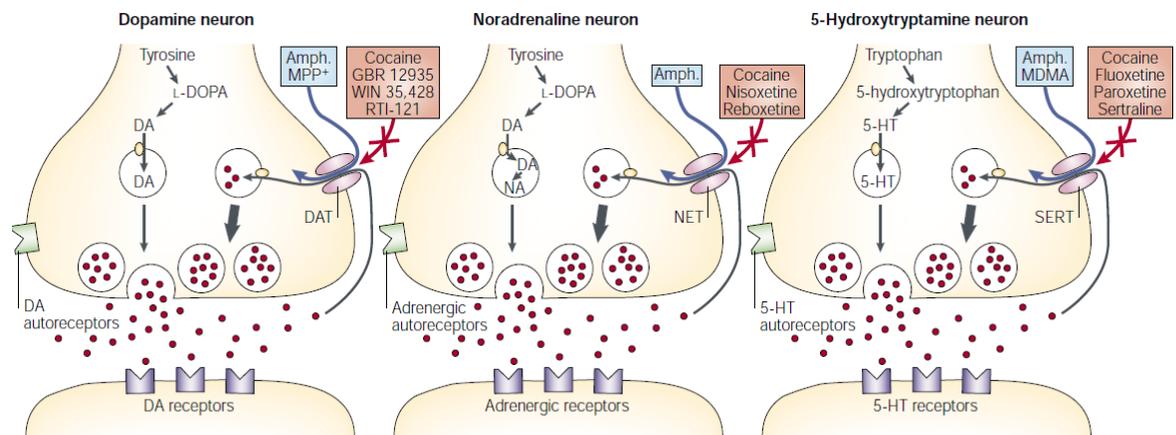
Figura 2. Estructuras Derivadas de la Feniletilamina [13].



La anfetamina como tal es considerada una droga psicoestimulante, que produce la liberación de monoaminas, como DA, Noradrenalina (NA) y Serotonina (5-HT), favoreciendo una estimulación generalizada del Sistema Nervioso Central (SNC), que se caracteriza por euforia, aumento de la actividad locomotora y supresión del apetito [13]. Gran parte de estos efectos se producen a través del aumento de los niveles de DA en el espacio extracelular, mediante los posibles 3 mecanismos siguientes [14]:

- Sustrato del transportador de DA (DAT), por lo que inhibe de manera competitiva la recaptura presináptica de este neurotransmisor.
- Facilita el movimiento de DA hacia el citoplasma axonal mediante el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2).
- Promueve el transporte reverso mediado por DAT de DA en la hendidura sináptica, independiente de la liberación vesicular inducida por el potencial de acción.

**Figura 3. Mecanismo de acción de Anfetamina.**



**Figura 3:** Figura tomada de Torres G. y cols [15]. Mecanismo de amfetamina (Amph) en neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas.

Los efectos recompensantes de esta droga están asociados al aumento de los niveles extracelulares de DA y la prolongación de la señalización dopaminérgica en áreas como el cuerpo estriado dorsolateral y ventral [14]. Terapéuticamente, la amfetamina fue comercializada como descongestionante nasal en 1932, pero actualmente es utilizada

en el tratamiento del síndrome de déficit atencional con hiperactividad (TDAH), en el tratamiento de la narcolepsia y como coadyuvante en el tratamiento de la obesidad [16]. Sin embargo, debido al estado de euforia excesivo y el alto potencial de dependencia que produce, su uso se ha limitado en el último tiempo, a pesar de que es un fármaco altamente efectivo.

**1.2.2 Derivados Anfetamínicos:** Actualmente se ha descrito una gran cantidad de derivados anfetamínicos sintéticos, donde sus actividades farmacológicas dependen de su patrón de sustitución. Por ejemplo, anfetaminas sustituidas en la posición 4 del anillo aromático, poseen una potente actividad serotoninérgica (entactógena) [17, 18] y menos actividad psicoestimulante que la anfetamina, debido principalmente a su menor potencia dopaminérgica [19]. En este sentido, los derivados anfetamínicos han sido clasificados en 3 grupos dependiendo de su relación estructura actividad y sus efectos farmacológicos:

- **Psicoestimulantes:** Derivados anfetamínicos caracterizados por una potente liberación de DA y en menor grado de 5-HT. Estructuralmente corresponden a compuestos sin sustitución del anillo aromático y la anfetamina es el compuesto característico de este grupo.
- **Entactógenos/Empatógenos:** El compuesto característico de este grupo es el 3,4-metilendioxitmetanfetamina (MDMA), el cual produce una mayor liberación de 5-HT que DA. Algunas de estas drogas entactógenas son aquellas mono

sustituidas en la posición 4 del anillo aromático, como por ejemplo 4-metiltioanfetamina (MTA).

- **Alucinógenos:** Estos compuestos se caracterizan por presentar una tri-sustitución en el anillo aromático. Un derivado anfetamínico prototipo de este grupo es el 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina (DOM), el cual no produce liberación de 5-HT ni de DA, pero actúa como agonista de los receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>.

### 1.3 Efectos Adversos de Anfetamina y sus Derivados: Efectos Cardiovasculares.

El uso de anfetaminas psicoestimulantes, como la propia anfetamina, metanfetamina y otros derivados se ha relacionado con efectos adversos a nivel del sistema cardiovascular, siendo estos efectos dependientes de la cronicidad en su uso y de las dosis empleadas. Estas manifestaciones sintomatológicas se relacionan principalmente con la activación del Sistema Nervioso Autónomo, especialmente de su rama Simpática [20, 21]. Este efecto simpaticomimético se produce principalmente por el aumento de los niveles extracelulares de NA producidos por la inhibición del transportador presináptico para este neurotransmisor (NET). Los efectos producidos por el aumento de los niveles extracelulares de NA son el aumento de la frecuencia cardíaca (palpitaciones y arritmias), aumento de la fuerza de contracción cardiovascular y vasoconstricción, que en su conjunto llevan a un aumento del gasto cardíaco y por ende a un aumento de la presión arterial (hipertensión) [13, 22]. La hipertensión sostenida en el uso crónico de anfetaminas, llevaría a hipertrofia cardíaca, síndrome

coronario agudo e incluso muerte súbita [22]. Se estima que el principal mecanismo del daño a nivel cardiovascular producido por psicoestimulantes son los cambios vasoespásticos e isquémicos que llevan a daño directo sobre los miocitos por el exceso de liberación de catecolaminas endógenas, especialmente de NA [17]. En este contexto, dexfenfluramina y sibutramina, derivados anfetamínicos utilizados como fármacos anorexígenos, fueron retirados del mercado porque en estudios de Fase 4 demostraron producir eventos cardiovasculares graves como fibrosis isquémica y valvulopatías, que producen miocardiopatía dilatada [23, 24]. Sin embargo, a través del diseño racional de nuevos derivados anfetamínicos que reduzcan la aparición de este tipo de efectos adversos, se dispondría de herramientas terapéuticas particularmente eficaces para tratar patologías altamente prevalentes como la obesidad, la narcolepsia y el TDAH.

#### **1.4 Efectos Adversos de Derivados Anfetamínicos: Efectos en la temperatura corporal.**

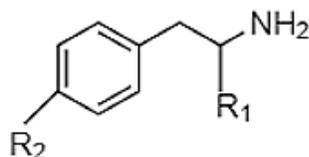
Se ha determinado que drogas entactógenas, como MTA y MDMA producen un aumento de la temperatura corporal (hipertermia) en ratones, lo que se ha asociado principalmente a su componente serotoninérgico e interacción con receptores 5-HT<sub>2</sub>, y secundariamente a través de un aumento de dopamina [25]. Además, se ha observado que a dosis bajas, MTA genera un efecto opuesto al antes mencionado, es decir produce una disminución de la temperatura corporal, al igual que lo observado luego de inyecciones intraperitoneales de dextroanfetamina en ratas [26].

### 1.5 Metiltioanfetamina (MTA).

MTA o “*flatliner*” es un derivado anfetamínico entactógeno (considerada la droga del abrazo), que posee en su estructura química una sustitución metil-tio en la posición 4 del anillo aromático. MTA cuenta con una potencia serotoninérgica significativamente mayor que anfetamina, no presentando características neurotóxicas como 4-cloroanfetamina (PCA) o MDMA [17, 18]. Su mecanismo de acción serotoninérgico se basa en el bloqueo selectivo del transportador de 5-HT (SERT), junto a una potente inhibición de la monoaminoxidasa-A (MAO<sub>A</sub>) [27]. Sin embargo, también ha sido caracterizado un efecto dopaminérgico significativo, mediado principalmente por el bloqueo de DAT [28]. Farmacológicamente, el MTA tiene un potencial terapéutico como antidepresivo. Sin embargo, genera reacciones adversas importantes como la aparición del Síndrome Serotoninérgico, caracterizado por náuseas, nistagmo, hipertermia, sed, temblores, confusión y pérdida de la conciencia, entre otros [18]. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la activación del sistema dopaminérgico por MTA produce conductas tipo adictivas en animales [28, 29]. A nivel cardiovascular, se ha demostrado *ex-vivo* que MTA produce contracción aórtica, mediante un componente noradrenérgico [29, 30]. Sin embargo, el derivado *N,N*-dimetilado de MTA (*N,N*-dimetil-metiltioanfetamina) no produce contractibilidad aórtica, pero mantiene su potencial dopaminérgico [28] y serotoninérgico [31]. En este contexto, la búsqueda de nuevos derivados de MTA que mantengan las propiedades psicoestimulantes y/o entactógenas, pero con un mejor perfil de seguridad cardiovascular ha sido el objetivo

de investigación de los Drs. Sotomayor-Zárate y Reyes-Parada, durante los últimos 8 años. En este sentido, el desarrollo de esta tesis se basó en la evaluación de efectos cardiovasculares *in-vivo* de una serie homóloga de derivados 4 sustituidos de MTA, como etil-tioanfetamina (ETA), propil-tioanfetamina (PTA), y del derivado alquil sustituido de MTA, p-Metiltio-fenil-2-butanamina (MT-But) (ver figura 4). Para cumplir con este objetivo se utilizó el tensiómetro no invasivo CODA™, el cual permite medir presión arterial sistólica, diastólica, presión arterial media, frecuencia cardiaca y temperatura en animales.

