



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y PLASTICIDAD CEREBRAL**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA *IN VIVO* DE UN NUEVO DERIVADO  
DE ANFETAMINA**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

**FABRIZIO GIOVANNI GUAJARDO CABELLO**

Director de Tesis: **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**

Co-director de Tesis: **Dr. Miguel Reyes-Parada**

**2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias al financiamiento de los proyectos FONDECYT N°1160398 del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate y FONDECYT N°113-0185 del Dr. Miguel Reyes-Parada.

## **DEDICATORIA**

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han contribuido en este proceso, especialmente a mis amigos, los que siempre me dieron su apoyo y aliento para salir adelante. Pero esta tesis, fruto de mi esfuerzo, está dedicada a mis padres, Lucy y Jano, quienes han sido el pilar fundamental desde que tengo memoria y me han guiado en esta vida por el mejor de los senderos. También dedico este trabajo a mi hermana y amiga Yennifer, que ha sido la persona que mejor me ha soportado durante estos años de carrera.

# INDICE

<b>INDICE DE IMÁGENES Y TABLAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1.1. Dopamina.....	7
1.1.1. Dopamina y Circuito de la Recompensa .....	8
1.2. Dopamina y Neurobiología de la Adicción .....	9
1.3. Técnicas de Monitorización de Neurotransmisores y Modelos Animales Para Estudiar los Efectos de las Drogas de Abuso .....	10
1.3.1. Modelos Animales Para el Estudio del Potencial Adictivo de las Drogas de Abuso .....	11
1.4. Anfetamina y Sus Derivados Sintéticos.....	14
1.4.1. Anfetamina, una Droga Clásica .....	14
1.4.2. Nuevas Sustancias Psicoactivas .....	15
1.4.3. Clasificación de los Derivados Anfetamínicos .....	15
1.4.4. Derivados Anfetamínicos del Tipo Metiltioanfetamina .....	16
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	20
3.1. Objetivo General.....	20
3.2. Objetivos Específicos .....	20
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
4.1. Animales.....	22
4.2. Reactivos.....	22
4.3. Pruebas Conductuales.....	23
4.3.1. Prueba de Preferencia de Lugar Condicionado (CPP) .....	23
4.3.2. Prueba de Actividad Locomotora .....	25
4.4. Microdiálisis Cerebral <i>in vivo</i> .....	26
4.4.1. Preparación de Cánulas de Microdiálisis.....	26
4.4.2. Implantación de Cánulas de Microdiálisis.....	26

4.4.3	Protocolo Experimental de Microdiálisis .....	28
4.4.4	Corroboración de la Postura de la Cánula de Microdiálisis.....	28
4.5.	Determinación del Contenido de DA y DOPAC en NAcc .....	29
4.5.1	Procedimiento Experimental.....	29
4.5.2	Microdisección y Homogenización del NAcc.....	29
4.6.	Determinación de Dopamina y DOPAC por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Detección Electroquímica .....	30
4.6.1	Fundamento Analítico de la Detección de Neurotransmisores y Sus Metabolitos por HPLC-EC .....	31
4.7.	Cálculos y Análisis Estadísticos .....	32
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
5.1	Actividad Locomotora Basal e Inducida por la Administración Sistémica de MTA .....	33
5.2	Actividad Locomotora Basal e Inducida Tras la Administración Sistémica de MT-But.....	35
5.3	Evaluación de la Conducta tipo Adictiva a través de la Preferencia de Lugar Condicionado a la Droga (CPP).....	36
5.4	Liberación de DA en NAcc Inducida por la Administración Sistémica de MTA y MT-But.....	38
5.5	Contenido de DA y DOPAC en NAcc de Ratas Tratadas con MT-But, MTA y Solución Salina Fisiológica .....	40
5.6	Relación entre la Razón (DOPAC/DA) en NAcc de Ratas Tratadas con MT-But, MTA y Solución Salina Fisiológica .....	41
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
6.1	Efectos Neuroquímicos de MT-But y MTA.....	42
6.2	Efectos Conductuales de MT-But y MTA.....	45
6.3	Relación Estructura Actividad e Hipótesis Serotoninérgica en la Atenuación Dopaminérgica .....	45
6.4	Proyecciones Para Futuras Investigaciones.....	48
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>50</b>

<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>53</b>
9.1 Certificado de Curso de Manejo y Uso de Ratas y Ratones para Experimentación .....	53
9.2 Planilla de Registro de Microdiálisis .....	54
9.3. Agrupación de Cromatogramas Representativos de la Curva Calibrado Para Medición de DA y DOPAC.....	55
9.4. Curva de Calibrado de DA .....	55

## INDICE DE IMÁGENES Y TABLAS

Figura 1: Síntesis y Catabolismo de Dopamina.	7
Figura 2: Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico de Rata.	8
Figura 3: Esquema del Modelo de Autoadministración de Drogas de Abuso.	11
Figura 4: Esquema del Modelo de Actividad Locomotora y del Proceso de Sensibilización Locomotora.	12
Figura 5: Esquema del Equipo y Fases del Paradigma de Preferencia de Lugar Condicionado (CPP).	13
Figura 6: Estructuras Moleculares de Anfetamina, MTA y sus Derivados.	18
Figura 7: Ejemplo de Microdiálisis Cerebral <i>in vivo</i> .	27
Figura 8: Esquema de Oxidación de Dopamina y su Principal Metabolito (DOPAC).	31
Figura 9: Curso Temporal de la Actividad Locomotora y Actividad Locomotora Acumulativa Inducida por MTA.	34
Figura 10: Curso Temporal de la Actividad Locomotora y Actividad Locomotora Acumulativa Inducida por MT-But.	35
Figura 11: Preferencia de Lugar Condicionado a la Administración de MTA y MT-But.	37
Figura 12: Microcorte Coronal de Cerebro de Rata.	39
Figura 13: Liberación de DA en NAcc Basal e Inducida por la Administración Sistémica de MTA o MT-But.	39

Figura 14: Contenido de DA y DOPAC en NAcc después de la Administración Aguda de MTA, MT-But o Solución Salina Fisiológica. 40

Tabla 1: Contenido de DA y DOPAC en NAcc, y la Razón (DOPAC/DA) Después de la Administración Aguda de MTA, MT-But o Solución Salina Fisiológica. 41



## RESUMEN

La farmacoterapia actual para tratar patologías como la narcolepsia, déficit atencional y obesidad ha estado en deuda durante las últimas décadas en el desarrollo de nuevos fármacos efectivos, con bajo potencial de dependencia y menos efectos adversos cardiovasculares. En este sentido, actualmente siguen utilizándose para estas patologías derivados anfetamínicos que a pesar de ser efectivos, presentan serios efectos adversos que han llevado a discontinuar su uso.

Nuestro grupo de investigación durante los últimos años ha estudiado el potencial dopaminérgico de derivados estructurales de la *p*-metiltioanfetamina (MTA) con el objetivo de buscar nuevas moléculas psicoestimulantes con un perfil de seguridad adecuado. Por este motivo en esta tesis se decidió estudiar el potencial dopaminérgico de *p*-metiltio-fenil-2-butanamina (MT-But), un derivado de MTA, a través de pruebas conductuales y neuroquímicas. Nuestros resultados demuestran que la sustitución del metilo del carbono alfa de la cadena alquílica del MTA por un grupo etilo anula el potencial dopaminérgico de MT-But, evidenciado por la ausencia en la liberación de dopamina en Núcleo Accumbens, ausencia de actividad locomotora inducida por MT-But y ausencia de la preferencia de lugar condicionado a la administración de MT-But.

Nuestros resultados nos indican que la posición alfa de la cadena alquílica debe tener un grupo metilo (como en anfetamina y MTA) como requisito estructural para mantener el efecto farmacológico tipo anfetamina y que el aumento de este sustituyente en tan solo un grupo metilo tiene un impacto significativo en la actividad dopaminérgica. Sin duda,

el diseño y evaluación pre-clínica de nuevas estructuras derivadas de anfetamina será un objetivo de nuestro grupo de investigación.

## ABSTRACT

Pharmacotherapy for the treatment of diseases such as narcolepsy, attention deficit disorder and obesity has been in debt in last decades regarding the development of new effective drugs with low abuse potential and cardiovascular effects. Currently, amphetamine derivatives are used to treat these pathologies. Despite being effective, these compounds elicit serious adverse effects, which has led to diminish or discontinue their use.

In the last years, our research group has studied the dopaminergic effects of *p*-metilthioamphetamine (MTA) and its structural derivates, with the aim of searching for new psychostimulants with the appropriate safety profile. Therefore, in this thesis we decided to evaluate the dopaminergic effects of *p*-methylthio-phenyl-2-butanamine (MT-But), a MTA derivate, by means of neurochemical and behavioral tests in rats. Our results show that the replacement of the methyl group on the alpha carbon of the alkyl chain of MTA by an ethyl group abolished the dopaminergic activity in MT-But. Thus, MT-But neither induced dopamine release in the Nucleus Accumbens nor affect locomotor activity. In addition, MT-But was not able to induce place conditioning preference.