**Figura 4. Estructuras Derivadas de MTA**



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(±) -MTA	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> S
(±) -ETA	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> S
(±) -PTA	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> S
(±) -MT-But	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> S

**Figura 4:** Estructuras de derivados de 4-MTA, ETA, PTA y MT-But.

## 2. HIPOTESIS

Con los antecedentes antes mencionados la hipótesis planteada en esta tesis fue siguiente: ***“MTA y sus derivados 4 y alquil sustituidos producen una menor activación cardiovascular in vivo (presión arterial sistólica, diastólica, presión media y frecuencia cardíaca), que anfetamina y agonistas adrenérgicos no selectivos (adrenalina e isoprenalina)”***. La racional de esta hipótesis se basa en estudios previos publicados por nuestro laboratorio donde se demostró *ex-vivo*, que N,N-Dimetil-metiltioanfetamina no produce contractibilidad aortica en anillos arteriales sin endotelio [29].

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Estudiar los efectos cardiovasculares y sobre la temperatura corporal *in vivo* producidos por la administración aguda de MTA, derivados 4 y alquil sustituidos de MTA, anfetamina, adrenalina e isoprenalina.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estudiar los efectos de la administración intraperitoneal de MTA, derivados 4 y alquil sustituidos de MTA, anfetamina, adrenalina e isoprenalina sobre la presión sistólica, diastólica, presión arterial media y frecuencia cardiaca en ratas anestesiadas usando el tensiómetro no invasivo CODA™ para roedores.
- Estudiar los efectos de la administración intraperitoneal de MTA, derivados 4 y alquil sustituidos de MTA, anfetamina, adrenalina e isoprenalina sobre la temperatura corporal en ratas anestesiadas usando el tensiómetro no invasivo CODA™ para roedores con termómetros integrados anal y ambiental.

*Cabe señalar que se utilizaron ratas anestesiadas para evitar la activación endógena del Sistema Nervioso Simpático (liberación de NA en órgano efector) que afectaría las mediciones de presión arterial y frecuencia cardiaca cada vez que se insufla aire dentro del manguito puesto en la cola del animal.*

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultas (65 a 70 días de edad) de ambos sexos que fueron mantenidas desde la fecha del destete (día postnatal 21) en una sala de mantención para animales del Instituto de Fisiología con temperatura ( $22 \pm 2$  °C) y humedad ambiental ( $55 \pm 5$  %) controladas, bajo ciclos de luz-oscuridad (12: 12 horas), y agua y comida *ad libitum*. Los animales destetados fueron agrupados por sexo y mantenidos en las condiciones anteriormente señaladas hasta la fecha del experimento. Una vez terminado el experimento los animales fueron eutanasiados con una guillotina para animales menores y los cuerpos almacenados en un refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que la empresa responsable retirara los desechos biológicos para incineración. En esta investigación se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

### 4.2 Reactivos

4-metil-tioanfetamina (MTA), 4-etil-tioanfetamina (ETA), 4-propil-tioanfetamina (PTA), 4-metil-tio-fenil-2-butanamina (Mt-But) todas como clorhidrato fueron sintetizadas por el Dr. Patricio Iturriaga-Vásquez (Laboratorio de Farmacoquímica, Universidad de la Frontera) de acuerdo a ruta de síntesis publicada previamente [32]. Anfetamina sulfato fue adquirida a Laboratorio Chile S.A. (Registro Sanitario ISPCH F-1386/13). Adrenalina e Isoprenalina (Isoproterenol) clorhidrato fueron adquiridos a Laboratorio Biosano S.A. (Registros Sanitarios ISPCH F-5477/15 y F-7661/16, respectivamente).

### 4.3 Procedimientos Experimentales

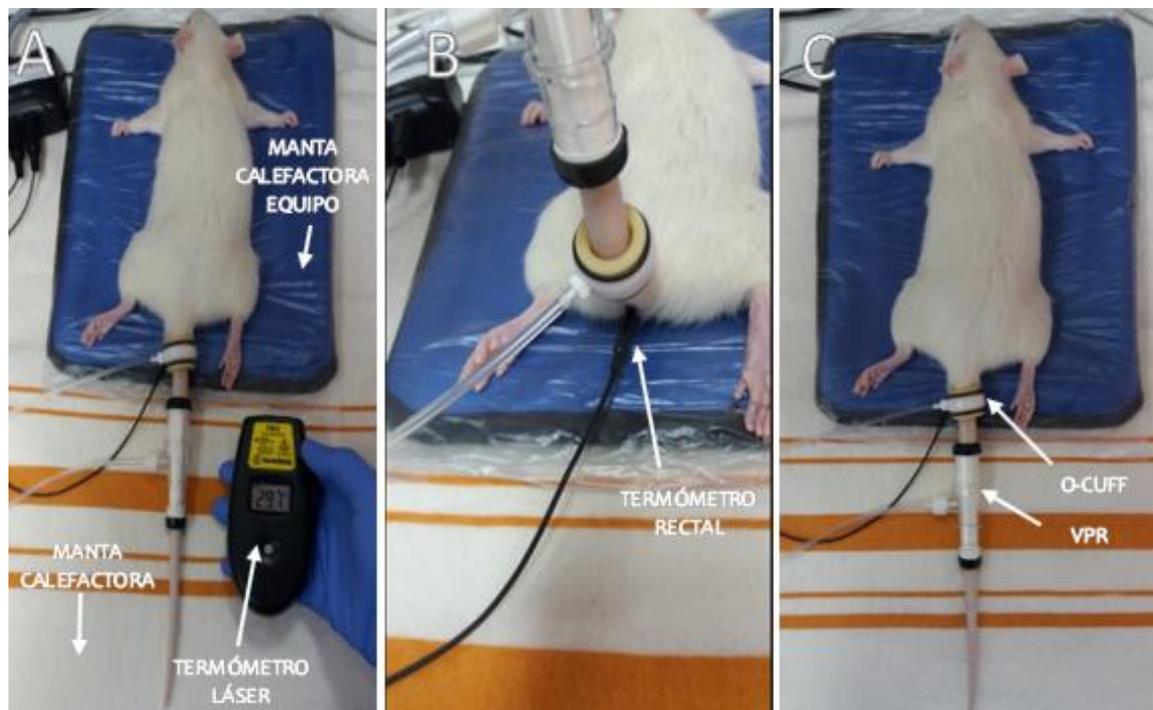
**4.3.1 Anestesia:** Los animales fueron anestesiados de manera profunda, utilizando Hidrato de cloral (320 mg/kg, i.p.), luego fueron ubicados sobre una manta calefactora, que se encontraba previamente programada para mantener la temperatura corporal del animal en  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Un cuarto de la dosis inicial de Hidrato de Cloral fue administrada como mantención cada 40 minutos para así mantenerlo anestesiado durante el transcurso de todo el procedimiento.

**4.3.2 Protocolo de Medición de Presión Arterial y Frecuencia Cardíaca:** A los animales previamente anestesiados, se les colocó en la cola 2 *cuff* de tensiómetro no invasivo CODA™ (Figura 4), el cual permite medir signos vitales como presión arterial, frecuencia cardíaca, temperatura corporal, flujo y volumen sanguíneo en la cola de ratas, ratones, jerbos y otros animales pequeños. Utilizando el principio de registro de presión volumétrica (VPR), el equipo CODA™ realiza de manera automática mediciones múltiples y simultáneas de los 6 parámetros fisiológicos antes mencionados. Además, el equipo posee un sistema de registro de temperatura mediante el uso de un termómetro rectal y un termómetro en la manta calefactora que permite regular la temperatura óptima del animal, para así evitar una vasoconstricción a nivel de la cola, lo cual impide obtener resultados. El equipo CODA™ fue programado para entregar resultados cada 60 segundos durante todo el procedimiento.

El protocolo de medición consistió en registrar datos basales del animal anestesiado durante 25 minutos; luego se inyectó solución salina fisiológica (1 mL/kg, i.p.) para

luego tomar registro durante los siguientes 15 minutos. Posteriormente se inyectó por vía i.p. la dosis de mantención de la anestesia registrando los parámetros vitales durante 10 minutos. Después de esto, se inyectaron grupos de animales distintos con las drogas a estudiar en una dosis de 3 mg/kg i.p. para anfetamina, MTA, ETA, PTA y MT-But, para continuar con el registro de parámetros cardiovasculares durante otros 30 minutos. Además, se utilizaron como controles positivos adrenalina (un agonista adrenérgico no selectivo) e isoprenalina (un agonista  $\beta$  adrenérgico) que aumentan la presión arterial y frecuencia cardiaca en los animales. Una vez finalizado el protocolo experimental, el animal fue eutanasiado con una guillotina para animales menores.

**Figura 5. Tensiómetro no invasivo CODA™**

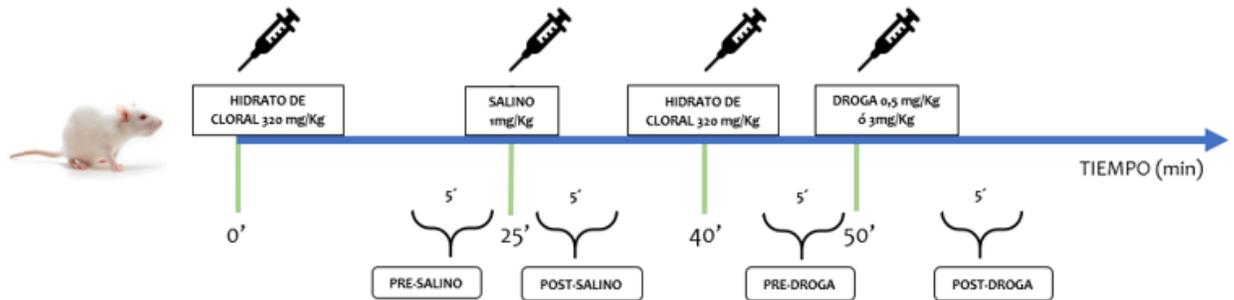




**Figura 5:** Figura de Equipo CODA. A) Animal sobre manta incluida por el equipo, debajo de esta se encuentra la manta para mantener la temperatura de la cola, además se observan ambos CUFFs insertados en la cola del animal y termómetro láser utilizado de forma aleatoria durante el experimento, para evaluar temperatura de la cola del animal. B) Termómetro rectal ubicado en su posición adecuada para registrar temperatura corporal durante todo el procedimiento. C) Animal sobre ambas mantas con ambos CUFFs insertados y termómetro rectal ubicado. D) Se observa animal conectado por ambos CUFFs, termómetro rectal con comunicación al equipo, el cual está programado para entregar registros cada 1 minuto.

**4.3.3 Selección de Datos:** Fueron considerados para el análisis estadístico los datos que se obtuvieron durante los 5 minutos previos a la inyección de la solución salina fisiológica como valores basales pre-salinos. Los valores post-salinos fueron registrados durante 5 minutos posterior a la inyección de solución salina fisiológica. De igual manera 5 minutos antes de la inyección de cada una de las drogas se registraron los parámetros basales pre-droga. Diez minutos post inyección de la droga, se registró durante 5 minutos los parámetros cardiovasculares antes mencionados. Cabe señalar, que se decidió esperar 10 minutos antes de registrar los efectos cardiovasculares de las drogas, ya que considerando la absorción y distribución de las mismas podemos suponer que se alcanzaron concentraciones plasmáticas efectivas. Esta suposición se basó en experimentos donde inyectando por vía i.p. MTA y N,N-Dimetil-MTA se observó un aumento de los niveles extracelulares de DA y 5-HT en SNC (a través de la inhibición del DAT) a los 10 min post-inyección [28, 31]. Este efecto neuroquímico reflejaría concentraciones cerebrales activas de las drogas, que se asociarían a concentraciones plasmáticas efectivas.

**Figura 6. Protocolo y selección de datos**



**Figura 6:** Figura de protocolo llevado a cabo con cada animal, junto a la selección de datos, siendo esta 5 min antes de la inyección del vehículo de las drogas (salino), luego 5 min post inyección de salino, para luego seleccionar 5 min previo a la inyección de la droga y finalmente contar con 5 registros luego de 10 minutos posteriores a la inyección de la droga, ya que se considera el tiempo de absorción de la droga en cuestión.

#### 4.4 Cálculos y Análisis Estadísticos

Los resultados fueron expresados como valor promedio  $\pm$  error estándar medio (eem).

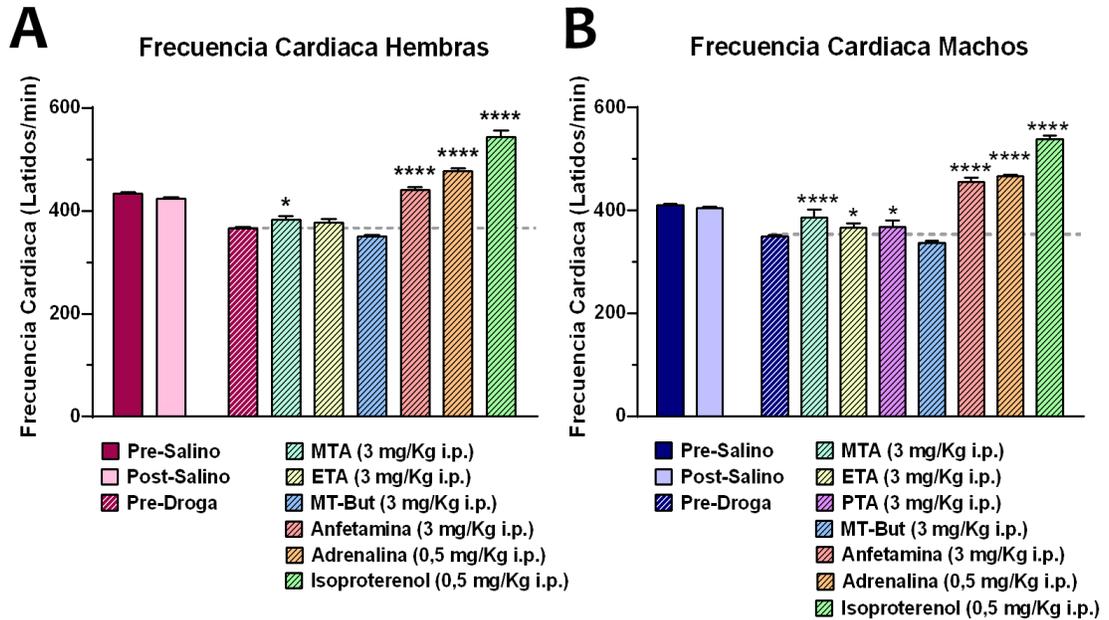
La comparación entre los valores de presión arterial y frecuencia cardiaca fueron analizadas por análisis de varianza de una cola (One-way ANOVA) seguido por un post-test Fisher's LSD. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron con un intervalo de confianza del 95% ( $P < 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism® v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Frecuencia Cardíaca basal e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol.

La frecuencia cardíaca pre-salino, post-salino, pre-droga y post-droga fueron registradas cada 1 minuto durante el protocolo experimental comenzando una vez anestesiado el animal con la dosis de ataque de Hidrato de Cloral. La figura 7 nos muestra A) Frecuencia Cardíaca Hembras y B) Frecuencia Cardíaca Machos. Los resultados demuestran un aumento significativo de este parámetro con la administración de MTA, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol en ratas hembras, no observándose cambios significativos sobre la frecuencia cardíaca bajo la administración de ETA y MT-But. En ratas machos, se observó un aumento significativo de la frecuencia cardíaca con la administración MTA, ETA, PTA, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol, sin cambios significativos en la frecuencia cardíaca con la administración de MT-But.

Figura 7.