Our results indicate that the presence of a methyl group at the alpha carbon of the alkyl chain (like amphetamine and MTA) is a structural requirement to keep the pharmacological profile similar to amphetamine, and that the enlargement of this substituent in just one methylene group has a significant impact upon dopaminergic

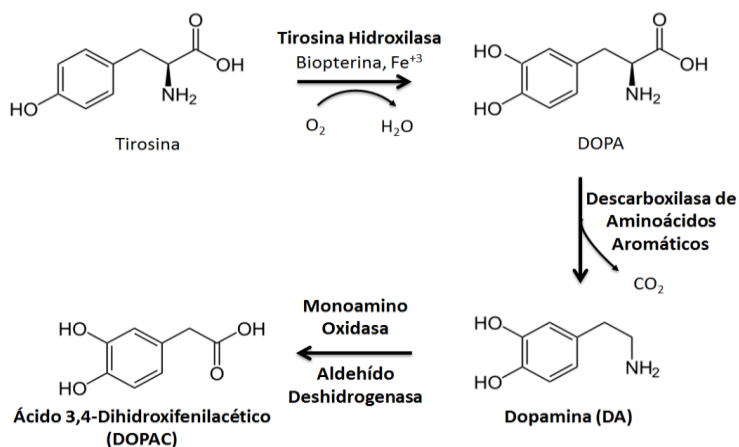
activity. Undoubtedly, the design and pre-clinical evaluation of new structural analogues derived from amphetamine will remain as an objective of our research group.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Dopamina

La dopamina (DA) es un neurotransmisor catecolaminérgico formado estructuralmente por un núcleo catecol unido a una cadena etilamina. Neurofisiológicamente, DA está implicada en diversas funciones a nivel cerebral, por lo que variaciones en su síntesis o catabolismo se asocian a importantes neuropatologías, tales como la Enfermedad de Parkinson (principalmente por déficit de DA) o Esquizofrenia (principalmente por exceso de DA límbica). La DA es sintetizada a partir del aminoácido tirosina (ver Figura 1), el cual se obtiene directamente desde la dieta o a partir de la hidroxilación de la fenilalanina. En esta ruta de biosíntesis de DA, la enzima limitante es la tirosina hidroxilasa (TH), la cual está encargada de formar L-dopa que es el precursor directo de la DA. El principal metabolito de DA proveniente de la metabolización por la monoamino oxidasa (MAO) es el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), el cual es uno de los analitos medidos en esta tesis.

**Figura 1:** Síntesis y Catabolismo de Dopamina



### 1.1.1. Dopamina y Circuito de la Recompensa

El conjunto de reacciones biosintéticas de DA es llevado a cabo principalmente en neuronas que forman parte de circuitos dopaminérgicos cerebrales y que se localizan principalmente en el Núcleo Arcuato del Hipotálamo (Sistema Tuberoinfundibular), en la Sustancia Negra parte compacta (SN: Sistema Nigroestriatal) y en el Área Tegmental Ventral (VTA: Sistema Mesocorticolímbico). El sistema dopaminérgico Mesocorticolímbico o circuito de la recompensa, es el circuito neuroanatómico responsable de la percepción final del placer [1] frente a diversos estímulos, tales como la ingesta de alimentos, líquidos [2,3], el sexo [4], entre otros. Neuroquímicamente este efecto recompensante se produce por la liberación de DA en Núcleo Accumbens (NAcc) y en la Corteza Prefrontal (CPF) desde las proyecciones aferentes provenientes del VTA [5,6] (ver Figura 2). La liberación de DA en estas áreas está regulada por interneuronas GABAérgicas del propio VTA, que en ausencia de estímulos recompensantes inhiben la liberación de DA [7,8].

Figura 2: Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico de Rata.

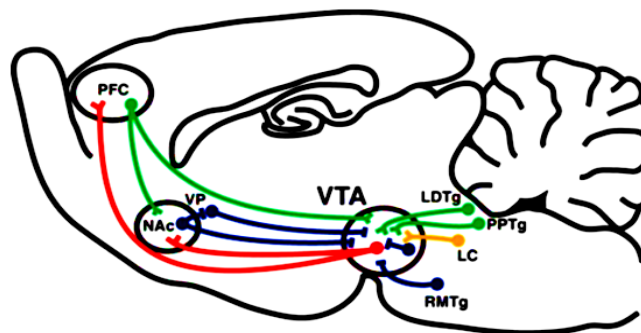


Figura 2: Figura adaptada de Morikawa y cols.[9]. En rojo neuronas dopaminérgicas, en verde glutamatérgicas, en azul GABAérgicas y en amarillo neuronas noradrenérgicas. PFC, corteza prefrontal; NAc, Núcleo Accumbens; VP, palido ventral; VTA, área tegmental ventral; LDTg, tegmento laterodorsal; PPTg, núcleo pedunculopontino tegmental; LC, locus coeruleus; RMTg, núcleo rostromedial tegmental.

## 1.2. Dopamina y Neurobiología de la Adicción

La drogadicción es una enfermedad crónica recidivante que se caracteriza por la búsqueda y consumo compulsivo de la sustancia adictiva, pérdida del control en limitar su ingesta y el surgimiento de un estado emocional negativo (por ejemplo, disforia, ansiedad e irritabilidad) durante la abstinencia al consumo de la droga [5,10,11]. Las drogas de abuso se caracterizan porque son capaces de generar refuerzos positivos y refuerzos negativos tras un periodo libre de la droga. Los refuerzos positivos, tales como el placer y euforia, se asocian a la impulsividad previa al consumo de la sustancia adictiva, mientras que los refuerzos negativos, es decir estrés, ansiedad, entre otros (síndrome de abstinencia) se han asociado a trastornos compulsivos, los que llevan a una automaticidad en la administración [10]. Dichos refuerzos son característicos de cambios neuroplásticos que se producen tras administraciones repetidas de la droga, provocando lo que se conoce como dependencia, la que determina la aparición de tolerancia y el síndrome de abstinencia [5]. El síndrome de abstinencia genera entre otros síntomas el *craving* o avidez [10], que corresponde a los deseos urgentes e intensos en la búsqueda compulsiva de la droga, que llevan a desencadenar una recaída en el consumo [10-12].

A nivel neurofisiológico, la plasticidad observada en el proceso adictivo involucra varias áreas cerebrales, en donde neurotransmisores como la DA y el glutamato (GLU), participan en el fortalecimiento o debilitamiento de sinapsis del circuito de la recompensa [13]. En este sentido, el fortalecimiento sináptico inducido por las drogas 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 [14].

### **1.3. Técnicas de Monitorización de Neurotransmisores y Modelos Animales Para Estudiar los Efectos de las Drogas de Abuso**

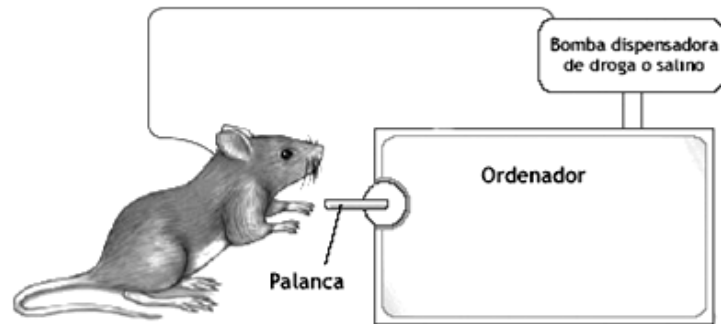
Todas aquellas moléculas con potencial psicoactivo y a las cuales se les sospecha un mecanismo de acción central, pueden ser sometidas a una batería de pruebas preclínicas focalizadas a dilucidar los efectos de estas moléculas sobre la neurotransmisión, tanto a nivel neuroquímico y conductual. A nivel neuroquímico, se han utilizado diversas técnicas que permiten monitorizar los cambios en la liberación de neurotransmisores, por ejemplo la amperometría, la voltametría cíclica de rápido escaneo, los biosensores y la microdiálisis cerebral *in vivo*, entre otras. Esta última técnica ha sido ampliamente utilizada para dilucidar los efectos sobre la liberación de neurotransmisores producidos por la administración sistémica o central de drogas. En este sentido, drogas que afectan sistemas monoaminérgicos han sido ampliamente estudiadas usando la microdiálisis cerebral *in vivo*, tanto en animales anestesiados y despiertos [15]. Esta última aproximación (animal despierto), ha permitido establecer correlaciones entre la conducta inducida por las drogas y los cambios en los niveles de neurotransmisores [2,3,5,6]. No obstante, el uso de la microdiálisis cerebral en animales anestesiados presenta como ventaja alternativa, la determinación de efectos farmacológicos sin que interfieran estímulos externos.