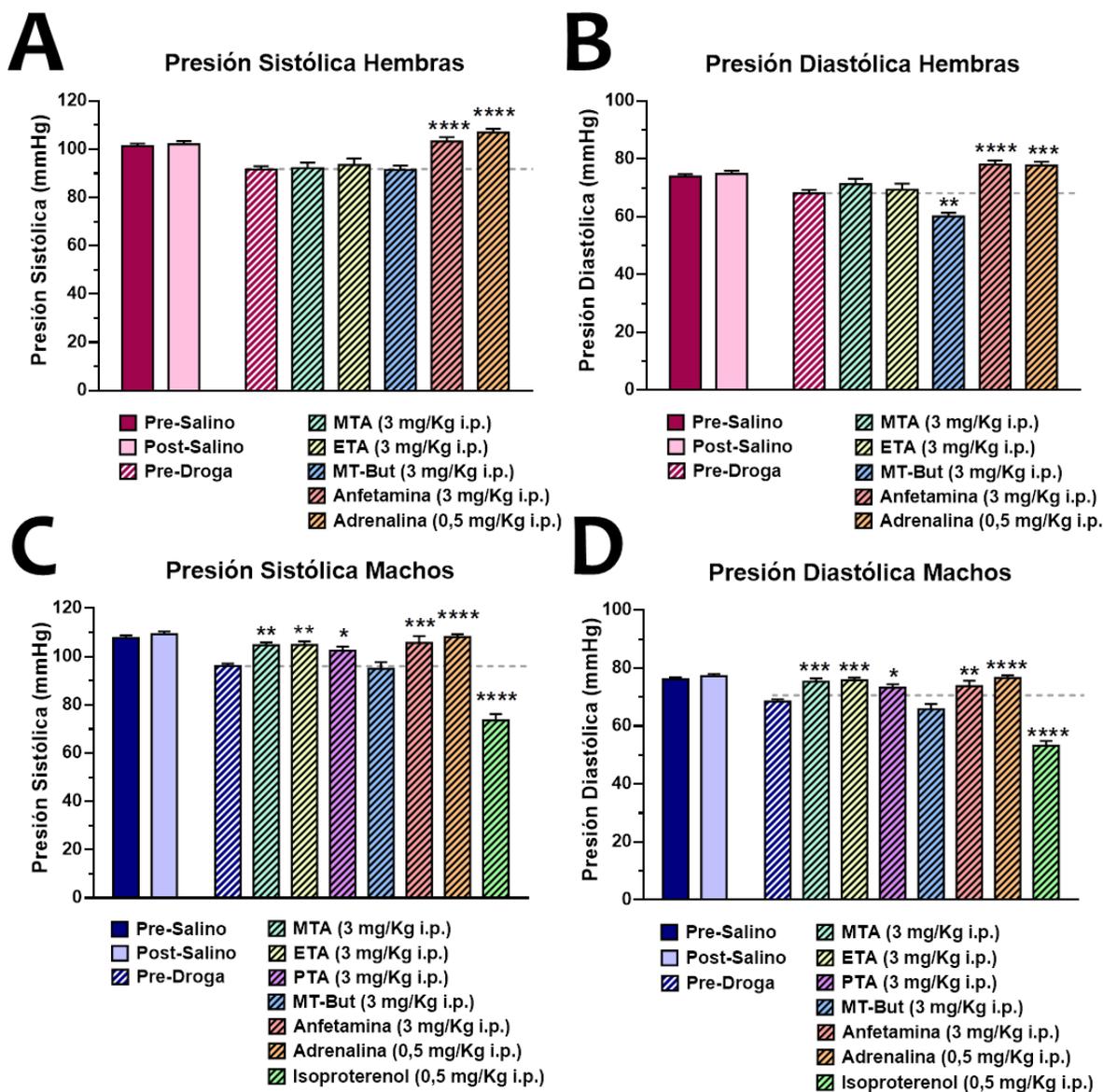


**Figura 7:** Frecuencia Cardíaca Hembras (A) y Frecuencia Cardíaca Machos (B). Los valores representan el promedio de la Frecuencia Cardíaca obtenida de todos los grupos previo a la administración de salino, posterior a la administración de este, previo a la administración de cada droga y posterior a la administración de ellas, en cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo Pre-salino  $n = 37$ , Grupo Post-Salino  $n = 37$ , Grupo Pre-Droga  $n = 37$ , Grupo MTA (3 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo ETA (3 mg/Kg)  $n = 5$ , Grupo MT-But (3 mg/Kg)  $n = 5$ , Grupo Anfetamina (3 mg/kg)  $n = 8$ , Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg)  $n = 5$ , Grupo Isoproterenol (0,5 mg/Kg)  $n = 6$ , Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre Droga con los Grupos MTA ( $[P = 0,0404]$ ), Anfetamina ( $[P < 0,0001]$ ), Adrenalina ( $[P < 0,0001]$ ), e Isoproterenol ( $[P < 0,0001]$ ). (B) Grupo Pre-salino  $n = 38$ , Grupo Post-Salino  $n = 38$ , Grupo Pre-Droga  $n = 38$ , Grupo MTA (3 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo ETA (3 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo PTA (3 mg/Kg)  $n = 5$ , Grupo MT-But (3 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo Anfetamina (3 mg/kg)  $n = 6$ , Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo Isoproterenol (0,5 mg/Kg)  $n = 3$ , Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre Droga con los Grupos MTA ( $[P < 0,0001]$ ), ETA ( $[P = 0,0462]$ ), PTA ( $[P = 0,0405]$ ), Anfetamina ( $[P < 0,0001]$ ), Adrenalina ( $[P < 0,0001]$ ) e Isoproterenol ( $[P < 0,0001]$ ).

## **5.2 Presión Arterial Sistólica y Diastólica Pre-Salino, Post- Salino, Pre-Droga e inducida por MTA y derivados 4 y alquil sustituidos, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol.**

La presión arterial sistólica y diastólica pre salino, post- salino, pre-droga y los efectos inducidos por los derivados de MTA, anfetamina, adrenalina e isoproterenol, fueron registradas cada 1 minuto durante todo el transcurso del experimento. La figura 8 nos muestra en los paneles A) Presión Arterial Sistólica Hembras, B) Presión Arterial Diastólica Hembras, C) Presión Arterial Sistólica Machos y D) Presión Arterial Diastólica Machos. Los resultados demuestran un aumento significativo en la presión arterial tanto sistólica como diastólica de hembras, producido por la administración de anfetamina y adrenalina. Por otro lado, la administración de MT-But produjo una disminución significativa de la presión arterial diastólica en hembras. La presión arterial sistólica en ratas machos aumentó significativamente con la administración de MTA, ETA, PTA, Anfetamina y Adrenalina, mientras que la administración de isoproterenol produjo una disminución significativa en este parámetro. Respecto a la presión diastólica se observó un aumento significativo post-administración de MTA, ETA, PTA, Anfetamina y Adrenalina en ratas machos. Cabe señalar que también se observó una disminución significativa en la presión diastólica en ratas machos post-administración de Isoproterenol.

Figura 8.

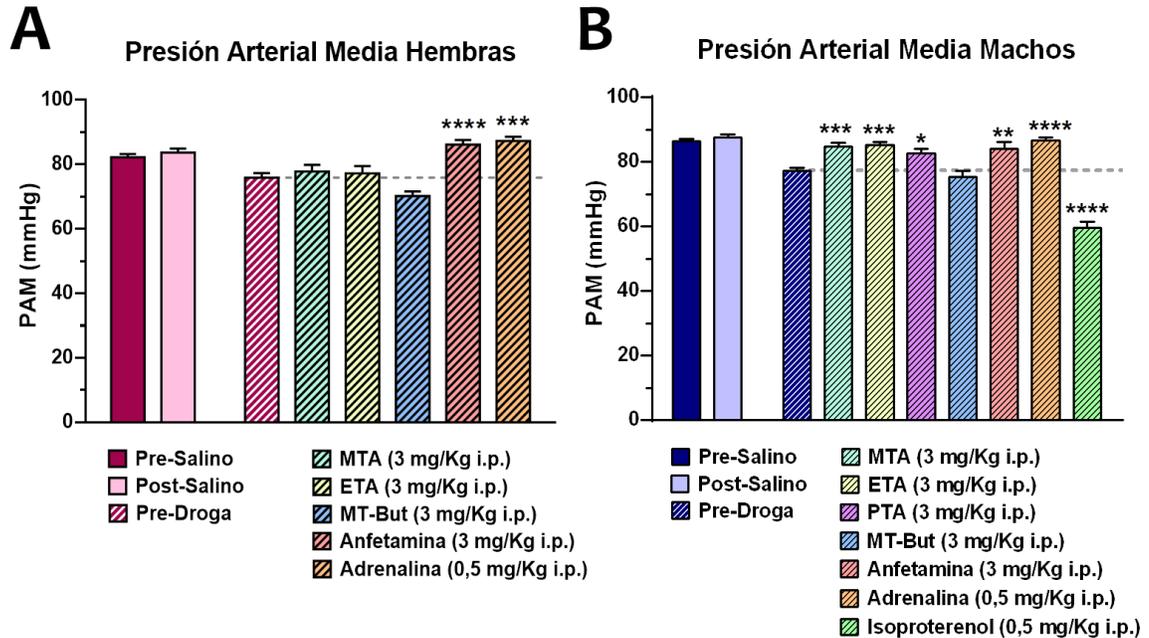


**Figura 8:** Presión Sistólica Hembras (A), Presión Diastólica Hembras (B), Presión Sistólica Machos (C) y Presión Diastólica Machos (D). Los valores representan el promedio de la Presión Sistólica y Presión Diastólica de Hembras o Machos obtenidos de todos los grupos previo a la administración de salino, posterior a la administración de este, además del promedio obtenido previo a la administración de cada droga, considerando así la dosis de mantención de anestesia, para finalmente representar el promedio posterior a la administración de cada droga, en cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo Pre-salino n = 33, Grupo Post-Salino n= 33, Grupo Pre-Droga n= 33, Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7, Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg) n= 5. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre-Droga con los Grupos Anfetamina ([P=< 0,0001]) y Adrenalina ([P=< 0,0001]). (B) Grupo Pre-salino n = 33, Grupo Post-Salino n= 33, Grupo Pre-Droga n= 33, Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7, Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg) n= 5. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre- Droga con los Grupos MT-But ([P=0,0032]), Anfetamina ([P< 0,0001]) y Adrenalina ([P=0,0004]). (C) Grupo Pre-salino n =38, Grupo Post-Salino n= 38, Grupo Pre-Droga n= 38, Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo PTA (3 mg/Kg ) n=5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 6, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 6, Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg) n= 6, Grupo Isoproterenol (0,5 mg/Kg) n= 3. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre- Droga con los Grupos MTA ([P=0,0015]), ETA ([P=0,0013]), PTA ([P=0,0296]), Anfetamina ([P=0,0005]), Adrenalina ([P< 0,0001]) e Isoproterenol ([P< 0,0001]). (D) Grupo Pre-salino n =38, Grupo Post-Salino n= 38, Grupo Pre-Droga n= 38, Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo PTA (3 mg/Kg ) n=5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 6, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 6, Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg) n= 6, Grupo Isoproterenol (0,5 mg/Kg) n= 3. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre- Droga con los Grupos MTA([P=0,0004]), ETA ([P=0,0001]), PTA ([P=0,0195]), Anfetamina([P=0,0052]), Adrenalina ([P< 0,0001]) e Isoproterenol ([P< 0,0001]).

### **5.3 Presión Arterial Media (PAM) Pre-Salino, Post- Salino, Pre-Droga e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol.**

La presión arterial media (PAM) pre-salino, post-salino, pre-droga e inducida por los derivados de MTA, anfetamina, adrenalina e isoproterenol, fue registrada cada 1 minuto durante el transcurso de todo el experimento. La figura 9 muestra A) Presión Arterial Media Hembras y B) Presión Arterial Media Machos. Al respecto se observó un aumento significativo en la PAM en hembras post-administración de anfetamina y adrenalina. De igual manera, se observó un aumento significativo de la PAM en ratas machos post-administración de MTA, ETA, PTA, Anfetamina y Adrenalina, y solo se observó una disminución significativa en la PAM post-administración de Isoproterenol en ratas machos.

Figura 9.