### 1.3.1. Modelos Animales Para el Estudio del Potencial Adictivo de las Drogas de Abuso

Respecto a los modelos animales utilizados para el estudio del potencial adictivo de nuevas drogas, se han establecido 3 tipos de paradigmas. El primero de ellos es la autoadministración y se basa en un paradigma operante derivado de la caja de Skinner en que el animal debe realizar un trabajo (presionar una palanca, introducir el hocico en un hoyo) para obtener una recompensa, que generalmente es asociada a la administración de una droga de abuso [16]. La principal ventaja de este paradigma es que permite al experimentador evaluar las etapas del proceso adictivo, como la adquisición, la mantención y las recaídas al consumo de las drogas de abuso [16,17] (ver Figura 3).

**Figura 3:** Esquema del Modelo de Autoadministración de Drogas de Abuso.

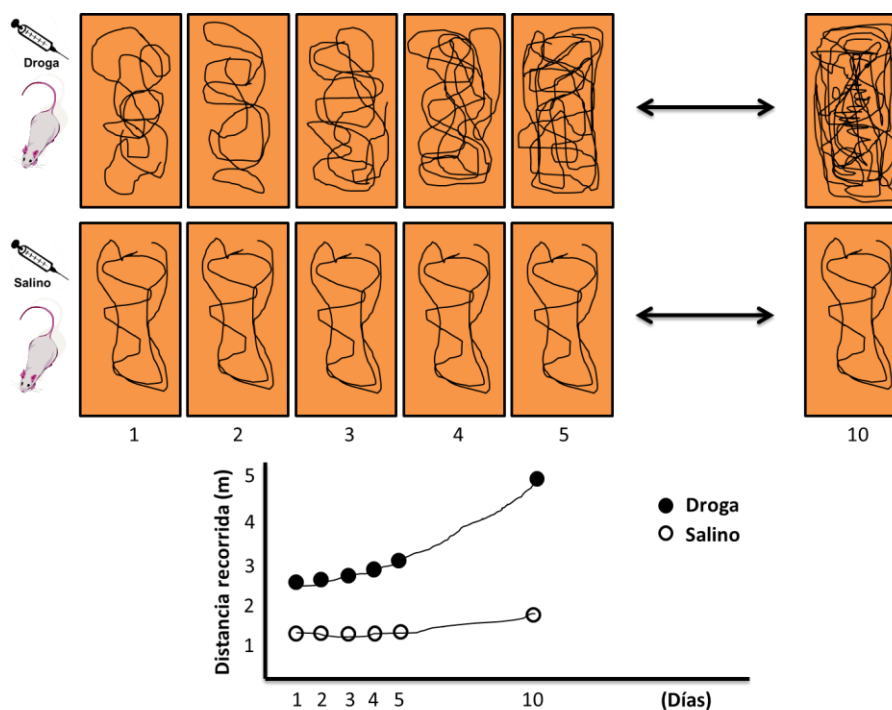


**Figura 3:** El esquema nos muestra la acción operante que realiza el animal al apretar una palanca que le entrega una dosis intravenosa de la droga. El contexto ambiental del modelo de autoadministración implica que el proceso se lleva a cabo en una caja con claves ambientales que favorecen el aprendizaje del animal. Por ejemplo una luz ambiental que se prende cuando el animal aprieta la palanca (acción operante) que le entrega la droga.

En los otros dos paradigmas experimentales para estudiar el proceso adictivo, y que han sido utilizados en esta tesis, la administración de la droga de abuso es realizada por parte

del experimentador (ejemplo: oral, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea). En este sentido, la actividad locomotora permite evaluar el potencial psicoactivo de la droga, ya que de manera directa o indirecta si la droga favorece la liberación de DA a nivel estriatal se observará un aumento de la locomoción del animal [18]. Este paradigma, ha servido también para desarrollar el modelo de sensibilización locomotora, en donde a través de la administración repetida de la droga de abuso se observa un aumento progresivo de la respuesta locomotora [19,20] (ver Figura 4).

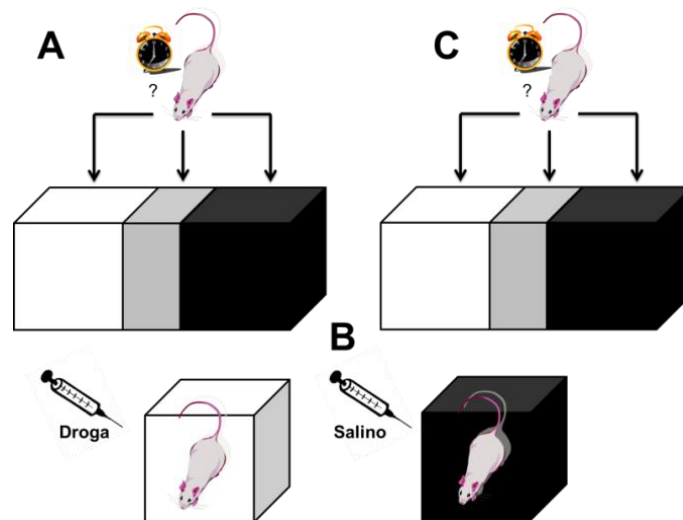
**Figura 4:** Esquema del Modelo de Actividad Locomotora y del Proceso de Sensibilización Locomotora.



**Figura 4:** El esquema muestra el aumento de la actividad locomotora mediada por la administración de la droga. Para el caso de esta tesis solo se midió el efecto de la administración de una dosis de la droga (día 1), Sin embargo se puede medir la actividad locomotora durante días progresivos (día 1 al 5), observándose un leve aumento de la misma al pasar los días. Por otro lado, la sensibilización del animal a los efectos de la droga, puede observarse que después de un breve periodo de abstinencia (día 10).

El otro paradigma utilizado para evaluar conductas tipo adictivas es el de preferencia de lugar condicionado (CPP) a la droga, el cual permite evaluar la asociación al contexto de administración de la droga en equipos de dos o tres compartimientos. La Figura 5 nos muestra un esquema de un equipo de CPP sesgado de 3 compartimientos que son distintos entre sí, tanto en color como en textura del piso, lo que establece un sesgo para el animal [21]. En este sentido, el CPP es una herramienta poderosa y económica para evaluar el potencial adictivo de drogas y el detalle del procedimiento para el uso de este equipo se revisará en la Sección de Materiales y Métodos de esta tesis.

**Figura 5:** Esquema del Equipo y Fases del Paradigma de Preferencia de Lugar Condicionado (CPP).



**Figura 5:** Fase A) Pretest: medición del tiempo de permanencia en las tres cámaras. Fase B) Condicionamiento: administración por parte del experimentador de la droga en la cámara de menor preferencia y de solución salina fisiológica en la de mayor preferencia. Fase C) Test: medición del tiempo de permanencia en las tres cámaras.

## 1.4. Anfetamina y Sus Derivados Sintéticos

### 1.4.1. Anfetamina, una Droga Clásica

Químicamente la anfetamina corresponde a la 1-fenilpropan-2-amina, aunque su nombre genérico deriva de la contracción de su nombre químico en inglés “ **$\alpha$ -methyl-phenethyl-amine**” (*amphetamine*). La anfetamina corresponde a una mezcla racémica, en la que ambos isómeros tienen las propiedades farmacológicas de aumentar las concentraciones extracelulares de DA, noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) en el espacio sináptico [22]. A nivel de mecanismo de acción, la anfetamina, al igual que la cocaína, inhibe la recaptación de monoaminas, específicamente inhibiendo con mayor potencia el transportador de DA (DAT). La anfetamina, a diferencia de la cocaína y el metilfenidato, actúa como sustrato de DAT, invirtiendo el flujo de DA a través del transportador DAT y del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2). Este efecto llevaría al aumento de la liberación de DA desde las vesículas al citosol y desde el citosol al espacio sináptico [23], lo que permite explicar el gran efecto liberador de neurotransmisor inducido por esta droga. Además, recientemente se ha sugerido que las vesículas que contienen DA estarían “enganchadas” a DAT, liberando su contenido directamente al espacio extracelular [24]. Por otra parte, también se ha descrito que la anfetamina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima MAO [25]. Clínicamente, la anfetamina es un fármaco terapéuticamente útil en el tratamiento del déficit atencional con hiperactividad y el síndrome narcoléptico, ya que aumenta el estado de alerta y disminuye el cansancio entre otros efectos farmacológicos. Sin

embargo, estos efectos positivos se ven opacados por causa de eventos adversos asociados a su potencial de dependencia y adicción, y a nivel cardiovascular por su capacidad de generar hipertensión y valvulopatías [22]. Por este motivo, durante las últimas décadas se han diseñado nuevos derivados anfetamínicos con el objetivo de mantener sus propiedades psicoestimulantes y reducir los efectos farmacológicos indeseados.