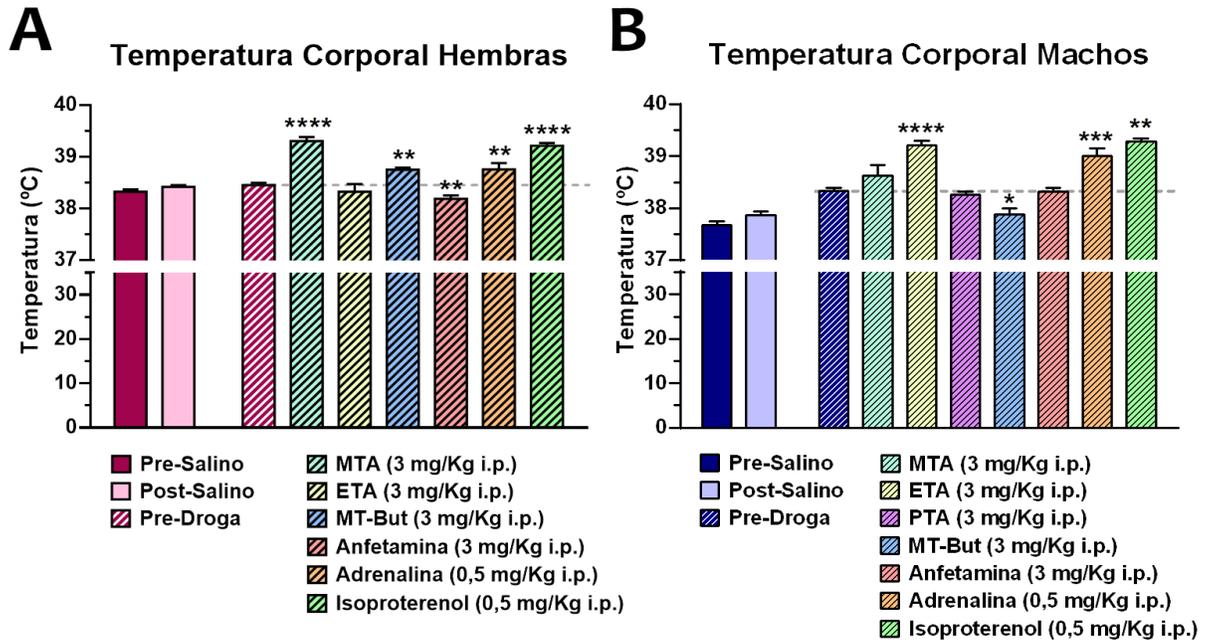


**Figura 9:** Presión Arterial Media Hembras (A) y Presión Arterial Machos(B). Los valores representan el promedio de la Frecuencia Cardiaca obtenida de todos los grupos previo a la administración de salino, posterior a la administración de este, además del promedio obtenido previo a la administración de cada droga, considerando así la dosis de mantención de anestesia, para finalmente representar el promedio posterior a la administración de cada droga, en cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo Pre-salino n = 28, Grupo Post-Salino n=28, Grupo Pre-Droga n= 28, Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n=7, Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg) n= 5, Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre Droga con los Anfetamina ( $[P < 0,0001]$ ) y Adrenalina ( $[P=0,0002]$ ). (B) Grupo Pre-salino n = 38, Grupo Post-Salino n= 38, Grupo Pre-Droga n= 38, Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n=6, Grupo PTA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 6, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 6, Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg) n= 6, Grupo Isoproterenol (0,5 mg/Kg) n= 3, Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre Droga con los Grupos MTA ( $[P=0,0005]$ ), ETA ( $[P=0,0002]$ ), PTA ( $[P=0,0196]$ ), Anfetamina ( $[P=0,0017]$ ), Adrenalina ( $[P < 0,0001]$ ) e Isoproterenol ( $[P < 0,0001]$ ).

#### **5.4 Temperatura Corporal Pre-Salino, Post- Salino, Pre-Droga e inducida por MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoproterenol.**

La temperatura corporal pre-salino, post-salino, pre-droga e inducida por los derivados de MTA, anfetamina, adrenalina e isoproterenol, fue registrada mediante un termómetro rectal cada 1 minuto durante el transcurso de todo el experimento. En la figura 10 se muestra A) Temperatura Corporal en ratas Hembras y B) Temperatura Corporal en ratas Machos. Al respecto, se observó un aumento significativo en la temperatura corporal de ratas hembras con la administración de MTA, MT-But, Adrenalina e Isoproterenol, y una disminución significativa con Anfetamina. Por otro lado, la temperatura corporal en ratas machos aumentó significativamente bajo los efectos de ETA, Adrenalina e Isoproterenol. Mientras que la administración de MT-But produjo una disminución significativa en este parámetro fisiológico.

Figura 10.

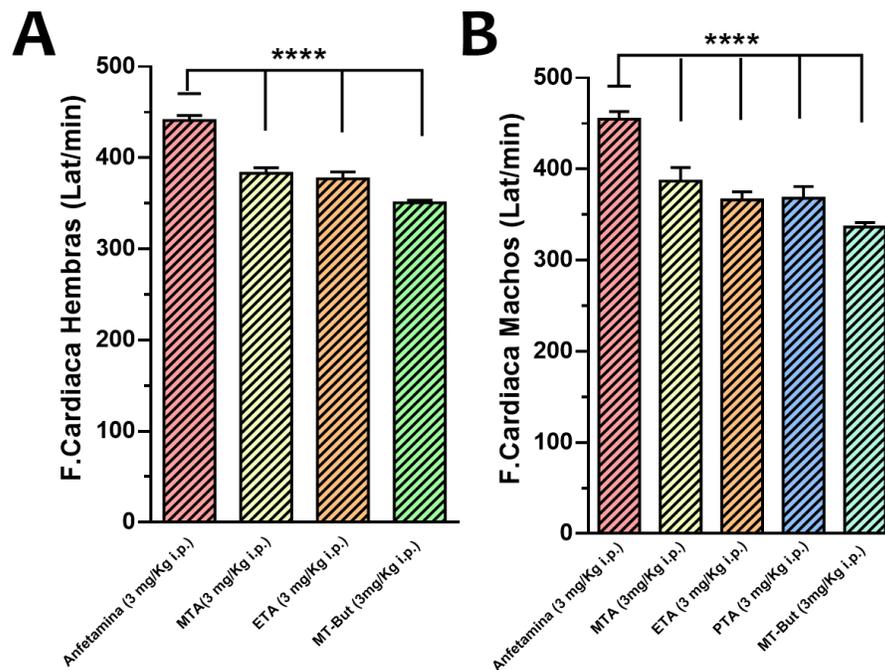


**Figura 10:** Temperatura Corporal Hembras (A) y Temperatura Corporal Machos (B). Los valores representan el promedio de la Temperatura Corporal obtenida de todos los grupos previo a la administración de salino, posterior a la administración de este, además del promedio obtenido previo a la administración de cada droga, considerando así la dosis de mantención de anestesia, para finalmente representar el promedio posterior a la administración de cada droga, en cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo Pre-salino  $n = 35$ , Grupo Post-Salino  $n = 35$ , Grupo Pre-Droga  $n = 35$ , Grupo MTA (3 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo ETA (3 mg/Kg)  $n = 5$ , Grupo MT-But (3 mg/ Kg)  $n = 5$ , Grupo Anfetamina (3 mg/kg)  $n = 8$ , Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg)  $n = 5$ , Isoproterenol (0,5 mg/Kg)  $n = 6$ . Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre-Droga con los Grupos MTA ( $[P < 0,0001]$ ), MT-But ( $[P = 0,0090]$ ), Anfetamina ( $[P = 0,0049]$ ), Adrenalina ( $[P = 0,0074]$ ) e Isoproterenol ( $[P < 0,0001]$ ). (B) Grupo Pre-salino  $n = 38$ , Grupo Post-Salino  $n = 38$ , Grupo Pre-Droga  $n = 38$ , Grupo MTA (3 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo ETA (3 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo PTA (3 mg/Kg)  $n = 5$ , Grupo MT-But (3 mg/ Kg)  $n = 5$ , Grupo Anfetamina (3 mg/kg)  $n = 6$ , Grupo Adrenalina (0,5 mg/Kg)  $n = 6$ , Grupo Isoproterenol (0,5 mg/Kg)  $n = 2$ . Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Pre Droga con los Grupos MTA ( $[P = 0,0380]$ ), ETA ( $[P < 0,0001]$ ), MT-But ( $[P = 0,0020]$ ), Adrenalina ( $[P < 0,0001]$ ) e Isoproterenol ( $[P < 0,0001]$ ).

### 5.5 Comparación de frecuencia cardíaca inducida por Anfetamina, versus la administración de MTA, ETA, PTA y MT-But, en ratas hembras y machos.

La figura 11. Representa una comparación tanto de hembras (A) como machos (B) de los valores promedios obtenidos de frecuencia cardíaca bajo los efectos de la administración de Anfetamina versus sus derivados. En esta podemos observar en hembras (A) y en machos (B) que anfetamina incrementa significativamente la frecuencia cardíaca respecto a los derivados 4 tio-sustituídos (MTA, ETA y MT-But). Adicionalmente, en ratas machos se adicionó a la comparación la droga PTA.

Figura 11.

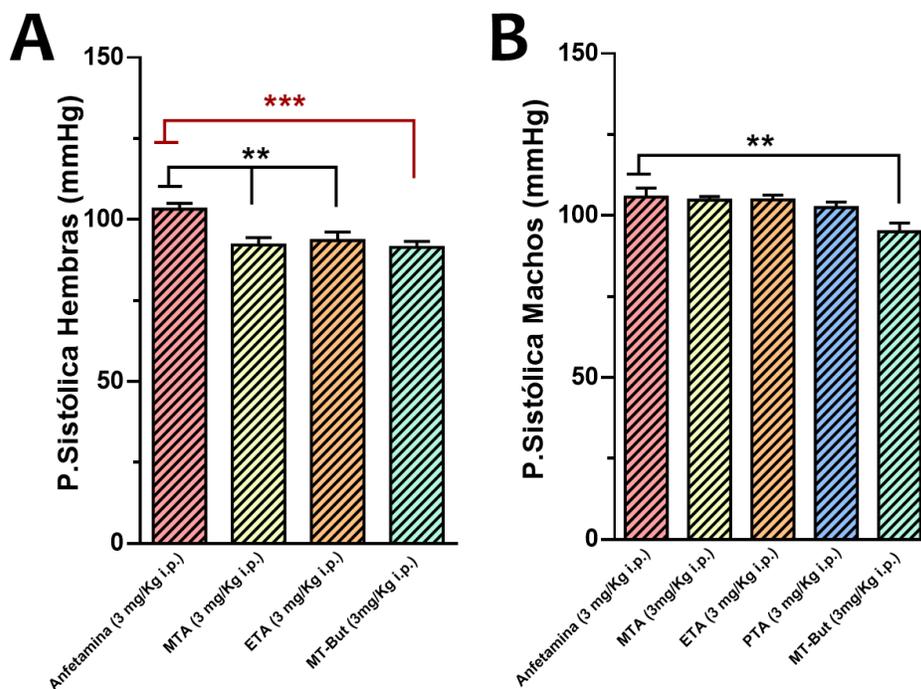


**Figura 11:** Frecuencia cardiaca hembras (A). Frecuencia cardiaca Machos (B). Los valores representan el promedio de la frecuencia cardiaca obtenida en todos los grupos experimentales post administración de las drogas, para luego realizar una comparación de Anfetamina, con sus derivados. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con los Grupos MTA ( $[P < 0,0001]$ ), ETA( $[P < 0,0001]$ ) y MT-But ( $[P < 0,0001]$ ). (B) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con los Grupos MTA ( $[P < 0,0001]$ ), ETA ( $[P < 0,0001]$ ), PTA ( $[P < 0,0001]$ ), MT-But ( $[P < 0,0001]$ ).