#### **1.4.2. Nuevas Sustancias Psicoactivas**

El exhaustivo control legal en la tenencia y uso de drogas de abuso clásicas, como la anfetamina, la heroína y los cannabinoides, entre otras, ha llevado al surgimiento de nuevas sustancias psicoactivas (NPS; de su sigla en inglés “*New Psychoactive Substances*”), también conocidas como “*legal highs*” o drogas de diseño. El término NPS agrupa actualmente a todas estas drogas que no son controladas por la Convención de Estupefacientes de 1961 o al Convenio de 1971 sobre sustancias psicotrópicas [26], ya que las modificaciones estructurales permiten mantener los efectos característicos de su droga de origen pero sin las restricciones legales para su uso [27]. En este sentido, las principales alzas en nuevas NPS durante los últimos años corresponden a catinonas sintéticas, cannabinoides sintéticos y derivados anfetamínicos.

#### **1.4.3. Clasificación de los Derivados Anfetamínicos**

En la actualidad existe una amplia gama de derivados anfetamínicos, cuya actividad farmacológica depende en gran medida del número y posición de las sustituciones en la estructura anfetamínica base. Así, derivados tales como trimetoxianfetamina (TMA) y

2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina (DOM) carecen de efecto psicoestimulante, pero son potentes alucinógenos [28-30]. Respecto a la relación estructura actividad de la anfetamina se ha propuesto una clasificación para sus derivados basados en los siguientes efectos farmacológicos [28-31]:

- **Psicoestimulantes:** Derivados anfetamínicos caracterizados por la 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-metilendioximetanfetamina (MDMA), el cual produce una mayor liberación de 5-HT que DA. Algunas de estas drogas entactógenas son aquellas mono sustituidas en la posición *para* del anillo fenílico, como por ejemplo 4-metiltioanfetamina (MTA).
- **Alucinógenos:** 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, ya que actúan como agonistas de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> y se caracterizan por presentar una tri-sustitución en el anillo aromático.

#### 1.4.4. Derivados Anfetamínicos del Tipo Metiltioanfetamina

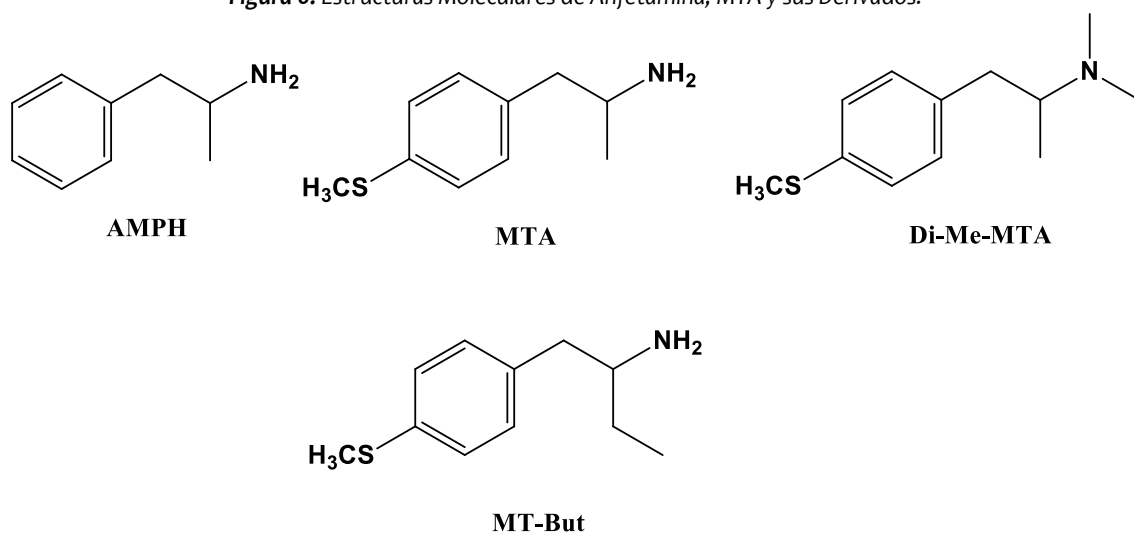
La metiltioanfetamina más estudiada corresponde a la 4-MTA (ver Figura 6) o también conocida como “*flatliner*” [32]. Esta droga es una sustancia psicoactiva derivada de anfetamina que presenta una metiltio-sustitución en posición *para* del anillo aromático,

y que ha sido caracterizada como una droga entactógena [32]. Es considerada un potente liberador de 5-HT que no provoca efectos neurotóxicos [33] y presenta un efecto bloqueador del transportador de 5-HT (SERT) [34]. Recientemente, nuestro grupo ha caracterizado el efecto dopaminérgico de MTA a través de estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, observándose que el mecanismo de acción dopaminérgico se produce por bloqueo de DAT [35]. Además, también se ha demostrado un potente efecto inhibitorio de la isoforma A de la enzima MAO (MAO-A) [36-38].

Buscando nuevos derivados de esta droga que mantengan la actividad farmacológica de MTA sobre las monoaminas, se diseñó un nuevo derivado con sustituciones en el grupo amino de la cadena alifática, correspondiente a la *N,N*-dimetil-MTA (ver Figura 6). La caracterización farmacológica de esta nueva molécula demostró que aumenta los niveles extracelulares de DA [39] y 5-HT [40], e inhibe la actividad de la MAO-A [40]. Además, evaluando los efectos sobre el sistema cardiovascular de MTA y *N,N*-dimetil-MTA, se demostró que esta última molécula no afecta la contractibilidad aórtica *in vitro* [39], favoreciendo un mejor perfil de seguridad cardiovascular del derivado de MTA.

En este sentido y en la búsqueda de nuevos derivados de MTA que mantengan las propiedades psicoestimulantes y entactógenas, pero con un perfil de seguridad mejor a nivel cardiovascular, se decidió estudiar en esta tesis un nuevo derivado de 4-MTA, la *p*-metiltio-fenil-2-butanamina (MT-But; ver Figura 6), usando modelos conductuales y evaluaciones neuroquímicas comparativas contra MTA.

**Figura 6:** Estructuras Moleculares de Anfetamina, MTA y sus Derivados.



**Figura 6:** AMPH (anfetamina), MTA (metiltioanfetamina), Di-Me-MTA (N,N-dimetiltioanfetamina), MT-But (p-metiltio-fenil-2-butanamina).



## 2. HIPÓTESIS

La hipótesis de este proyecto de tesis es la siguiente: **“p-metiltio-fenil-2-butanamina (MT-But), un derivado estructural de MTA, mantiene una actividad dopaminérgica similar al MTA, evidenciada por la liberación de dopamina en Núcleo Accumbens y la generación de las conductas tipo adictivas (como la actividad locomotora y la preferencia de lugar condicionado a la administración de la droga)”**.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

Estudiar los efectos de *p*-metiltio-fenil-2-butanamina (MT-But) en ratas Sprague-Dawley machos adultas sobre la neuroquímica del sistema dopaminérgico mesolímbico y las conductas asociadas a la administración de la droga.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad locomotora inducida por la administración de MT-But en ratas machos adultas, mediante la grabación de videos y posterior análisis de los mismos. Además, comparar este efecto con el producido por la administración de la droga de síntesis MTA y de solución salina fisiológica.
- Determinar la preferencia de lugar condicionada a la administración de MT-But en ratas machos adultas, mediante la grabación de videos y posterior análisis de los mismos. Además, comparar este efecto con el producido por la administración de la droga de síntesis MTA y de solución salina fisiológica.
- Determinar la liberación de DA en NAcc inducida por la administración de MT-But en ratas machos adultas, mediante microdiálisis cerebral *in vivo* y posterior determinación con HPLC acoplado a detección electroquímica. Además, comparar este efecto con el producido por la administración de la droga de síntesis MTA.
- Determinar el efecto de la administración de MT-But sobre el contenido de DA y de DOPAC (principal metabolito de DA) en NAcc de ratas machos adultas,

mediante procesamiento del tejido y posterior determinación con HPLC acoplado a detección electroquímica. Además, comparar este efecto con el producido por la administración de la droga de síntesis MTA y de solución salina fisiológica.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Animales

En esta tesis se utilizaron ciento un ratas Sprague-Dawley machos adultos (60-80 días de edad) en todos los procedimientos experimentales. Todos los animales fueron alojados en una sala con temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad ( $55 \pm 5 \%$ ) controladas, y bajo ciclos día-noche (12:12), encendiendo las luces a las 8:00 am. Los animales fueron agrupados de a 3 por jaulas de tamaño estándar (8,5 cm de alto, 10 cm de ancho y 18,5 cm de largo) con disponibilidad de agua y comida *ad libitum*, en una sala de mantención de animales de experimentación del Instituto de Fisiología (Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso) bajo las condiciones anteriormente descritas. El estado general de salud de los animales fue observado a diario y hasta el término de cada serie experimental, haciendo todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número y sufrimiento de los animales utilizados en esta tesis. En este sentido, se realizó el curso de “Manejo y uso de ratas y ratones para experimentación – versión 2015” (Ver Anexo 9.1).

### 4.2. Reactivos

La *p*-metiltio-fenil-2-butanamina (MT-But) y *p*-metiltioanfetamina (MTA), ambas como clorhidrato, fueron sintetizadas por el Dr. Patricio Iturriaga-Vásquez (Universidad de la Frontera) de acuerdo a ruta de síntesis publicada previamente [41]. El EDTA, ácido 1-octanosulfónico, DA y DOPAC fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, Missouri, USA). Todos los otros reactivos utilizados en cromatografía líquida fueron de grado analítico.

### **4.3. Pruebas Conductuales**

#### **4.3.1. Prueba de Preferencia de Lugar Condicionado (CPP)**

**4.3.1.1. Equipo de CPP:** El equipo de CPP consta de tres compartimientos (blanco, negro y gris), conectados entre sí por puertas móviles de acción manual tipo guillotina. Los compartimientos blanco y negro son de igual tamaño y sus dimensiones son 21 cm de ancho, 21 cm de largo y 28 cm de alto. El compartimiento central que conecta el compartimiento negro y blanco es de menor tamaño, de color gris y sirve como punto de partida durante las pruebas. El compartimiento blanco tuvo paredes y suelo liso, iluminado con luz blanca tenue que genera una intensidad lumínica de 30 lux en el centro del compartimiento. El compartimiento gris fue de paredes y suelo liso sin iluminación, mientras que el compartimiento negro tuvo paredes lisas, el suelo con una malla con orificios pequeños y sin iluminación ambiental. Cada animal fue filmado por cámaras inalámbricas (modelo LX-C202, Lynx Security, China) fijas sobre cada equipo de CPP, que transmitieron la videograbación a un ordenador en otra habitación. El tiempo de permanencia (segundos) de cada animal en cada uno de los compartimientos fue determinado manualmente.

**4.3.1.2. Protocolo para inducir CPP:** Las ratas sometidas a CPP fueron divididas en tres grupos experimentales (MT-But 5.0 mg/kg i.p., MTA 5.0 mg/kg i.p. y grupo control salino 1.0 mL/kg i.p.) y el protocolo de CPP estuvo dividido en tres fases (Pre-test, Condicionamiento y Test) (ver Figura 5). La fase de Pre-test correspondió a una sesión en ausencia de inyección. En esta fase los animales fueron puestos en el compartimiento

gris con ambas puertas móviles abiertas. Los animales tuvieron un periodo de aclimatación al equipo de 3 min, para luego registrar por los siguientes 15 min el tiempo de permanencia en cada uno de los compartimientos. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que las ratas presentan una preferencia natural por el compartimiento negro durante la etapa de Pre-test en un equipo de CPP de iguales características al usado en esta tesis [35,39]. Con los valores de tiempo de permanencia en los compartimientos obtenidos en el Pre-test, se definió al compartimiento blanco como el compartimiento de menor preferencia y en el cual se administraron las drogas a evaluar en esta tesis (MT-But y MTA), mientras que la inyección de solución salina fisiológica fue realizada en el compartimiento negro de mayor preferencia inicial.

La fase de Condicionamiento comenzó 24 hrs después de la fase de Pre-test y duró 5 días. Durante esta fase cada animal recibió 2 inyecciones diarias. La primera de las inyecciones fue durante la mañana y consistió en la administración de las drogas a evaluar (MT-But o MTA) en el compartimiento blanco del equipo de CPP, mientras que la administración de solución salina al grupo control fue realizada en el compartimiento negro. Durante la tarde y al menos 4 hrs después de la inyección de la mañana, los animales de los grupos MT-But y MTA recibieron la inyección de solución salina fisiológica en el compartimiento negro, mientras que el grupo control recibió la inyección de solución salina fisiológica en el compartimiento blanco. Después de cada inyección los animales fueron confinados al respectivo compartimiento por 60 min.

El Test, la etapa final del CPP, fue realizada 24 hrs después de la última sesión de condicionamiento (7<sup>mo</sup> día) y consistió en dejar explorar libremente los 3 compartimientos del equipo de CPP. En esta fase, las ratas fueron puestas nuevamente en el compartimiento central del equipo con ambas puertas móviles abiertas, en donde los animales tuvieron un periodo de aclimatación al equipo de 3 min, para luego registrar por los siguientes 15 min el tiempo de permanencia en cada compartimiento. La diferencia de tiempo ( $\Delta T$ ) en segundos entre la permanencia en el compartimiento de menor preferencia inicial en el test y el Pre-test se usó para determinar el grado de condicionamiento en los animales según el tratamiento. Cabe señalar que cada compartimiento del equipo de CPP fue limpiado con una solución de etanol al 20 %  $v/v$  entre cada ensayo.

#### **4.3.2. Prueba de Actividad Locomotora**

La actividad locomotora fue medida como distancia recorrida en metros (m) para los grupos control y tratados con las drogas a evaluar (MT-But y MTA), según protocolos descrito previamente [42]. Brevemente, cada animal fue colocado en una jaula de ensayo cuyas dimensiones son 44 cm de largo x 22 cm de alto x 28 cm de ancho y en donde se registró la actividad locomotora basal durante los primeros 30 min. Una vez transcurridos los 30 min de actividad locomotora basal se inyectó a los animales con MT-But (2.5, 5.0 y 10.0 mg/Kg i.p.), MTA (2.5 y 5.0 mg/kg i.p.) o solución salina fisiológica (1.0 mL/Kg i.p.), según corresponda y se registró la actividad locomotora inducida por la droga durante 60 min. La actividad locomotora fue registrada por protocolo de Cámaras

(IP) (modelo LX-C202, Seguridad Lynx, China) fijadas por encima de la jaula de ensayo, conectadas por internet a un computador en otra habitación. Los videos se analizaron con el sistema de seguimiento de vídeo ANY Maze (Stoelting Co., IL, USA).

#### **4.4. Microdiálisis Cerebral *in vivo***

##### **4.4.1 Preparación de Cánulas de Microdiálisis**

Las cánulas de microdiálisis utilizadas en esta tesis fueron de un largo de membrana de 2 mm y provistas por las empresas suecas CMA (modelo CMA-12, 20.000 Dalton de Cut-Off, CMA Microdialysis AB, Kista, Suecia) y AgnTho's (modelo MAB 6.14.2, 15.000 Dalton de Cut-Off, AgnTho's AB, Lidingö, Suecia). Cada cánula de microdiálisis fue activada según protocolo provisto por la empresa respectiva y una vez activadas se les midió el porcentaje de recuperación *in vitro* antes de cada experimento (cánulas CMA promedio de recuperación  $9,00 \pm 0,38$  %; cánulas AgnTho's promedio de recuperación  $8,64 \pm 0,65$  %).

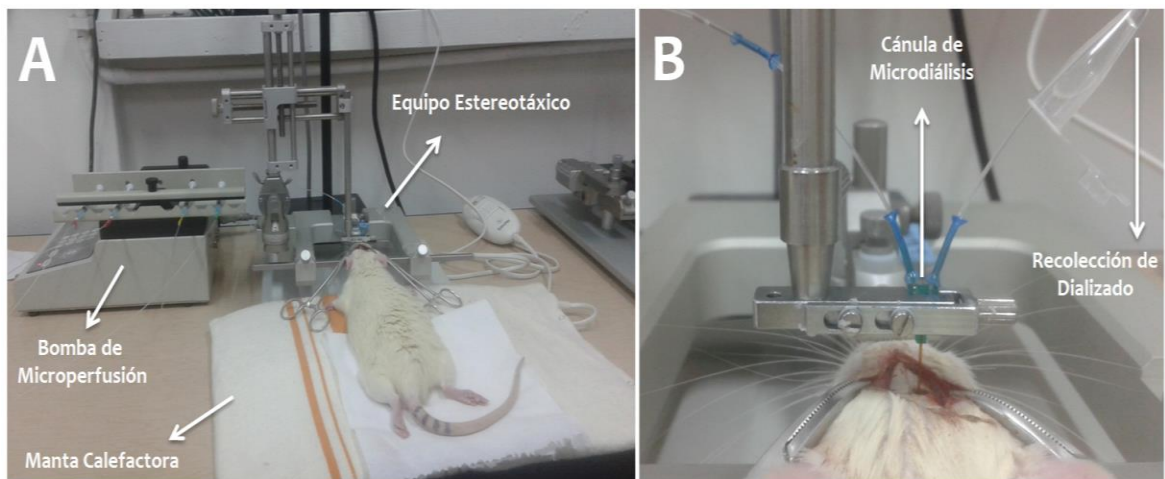
##### **4.4.2. Implantación de Cánulas de Microdiálisis**

Las ratas Sprague-Dawley adultas fueron anestesiadas con Hidrato de Cloral (HC: 400 mg/Kg, i.p.) e instaladas en un equipo estereotáxico (modelo 68002, RWD Life Science Co. Ltd, China). La temperatura corporal de los animales se mantuvo entre 36-37°C con una manta eléctrica controlada por termostato (ver Figura 7). La mantención de la anestesia se logró administrando entre un cuarto a un quinto de la dosis inicial de HC cada 45 min durante todo el curso del experimento. Se expuso el cráneo de los animales a través de una incisión en la piel y un pequeño agujero fue taladrado sobre el área del



NAcc. Lentamente se introdujo la cánula de microdiálisis en el cerebro a una velocidad de 1 mm/min usando las siguientes coordenadas respecto a Bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson [43]: 1.5 mm anterior, 1.50 mm lateral y -8.2 mm ventral. Durante la implantación y a través de todo el experimento, la cánula de microdiálisis fue perfundida con una solución de fluido cerebroespinal artificial (ACSF) compuesta por NaCl 147.0 mM, KCl 2.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM y MgCl 0.85 mM ajustada a pH 7.4 a una velocidad de 2  $\mu$ L/min por medio de una bomba de microinfusión RWD (modelo RWD 210, RWD Life Science Co. Ltd, China).