5.6 Comparación de la presión arterial sistólica inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos.

Se comparó los efectos sobre la presión sistólica producidos por la administración de anfetamina versus los derivados 4-tio sustituidos. Como se puede observar en la figura 12 (A) la administración de anfetamina en ratas hembras aumenta significativamente la presión sistólica respecto a MTA, ETA y MT-But. Por otro lado, en la figura 12 (B) solo se observó en ratas machos un aumento significativo en la presión arterial sistólica inducida por anfetamina respecto a la administración de MT-But.

Figura 12.

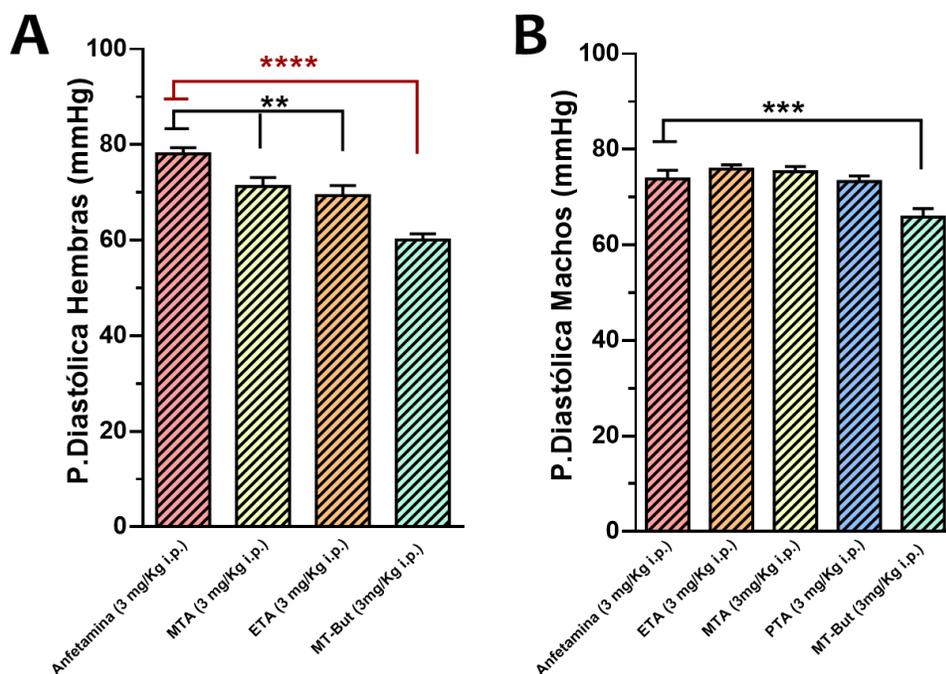


**Figura 12:** Presión sistólica Hembras (A). Presión sistólica Machos (B). Los valores representan el promedio de la presión sistólica obtenida en todos los grupos experimentales post administración de las drogas, para luego realizar una comparación de Anfetamina, con sus derivados. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con los Grupos MTA ([P=0,0046]), ETA([P=0,0011]) y MT-But ([P=0,0010]). (B) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con el Grupo MT-But ([P=0,0013]).

5.7 Comparación de la presión arterial diastólica inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos.

Se comparó los efectos sobre la presión diastólica producidos por la administración de anfetamina versus los derivados 4-tio sustituidos. Como se puede observar en la figura 13 (A) la administración de anfetamina en ratas hembras aumenta significativamente la presión sistólica respecto a MTA, ETA y MT-But. Por otro lado y al igual que la figura 12 (B) en ratas machos solo se observó un aumento significativo en la presión arterial sistólica inducida por anfetamina respecto a la administración de MT-But (figura 13 (B)).

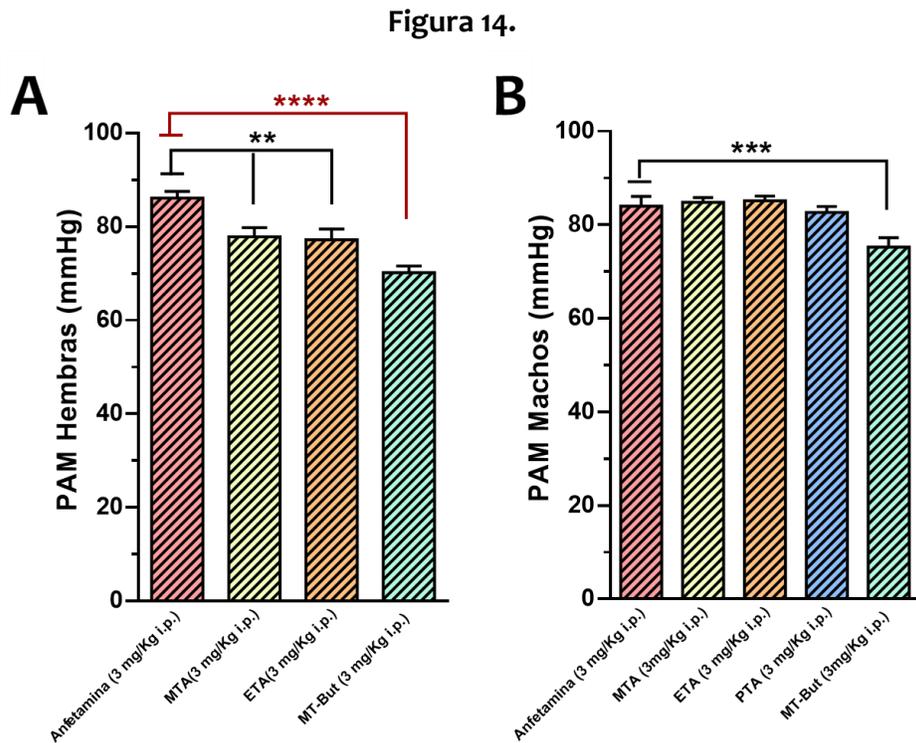
Figura 13.



**Figura 13:** Presión diastólica Hembras (A). Presión diastólica Machos (B). Los valores representan el promedio de la presión diastólica obtenida en todos los grupos experimentales post administración de las drogas, para luego realizar una comparación de Anfetamina, con sus derivados. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con los Grupos MTA ([P=0,006]), ETA ([P=0,0014]), y MT-But ([P=<0,0001]). (B) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con el Grupo MT-But ([P=0,0004]).

**5.8 Comparación de la presión arterial media inducida por Anfetamina versus la administración de los derivados MTA, ETA, PTA y MT-But en ratas hembras y machos.**

La figura 14 muestra los efectos producidos por la administración de anfetamina y los derivados 4 tio sustituidos sobre la presión arterial media (PAM) en ratas hembras y machos adultos. La figura 14 (A) muestra en ratas hembras que la administración de anfetamina aumentó la PAM significativamente respecto a la administración de MTA, ETA y MT-But. Mientras que la figura 14 (B) solo mostró un aumento estadísticamente significativo de anfetamina en ratas machos respecto a MT-But.



**Figura 13:** Presión arterial media (PAM) Hembras (A). Presión arterial media Machos (B). Los valores representan el promedio de la PAM obtenida en todos los grupos experimentales post administración de las drogas, para luego realizar una comparación de Anfetamina, con sus derivados. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (A) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con los Grupos MTA ([P=0,0025]), ETA ([P=0,0021]) y MT-But ([P= <0,0001]). (B) Grupo MTA (3 mg/Kg) n= 6, Grupo ETA (3 mg/Kg) n= 5, Grupo MT-But (3 mg/ Kg) n= 5, Grupo Anfetamina (3 mg/kg) n= 7. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Anfetamina con el Grupo MT-But ([P=0,0005]).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Consideraciones metodológicas: Temperatura de la cola del animal.

Durante las etapas iniciales de implementación de la técnica no fue posible obtener registros constantes, ya que los animales al encontrarse anestesiados tenían una baja de la temperatura corporal, mediada por la pérdida de calor producida por la ausencia de actividad del músculo esquelético [33]. Por otro lado, la termogénesis no temblorosa, llevada a cabo por el sistema adrenérgico mediante la activación de receptores  $\beta_3$  en grasa parda, está disminuida por el hidrato de cloral [34]. Como la temperatura corporal decayó por debajo del límite de sensibilidad del sensor térmico se colocaron los animales sobre una manta calefactora para mantener una temperatura corporal adecuada en cada animal. Sin embargo y no menos importante, la cola de los animales quedaba excluida del área establecida por la manta eléctrica, lo que favorecía una vasoconstricción en la cola, dificultando que el equipo lograra hacer los registros correctamente. Para subsanar este inconveniente, se agregó una segunda manta calefactora más grande para cubrir el área de la cola. Se estableció que la temperatura óptima para la cola de los animales debía estar dentro de los  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  para un adecuado registro de los parámetros cardiovasculares.