**Figura 7:** Ejemplo de Microdiálisis Cerebral In Vivo.



**Figura 7:** A) Configuración básica de una microdiálisis cerebral in vivo en animal anestesiado. B) Fotografía ampliada de la implantación craneal de la cánula de microdiálisis.

#### **4.4.3 Protocolo Experimental de Microdiálisis**

Tras la implantación de la cánula de microdiálisis y después de un periodo de estabilización de 90 min, se recolectaron muestras de dializado cerebral cada 10 min según el siguiente protocolo: Tres muestras basales fueron recolectadas a los 10, 20 y 30 min luego de terminado el periodo de estabilización. Al momento de recolectar la tercera muestra se inyectó por vía i.p. una dosis de MT-But (5.0 mg/Kg i.p.) o MTA (5.0 mg/Kg i.p.), continuando cada 10 min hasta los 120 min post-estabilización. Cada una de las muestras de dializado fue recolectada sobre 3  $\mu$ L de PCA 0.02 N para evitar la oxidación de los analitos durante la recolección. Todas las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día de su análisis y se registró en una planilla para cada microdiálisis el protocolo, coordenadas y dosis de anestesia utilizada (ver Anexo 9.2.).

#### **4.4.4 Corroboración de la Postura de la Cánula de Microdiálisis**

Al finalizar cada uno de los experimentos, los animales fueron eutanasiados con guillotina para animales menores (modelo 51330, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA), sus cerebros fueron rápidamente removidos y colocados en una solución de fijación de *p*-formaldehído al 4%*P/v*. Los cerebros, fijados por al menos 14 días, fueron cortados en un criostato semiautomático (modelo KD-2950, Kedee, China) en secciones coronales de 50  $\mu$ m de espesor, teñidos con una dilución de hematoxilina y montados en un portaobjetos con ayuda de gelatina al 1 % *P/v*, para luego microscópicamente verificar la localización de la cánula de microdiálisis (ver Figura 11).

## **4.5. Determinación del Contenido de DA y DOPAC en NAcc**

### **4.5.1 Procedimiento Experimental**

En este protocolo, las ratas fueron divididas en tres grupos: MT-But (5.0 mg/Kg i.p., n=5), MTA (5.0 mg/Kg i.p., n=5) y control (solución salina fisiológica 1.0 mL/Kg i.p., n=4). Los animales correspondientes a los grupos experimentales recibieron una inyección de droga o solución salina según grupo experimental. Sesenta minutos post-inyección los animales fueron eutanasiados con guillotina para animales menores (modelo 51330, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

### **4.5.2 Microdissección y Homogenización del NAcc**

El cerebro fue removido y se microdisectó bilateralmente el NAcc en hielo, usando un molde para cerebro (modelo 68711, RWD Life Science, Shenzhen, P.R.China) y micro sacabocado de 2 mm de diámetro (modelo 15076, Harris Uni-Core, Ted-Pella Inc., CA, USA), según protocolo publicado previamente [44]. Los NAcc fueron pesados individualmente en balanza analítica (modelo JK-180, Chyo, Japón) y posteriormente homogenizados en 400  $\mu$ L de ácido perclórico frío (PCA) 0,2 N usando un sonicador de ultrasonido (modelo XL2005, Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Heat Systems, USA). El homogenizado obtenido fue centrifugado a 13.000 g por 10 min a 4°C en centrifuga refrigerada (modelo Z233MK-2, Hermle Labor Technik GmbH, Wehingen, Alemania) y el sobrenadante obtenido fue separado y filtrado a través de una unidad de filtración de 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro (modelo EW-32816-26, HPLC Syringe Filters PTFE, Cole-Parmer, Instrument Company, USA) para ser usado en la determinación del contenido

de DA y DOPAC en NAcc. La concentración de DA y DOPAC fue expresada en picogramos por miligramo de tejido.

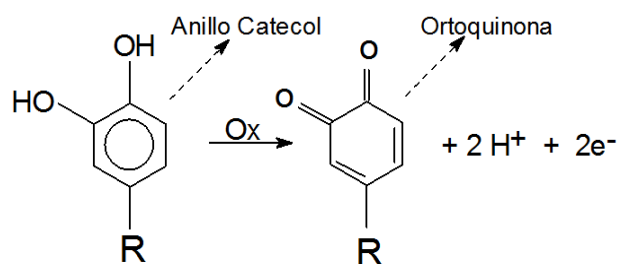
#### **4.6. Determinación de Dopamina y DOPAC por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Detección Electroquímica**

Diez  $\mu\text{L}$  de cada solución filtrada (para medición de contenido) o de las muestras de dializado fueron inyectadas en un sistema de cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC) con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japón), una columna C18 (modelo MF-8912, Microbore UniJet, BAS, West Lafayette, IN, USA) y un detector electroquímico (modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 0.5 nA. La fase móvil que se utilizó para la determinación de DA fue bombeada a un flujo de 0.05 mL/min y tuvo la siguiente composición: 100.0 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 mM de ácido 1-octanosulfónico, 1.0 mM de EDTA y 3.5 %  $\text{v/v}$  de acetonitrilo (ajustado a pH 2.3). Las áreas de los picos de DA y DOPAC en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de DA y DOPAC usando una curva de calibrado realizada en el programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japón). Bajo estas condiciones los tiempos de retención de DOPAC y DA fue de 9 y 12 minutos, respectivamente.

#### 4.6.1 Fundamento Analítico de la Detección de Neurotransmisores y Sus Metabolitos por HPLC-EC

La cuantificación de DA y DOPAC por HPLC-EC es posible debido a que las moléculas catecolaminérgicas pueden ser oxidadas en el anillo catecol, bajo las condiciones antes descritas, generando por cada molécula oxidada 2 electrones (ver Figura 6). Estas corrientes oxidativas son directamente proporcionales a la cantidad de moléculas oxidadas de neurotransmisores, permitiendo generar una curva de calibrado (ver Anexo 9.3 y 9.4).

**Figura 8:** Esquema de Oxidación de Dopamina y su Principal Metabolito (DOPAC).



R = -CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> -NH<sub>2</sub> = Dopamina (3-Hidroxitiramina, 3,4-dihidroxifeniletilamina)

R = -CH<sub>2</sub> -COOH = DOPAC (Ac. 3,4-dihidroxifenil acético)

#### 4.7. Cálculos y Análisis Estadísticos

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

Las figuras que muestran el curso temporal de actividad locomotora (medida como distancia recorrida en m), la diferencia de tiempo en el CPP (medida en s), la liberación

de DA en NAcc (medida como % sobre la liberación basal) y el contenido de DA-DOPAC en NAcc (medido como la concentración en pg por mg de tejido) 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% ( $P \leq 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el

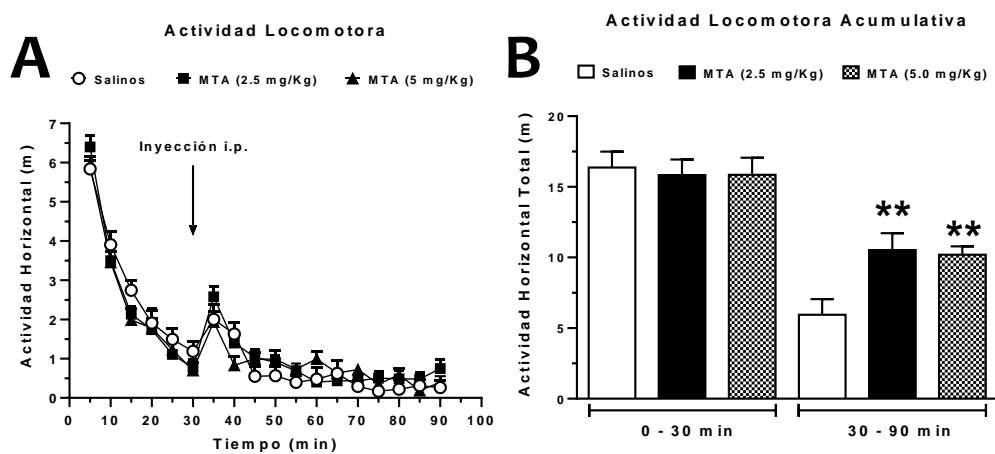
programa GraphPad Prism® v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Actividad Locomotora Basal e Inducida por la Administración Sistémica de MTA