## **6.2 Consideraciones metodológicas: Hidrato de cloral, depresor del sistema cardiovascular.**

El hidrato de cloral es un sedante/anestésico cuyo mecanismo de acción no ha sido dilucidado. Dentro de sus efectos produce depresión del SNC, del sistema respiratorio y del sistema cardiovascular, produciéndose en este último sistema una disminución de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial del individuo [35] . En nuestros resultados podemos observar en las figuras 7, 8 y 9 que posterior a la dosis de mantención de hidrato de cloral hubo una disminución en los valores de los parámetros cardiovasculares. Por este motivo, para evaluar los efectos de las drogas se consideró usar los valores de parámetros cardiovasculares pre y post-administración de la dosis de la droga (ver sección de metodología).

## **6.3 Efectos sobre la frecuencia cardíaca por la administración de MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoprenalina en ratas hembras y machos.**

Como se pudo observar en la figura 7, hubo una diferencia sexual en los efectos de los derivados anfetamínicos sobre la frecuencia cardíaca en ratas hembras y machos. En hembras se observó una menor reactividad cardiovascular inducida por las drogas, respecto a ratas machos donde la administración de MTA, ETA o PTA indujo un incremento significativo de la frecuencia cardíaca. En cambio, cuando comparamos los efectos de anfetamina versus los derivados 4 tio sustituidos (Ver figura 11.), observamos tanto en hembras como en machos cambios significativos en la frecuencia cardíaca inducida por anfetamina respecto a sus derivados 4 tio sustituidos.

En la Figura 7 observamos diferencias significativas en los parámetros cardiovasculares producidos por anfetamina, adrenalina e isoproterenol. El uso de estas drogas se basó en tener controles positivos con drogas conocidas por generar activación cardiovascular. En este sentido, adrenalina e isoproterenol generaron efectos cardiovasculares tanto en ratas hembras como en machos, a través de la activación del sistema simpático de manera directa (agonismo producido por adrenalina e isoproterenol) o indirecta (inhibidor de NET por parte de anfetamina). Adrenalina, un agonista adrenérgico no selectivo, activa receptores  $\beta_1$  que producen un efecto cronotrópico e inotrópico (+), y receptores  $\alpha_1$  que favorecen vasoconstricción periférica y por ende un aumento de la presión arterial. Mientras que la acción agonista  $\beta_2$  en músculo esquelético favorece una acción vasodilatadora que lleva a una baja en la presión arterial compensatoria a los efectos  $\beta_1$ . En el caso de isoproterenol, un agonista  $\beta$  no selectivo, activa al receptor  $\beta_1$  que aumentan la presión arterial y  $\beta_2$  que favorecen una vasodilatación arteriolar que disminuye la resistencia vascular, baja la presión arterial y de manera compensatoria puede llevar a taquicardia [36-40]. Cabe destacar que las dosis utilizadas entre adrenalina e isoproterenol fueron iguales, pero esta última droga fue más potente que adrenalina. Discutiremos más adelante las diferencias significativas en la presión arterial producidas por la administración de adrenalina en los grupos de ratas hembras y machos [37, 41].

#### **6.4 Efectos sobre la presión arterial por la administración de MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoprenalina en ratas hembras y machos.**

Como podemos observar en las figuras 8 y 9 los grupos de ratas hembras fueron menos susceptibles a la acción de los derivados anfetamínicos sobre la activación cardiovascular, específicamente sobre el aumento de la presión arterial sistólica, diastólica y presión arterial media, las cuales si fueron afectadas significativamente en ratas machos. Sin embargo, la administración de anfetamina (droga patrón para este estudio) si afectó los parámetros cardiovasculares antes descritos en ratas hembras, posiblemente por una mayor potencia en la inhibición de la recaptación de monoaminas en el sistema cardiovascular que la producida por los derivados 4 tio sustituidos. Interesantemente, en machos la administración de anfetamina y de sus derivados MTA, ETA y PTA, no fue diferente entre sí, y todas indujeron un aumento de la presión arterial. En este sentido, en ratas machos la hipótesis de esta tesis no se cumple y es interesante evaluar en otros estudios las diferencias sexuales observadas en respuesta a este tipo de drogas.

### 6.5 Relación Estructura Actividad de los derivados Anfetamínicos.

Con respecto a los derivados anfetamínicos estudiados en esta tesis, en investigaciones anteriores se logró establecer una relación estructura-actividad basada en la sustitución en posición 4 o *para* del anillo aromático en la estructura feniletilamina [42]. La sustitución en esta posición otorga a la molécula una mayor selectividad y potencia inhibitoria contra la enzima mono-aminoxidasa A (MAO-A), la cual es responsable del catabolismo de monoaminas como la dopamina, serotonina y noradrenalina. Farmacológicamente, la inhibición de la MAO-A, es una propiedad que comparte una serie de fármacos conocidos como IMAOs, que favorecen el aumento de neurotransmisores monoaminérgicos, que en órganos periféricos como el corazón puede llevar al aumento de la frecuencia cardíaca. El aumento de la noradrenalina inducido por la inhibición de la MAO, favorece en el corazón la activación de receptores  $\beta_1$  adrenérgicos [38, 39] [36], cuya vía de señalización está asociada a la activación de la proteína Gs. Esta activación lleva a la formación de AMPc (Adenosin monofosfato cíclico) por acción de la adenilato ciclasa, a la posterior activación de PKA (Proteína quinasa dependiente de AMPc), que en miocardio aumenta la fuerza contráctil cardíaca (acción inotrópica) y a cambios en la actividad de los nódulos sinusal y atrio ventricular, lo que induce un aumento en la frecuencia cardíaca por un efecto cronotrópico positivo. A nivel celular, PKA fosforila los canales de  $Ca^{+2}$  sensibles a voltaje, incrementando así la permeabilidad a  $Ca^{+2}$  que lleva a acelerar la despolarización en fase 0 y en fase 4 del potencial cardíaco [36-38]. En este contexto, parte de los efectos

sobre los parámetros cardiovasculares observados con MTA, ETA y PTA, podría estar dado no solo por su potencial efecto IMAO sino también por un efecto inhibitor de NET. Sin embargo, otros estudios podrían ser desarrollados para evaluar estos componentes farmacológicos en MTA, ETA y PTA. MTA es una droga entactógena cuya actividad IMAO-A ha sido demostrada en investigaciones anteriores y que además genera contracción aortica *in vitro* [29, 32]. Por otro lado, la sustitución 4-metiltio del MTA provoca una liberación dual de monoaminas, favoreciendo la liberación de dopamina y serotonina [28, 29, 31]. Esto es muy interesante, ya que al incrementar el tamaño de la sustitución afectaría la actividad IMAO de la molécula, pero también podría afectar la liberación de neurotransmisores. En este sentido ETA, un derivado anfetamínico etil-tio sustituido, posee una mayor actividad IMAO-A, que MTA [42]. Respecto a PTA, un derivado anfetamínico propil-tio sustituido, podemos observar que ha sido descrita una gran potencia IMAO, pero aún faltan estudios neuroquímicos para evaluar su actividad sobre transportadores de neurotransmisores. Por otro lado, MT-But, mantendría su actividad IMAO, pero dado el etil que posee en el carbono  $\alpha$  de la cadena lateral, es que pierde drásticamente su capacidad liberadora de dopamina, al compararlo con MTA (Tesis Fabrizio Guajardo, Datos no publicados).

## **6.6 Efectos sobre la temperatura corporal por la administración de MTA, ETA, PTA, MT-But, Anfetamina, Adrenalina e Isoprenalina en ratas hembras y machos.**

### **Posible síndrome serotoninérgico.**

Como se observa en la figura 10 hubo un efecto dispar sobre la temperatura corporal producido por las drogas en estudio. Por ejemplo, anfetamina en hembras produjo una baja significativa en la temperatura corporal. Es posible que este efecto se relacione a mecanismos inespecíficos de la droga o por su interacción con receptores para monoaminas [43]. En este contexto, podemos proponer que anfetamina a través de sus efectos centrales puede liberar neurotransmisores en hipotálamo anterior, que activarían esta área cerebral y generarían de una respuesta termolítica asociada a vasodilatación periférica y sudoración como mecanismos para bajar la temperatura corporal. Por otro lado, en la figura 10 se observa un aumento significativo de la temperatura corporal producto de la administración de isoprenalina y adrenalina. De acuerdo a la literatura, estos efectos podrían producirse por la acción agonista de ambos fármacos sobre receptores  $\beta_3$  [38]. Este receptor se encuentra expresado en el tejido adiposo pardo “grasa parda”, favoreciendo un efecto termogénico no tembloroso en animales endotermos [33], mediante la activación de vías de señalización río abajo del receptor  $\beta_3$  que llevan a un aumento de la actividad de la adenilato ciclasa, aumento de AMPc, activación de PKA, activación de MAP quinasas y de P38 [34]. Estas últimas señalizaciones favorecen la transcripción de UCP1 (proteína desacoplante 1), que produce energía en forma de calor mediante el desacoplamiento

de la cadena transportadora respiratoria en la síntesis de ATP, ya que al desaparecer el gradiente de protones genera liberación de calor [34, 44]. Por medio de este mecanismo tanto adrenalina e isoproterenol podrían elevar la temperatura corporal [45].

En el caso de los derivados anfetamínicos como MTA, estos producen un aumento en la liberación de serotonina a través de inhibir la recaptura de este neurotransmisor y consecuente acumulación extracelular por su actividad IMAO-A [42, 46]. Este aumento del tono serotoninérgico que sería un mecanismo común para MTA, ETA y PTA podría desencadenar un síndrome serotoninérgico caracterizado por hiperreactividad neuromuscular y autonómica, e hipertermia maligna [47]. Cabe señalar, que los niveles plasmáticos de serotonina, no son directamente proporcionales a los síntomas presentados en la clínica [47], por lo cual solo algunas drogas clasificadas como entactógenas pueden provocar este síndrome.

## 7. CONCLUSIONES

- La administración intraperitoneal de MTA y de sus derivados 4-alquil tio sustituidos provocan un menor aumento en la frecuencia cardiaca tanto de hembras como de machos versus la administración de la droga patrón anfetamina. Por otro lado, adrenalina e isoproterenol produjeron como era de esperar un aumento de la frecuencia cardiaca en ratas hembras y machos.
- La administración intraperitoneal de MTA y de sus derivados 4-alquil tio sustituidos provocan un menor incremento en la presión arterial sistólica, diastólica y presión arterial media, que la droga patrón anfetamina en ratas hembras y de similar magnitud en ratas machos. El control positivo adrenalina produjo un aumento de la presión arterial sistólica, diastólica y presión arterial media, mientras que la administración de isoproterenol provocó una disminución de todos los parámetros antes mencionados.
- La administración intraperitoneal de MTA y derivados 4 alquil tio sustituidos producen cambios en la temperatura corporal. De igual manera ambas drogas controles, adrenalina e isoprenalina provocaron un aumento en la temperatura corporal.

## 8. REFERENCIAS

1. Koob, G.F. and N.D. Volkow, *Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(1): p. 217-38.
2. Koob, G.F., M.A. Arends, and M. Le Moal, *Chapter 1 - What is Addiction?*, in *Drugs, Addiction, and the Brain*. 2014, Academic Press: San Diego. p. 1-27.
3. Koob, G., *Addiction is a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. Frontiers in Psychiatry*, 2013. **4**(72).
4. Koob, G.F. and M.L. Moal, *Addiction and the Brain Antireward System. Annual Review of Psychology*, 2008. **59**(1): p. 29-53.
5. Peter W. Kalivas and Nora D. Volkow, *The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. American Journal of Psychiatry*, 2005. **162**(8): p. 1403-1413.
6. Volkow, Nora D. and M. Morales, *The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. Cell*. **162**(4): p. 712-725.
7. Wise, R.A., *Brain Reward Circuitry: Insights from Unsensed Incentives. Neuron*, 2002. **36**(2): p. 229-240.
8. Bassareo, V. and G. Di Chiara, *Differential Influence of Associative and Nonassociative Learning Mechanisms on the Responsiveness of Prefrontal and Accumbal Dopamine Transmission to Food Stimuli in Rats Fed *Ad Libitum**. *The Journal of Neuroscience*, 1997. **17**(2): p. 851-861.
9. Radhakishun, F.S., J.M. van Ree, and B.H. Westerink, *Scheduled eating increases dopamine release in the nucleus accumbens of food-deprived rats as assessed with on-line brain dialysis. Neurosci Lett*, 1988. **85**(3): p. 351-6.
10. Pfaus, J.G., et al., *Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. Brain Res*, 1990. **530**(2): p. 345-348.
11. Huang, Y.H., et al., *CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: a critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) receptors. J Biol Chem*, 2008. **283**(5): p. 2751-60.
12. Morikawa, H. and C.A. Paladini, *Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. Neuroscience*, 2011. **198**: p. 95-111.
13. Fleckenstein, A.E., et al., *New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines. Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2007. **47**(1): p. 681-698.
14. Calipari, E.S. and M.J. Ferris, *Amphetamine Mechanisms and Actions at the Dopamine Terminal Revisited. The Journal of Neuroscience*, 2013. **33**(21): p. 8923-8925.
15. Torres, G.E., R.R. Gainetdinov, and M.G. Caron, *Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. Nat Rev Neurosci*, 2003. **4**(1): p. 13-25.

16. Sulzer, D., et al., *Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review*. *Prog Neurobiol*, 2005. **75**(6): p. 406-433.
17. D, N., *Medicinal Chemistry and Structure-Activity Relationships. Amphetamine and its Analogs*. 1994.
18. Winstock, A.R., K. Wolff, and J. Ramsey, *4-MTA: a new synthetic drug on the dance scene*. *Drug and Alcohol Dependence*, 2002. **67**(2): p. 111-115.
19. Lapoint, J., P.I. Dargan, and R.S. Hoffman, *Chapter 7 - Synthetic Amphetamine Derivatives*, in *Novel Psychoactive Substances*. 2013, Academic Press: Boston. p. 161-178.
20. Varner, K.J., et al., *Cardiovascular responses elicited by the "binge" administration of methamphetamine*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002. **301**(1): p. 152-159.
21. Hart, C.L., et al., *Acute physiological and behavioral effects of intranasal methamphetamine in humans*. *Neuropsychopharmacology*, 2008. **33**(8): p. 1847.
22. Janardhanan, R. and A. Kannan, *Methamphetamine Cardiotoxicity: Unique Presentation with Multiple Bi-Ventricular Thrombi*. *The American Journal of Medicine*, 2016. **129**(1): p. e3-e4.
23. James , W.P.T., et al., *Effect of Sibutramine on Cardiovascular Outcomes in Overweight and Obese Subjects*. *New England Journal of Medicine*, 2010. **363**(10): p. 905-917.
24. Rajamani, S., et al., *Cardiotoxic effects of fenfluramine hydrochloride on isolated cardiac preparations and ventricular myocytes of guinea-pigs*. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(5): p. 843-852.
25. Carmo, H., et al., *4-Methylthioamphetamine-induced hyperthermia in mice: influence of serotonergic and catecholaminergic pathways*. *Toxicology and applied pharmacology*, 2003. **190**(3): p. 262-271.
26. Boschi, G. and R. Rips, *Forebrain sites for the hypothermic effect of dexamphetamine in mice*. *Neuroscience Letters*, 1982. **31**(2): p. 153-158.
27. Scorza, M.C., et al., *Monoamine Oxidase Inhibitory Properties of Some Methoxylated and Alkylthio Amphetamine Derivatives: Structure-Activity Relationships*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **54**(12): p. 1361-1369.
28. Sotomayor-Zarate, R., et al., *4-Methylthioamphetamine increases dopamine in the rat striatum and has rewarding effects in vivo*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2012. **111**(6): p. 371-9.
29. Sotomayor-Zarate, R., et al., *Improving amphetamine therapeutic selectivity: N,N-dimethyl-MTA has dopaminergic effects and does not produce aortic contraction*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014. **114**(5): p. 395-9.
30. Quinn, S.T., et al., *Blockade of noradrenaline transport abolishes 4-methylthioamphetamine-induced contraction of the rat aorta in vitro*. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, 2006. **26**(4): p. 335-344.
31. Gobbi, M., et al., *N,N-dimethyl-thioamphetamine and methyl-thioamphetamine, two non-neurotoxic substrates of 5-HT transporters, have scant in vitro efficacy for*

- the induction of transporter-mediated 5-HT release and currents. *J Neurochem*, 2008. **105**(5): p. 1770-80.
32. Hurtado-Guzman, C., et al., Monoamine oxidase inhibitory properties of optical isomers and N-substituted derivatives of 4-methylthioamphetamine. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2003. **18**(4): p. 339-47.
  33. Bicego, K.C., R.C. Barros, and L.G. Branco, *Physiology of temperature regulation: comparative aspects*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007. **147**(3): p. 616-639.
  34. Coman, O.A., et al., Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. *Rom J Morphol Embryol*, 2009. **50**(2): p. 169-79.
  35. Valenzuela, D.G., et al., Chloral hydrate sedation for auditory brainstem response (ABR) testing in children: Safety and effectiveness. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2016. **83**: p. 175-8.
  36. Flórez, J., J.A. Armijo, and Á. Mediavilla, *Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos*, in *Farmacología Humana*. 2008, Elsevier Masson. p. 304-306.
  37. Alexander, S.P., et al., *THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors*. *Br J Pharmacol*, 2017. **174 Suppl 1**: p. S17-s129.
  38. Hoffmann, C., et al., *Comparative pharmacology of human  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes—characterization of stably transfected receptors in CHO cells*. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2004. **369**(2): p. 151-159.
  39. Flórez, J., J.A. Armijo, and Á. Mediavilla, *Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos*, in *Farmacología Humana*. 2008, Elsevier Masson. p. 308-310.
  40. Koeppe, B.M. and B.A. Stanton, *Capítulo 19. Control integrado del aparato cardiovascular*, in *Berne y Levy. Fisiología+ StudentConsult 2009*, Elsevier Health Sciences. p. 393-414.
  41. Flórez, J., J.A. Armijo, and Á. Mediavilla, *Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos*, in *Farmacología Humana*. 2008, Elsevier Masson. p. 306-307.
  42. Scorza, M.C., et al., Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives: structure-activity relationships. *Biochemical pharmacology*, 1997. **54**(12): p. 1361-1369.
  43. Boschi, G. and N. Launay, *Differential effects of neuroleptic and serotonergic drugs on amphetamine-induced hypothermia in mice*. *Neuropharmacology*, 1985. **24**(2): p. 117-122.
  44. Rodríguez-Cuenca, S., et al., *Sex-dependent thermogenesis. Differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in bat*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002.

45. Paulo, E., et al., *Sympathetic inputs regulate adaptive thermogenesis in brown adipose tissue through cAMP-Salt inducible kinase axis*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 11001.
46. Na, C.H.-G., et al., *Monoamine oxidase inhibitory properties of optical isomers and N-substituted derivatives of 4-methylthioamphetamine*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2003. **18**(4): p. 339-347.
47. Volpi-Abadie, J., A.M. Kaye, and A.D. Kaye, *Serotonin syndrome*. *The Ochsner Journal*, 2013. **13**(4): p. 533-540.