La actividad locomotora basal e inducida por la administración de MTA y solución salina fisiológica fue registrada cada 5 min durante 90 min. La figura 9 nos muestra en el panel A) el curso temporal de la actividad locomotora y en el panel B) la actividad locomotora acumulativa. Durante los primeros 30 min se midió en los animales la actividad locomotora basal producida por la exposición al ambiente nuevo, la cual es alta durante los primeros 10 min en los grupos experimentales (Panel A), sin observarse cambios en la distancia recorrida acumulativa total (Panel B). La actividad locomotora inducida por la inyección de MTA o solución salina fisiológica fue registrada desde los 30 a 90 min de la prueba, observándose que inmediatamente después de la inyección de salino o de la droga se produce una hiperlocomoción (Panel A a los 35 min) inducida por la inyección que actúa como un agente estresor agudo. A pesar que el curso temporal de actividad locomotora muestra un leve aumento en la distancia recorrida en los grupos experimentales tratados con MTA entre los 30 y 90 min (Panel A), al graficar la actividad locomotora acumulativa en este intervalo de tiempo, se observa un aumento estadísticamente significativo de la distancia recorrida total en las ratas tratadas con MTA (2.5 y 5.0 mg/Kg i.p.) respecto a ratas machos control que recibieron solo la inyección de solución salina fisiológica (1.0 mL/Kg i.p.) (Panel B).

Figura 9



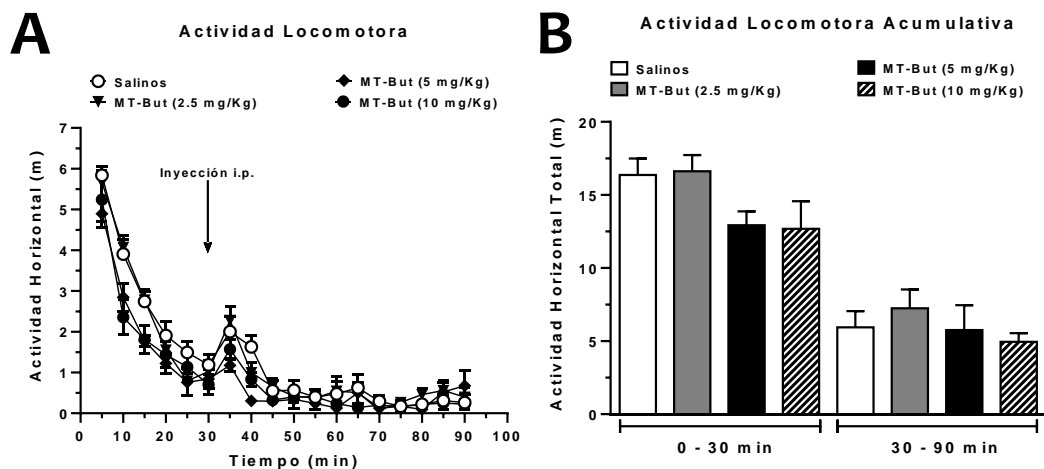
**Figura 9:** Curso temporal de la actividad locomotora durante 90 min (A) y actividad locomotora acumulativa en los intervalos de 0-30 y 30-90 min (B). Los valores representan el promedio de la distancia recorrida en  $m \pm eem$ . La actividad locomotora fue analizada por el programa Any-Maze a intervalos de 5 minutos durante 90 min. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (Grupo salino control  $n = 9$ , Grupo MTA (2.5 mg/kg)  $n = 11$ , Grupo MTA (5.0 mg/kg)  $n = 11$ ), demostrando diferencias estadísticamente significativas ( $[F_{(2,28)}=6.154, P=0.0061]$ ;  $**P<0.01$ ).



## 5.2 Actividad Locomotora Basal e Inducida Tras la Administración Sistémica de MT-But

La actividad locomotora basal e inducida por la administración de MT-But y solución salina fisiológica fue registrada cada 5 min durante 90 min. La figura 10 nos muestra en el panel A) el curso temporal de la actividad locomotora y en el panel B) la actividad locomotora acumulativa. Como puede observarse (Panel B), la actividad locomotora acumulativa basal (0-30 min) e inducida por la inyección de solución salina fisiológica o de las diferentes dosis de MT-But (30-90 min) no produjo cambios estadísticamente significativos en la distancia recorrida total acumulativa entre los grupos experimentales (Panel B).

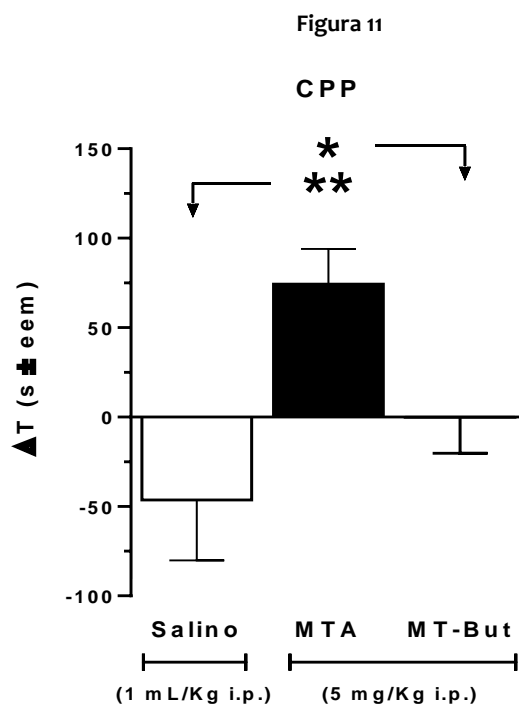
Figura 10



**Figura 10:** Curso temporal de la actividad locomotora durante 90 min (A) y actividad locomotora acumulativa en los intervalos de 0-30 y 30-90 min (B). Los valores representan el promedio de la distancia recorrida en  $m \pm eem$ . La actividad locomotora fue analizada por el programa Any-Maze a intervalos de 5 minutos durante 90 min. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales. (Grupo salino control  $n = 9$ , Grupo MT-But (2.5 mg/kg)  $n = 11$ , Grupo MT-But (5.0 mg/kg)  $n = 7$ , Grupo MT-But (10.0 mg/Kg)  $n = 10$ ), no observándose diferencias estadísticamente significativas ( $[F_{(3, 32)} = 0.6972, P = 0.5606]$ ).

### **5.3 Evaluación de la Conducta tipo Adictiva a través de la Preferencia de Lugar Condicionado a la Droga (CPP)**

La figura 11 muestra el grado de CPP obtenido con la administración repetida de MTA, MT-But y solución salina fisiológica, durante 5 días. El valor positivo de  $\Delta T$  obtenido en el grupo de animales tratados con MTA (5.0 mg/kg i.p.) representa un aumento significativo en el tiempo de permanencia durante la fase de Test en el compartimiento blanco que fue el lugar en donde se administró el MTA. Por otro lado, usando el mismo protocolo de CPP para la administración repetida de MT-But (5.0 mg/kg i.p.), no se observaron cambios estadísticamente significativos en el tiempo de permanencia en el compartimiento blanco en que se administró el MT-But. El análisis estadístico demostró que el grado de condicionamiento inducido por MTA fue estadísticamente significativo respecto al grupo control salino y al grupo tratado con MT-But.



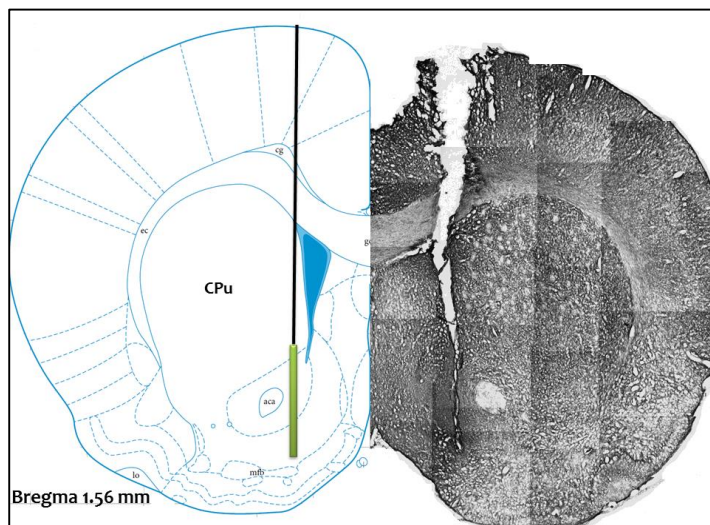
**Figura 11:** Preferencia de lugar condicionado a la administración de MTA y MT-But. Los valores representan el promedio de la diferencia de tiempo en  $s \pm eem$ . El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales (Grupo salino control  $n = 8$ , Grupo MT-But (5.0 mg/kg)  $n = 9$ , Grupo MTA (5.0 mg/kg)  $n = 8$ ), observándose un aumento estadísticamente significativo en el grado de condicionamiento en animales tratados con MTA versus animales control salino y tratados con MT-But ( $[F(2, 22) = 5.674, P = 0.0103]$ ;  $**P < 0.001, *P < 0.01$ ).

#### 5.4 Liberación de DA en NAcc Inducida por la Administración Sistémica de MTA y MT-But

En búsqueda de los experimentos claves que permitiesen la caracterización farmacológica de MT-But y basados en antecedentes de la literatura [35] que demostraron un mecanismo de acción dopaminérgico para MTA, se decidió implantar cánulas de microdiálisis en estriado ventral o NAcc (ver Figura 12) y medir la liberación de DA basal e inducida por la administración sistémica de las drogas (5.0 mg/Kg).

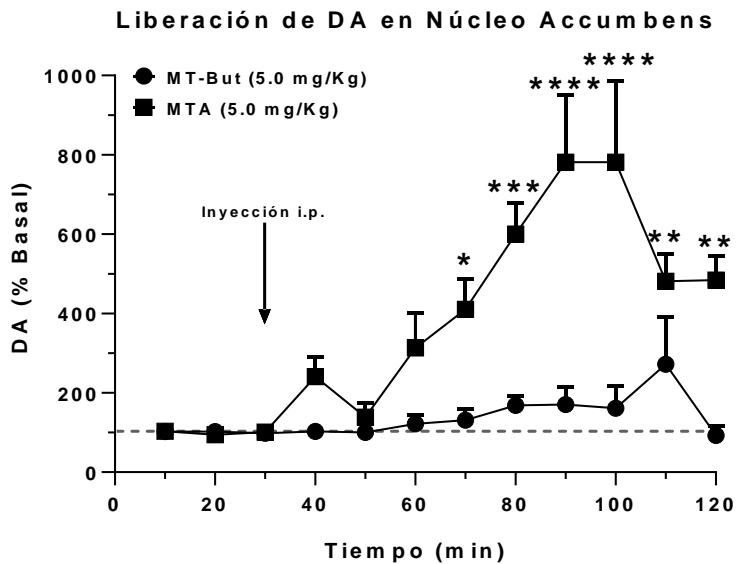
Como se muestra en la figura 12, la liberación de DA en NAcc durante las tres primeras muestras basales obtenidas previo al estímulo (inyección i.p. de droga), no muestra variación entre los distintos animales. No obstante, una vez administrada la dosis de 5.0 mg/kg i.p. de MTA se produjo un aumento significativo del porcentaje de liberación de DA en NAcc respecto a su propio basal, cuyo aumento máximo se observó entre los 60 a 70 min post-inyección del MTA (ver Figura 13). Sin embargo, usando el mismo protocolo experimental no se observó un aumento estadísticamente significativo en la liberación de DA en NAcc inducida por la administración sistémica de MT-But (5.0 mg/Kg). El análisis estadístico de ANOVA de dos colas demostró que las curvas de liberación de DA para la administración de MTA y MT-But son estadísticamente diferentes (Interacción [ $F_{(11, 72)} = 5.019, P < 0.0001$ ]; Tiempo [ $F_{(11, 72)} = 7.960, P < 0.0001$ ]; Droga [ $F_{(1, 72)} = 67.91, P < 0.0001$ ]).

Figura 12



**Figura 12:** Lado derecho muestra un ejemplo de un microcorte coronal de cerebro de rata de 50 µm de espesor que señala la postura de la cánula de microdiálisis. Lado izquierdo de la figura muestra una imagen representativa del cerebro de rata extraída del Atlas de Paxinos y Watson [45], en donde se simula la postura de la cánula y la membrana de diálisis de 2 mm en color verde.

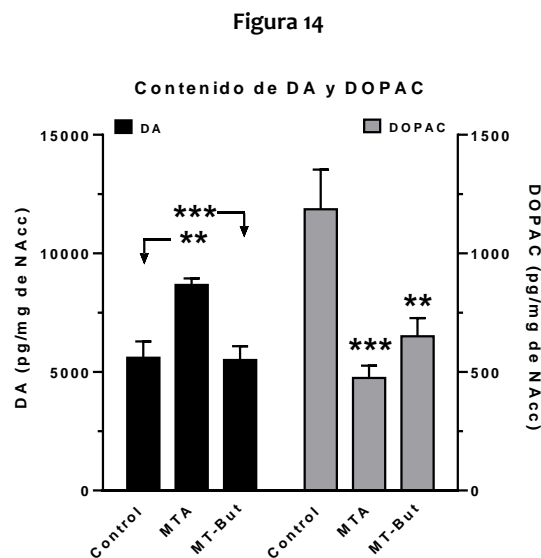
Figura 13



**Figura 13:** Liberación de DA en NAcc basal (durante 30 min) e inducida por la administración sistémica de MTA o MT-But (5.0 mg/kg i.p.). Los resultados se expresan como promedio del % de la liberación basal  $\pm$  eem. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los valores basales y los estimulados para cada grupo experimental (Grupo MTA n = 4, Grupo MT-But n = 4), observándose un aumento estadísticamente significativo en la liberación de DA inducida por MTA ([F (11, 36) = 7.573,  $P < 0.0001$ ]; \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ).

## 5.5 Contenido de DA y DOPAC en NAcc de Ratas Tratadas con MT-But, MTA y Solución Salina Fisiológica

El contenido de DA y DOPAC en NAcc de ratas tratadas con una dosis aguda de MTA y MT-But se midió 1 hr post-inyección de las drogas. La figura 14 nos muestra que la administración de MTA (5.0 mg/Kg i.p.) produjo un aumento significativo del contenido de DA en NAcc, acompañado de una disminución significativa del contenido de DOPAC en la misma área cerebral. Sin embargo, la administración de MT-But (5.0 mg/Kg i.p.) solo produjo una disminución significativa del contenido de DOPAC en NAcc, sin afectar el contenido de DA en la misma área cerebral.



**Figura 14:** Contenido de DA y DOPAC en NAcc 1 hora después de la administración aguda de MTA, MT-But o solución salina fisiológica. Los valores representan el promedio de los pg de DA o DOPAC por mg de NAcc  $\pm$  eem. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales (Grupo salino control  $n = 4$ , Grupo MT-But (5.0 mg/kg)  $n = 5$ , Grupo MTA (5.0 mg/kg)  $n = 5$ ), observándose un aumento estadísticamente significativo del contenido de DA en NAcc inducido por MTA ( $[F_{(2,11)} = 12.41, P = 0.0015]$  \*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$ ) respecto a los grupos salino control y MT-But. Respecto al contenido de DOPAC en NAcc se observó que MTA y MT-But produjeron una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo salino control ( $[F_{(2,11)} = 12.90, P = 0.0013]$  \*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$ ).

## 5.6 Relación entre la Razón (DOPAC/DA) en NAcc de Ratas Tratadas con MT-But, MTA y Solución Salina Fisiológica

La razón (DOPAC/DA) es una forma de analizar el contenido de neurotransmisores y sus respectivos metabolitos que nos entrega valiosa información de la captación neuronal del neurotransmisor y de su metabolismo. La Tabla 1 nos muestra que las razones (DOPAC/DA) en NAcc para los animales tratados con MTA y MT-But fueron significativamente menores al compararlos con el grupo control salino. Adicionalmente, la razón (DOPAC/DA) en NAcc para los animales tratados con MTA fue significativamente menor que la razón (DOPAC/DA) en animales tratados con MT-But.

Tabla 1

Grupos	n	DOPAC (pg/mg ± eem)	DA (pg/mg± eem)	DOPAC/DA (promedio ± eem)	Valor P
Salinos	4	1186,12 ± 167,06	5598,35 ± 687,023	0,211 ± 0,007	---
MTA	5	474,76 ± 51,83	8667,02 ± 272,68	0,055 ± 0,006	< 0,0001 <sup>A</sup>
MT-But	5	650,18 ± 76,84	5502,66 ± 580,39	0,123 ± 0,018	0,0005 <sup>B</sup>
					0,0020 <sup>C</sup>

**Tabla 1:** Muestra el contenido de DA y DOPAC en NAcc, y la razón entre ambos, 60 min posteriores a la administración aguda de MTA (5.0 mg/kg i.p.), MT-But (5.0 mg/kg i.p.) o solución salina fisiológica (1.0 mL/kg i.p.). Los resultados se expresan como promedio ± eem. El análisis estadístico fue realizado por un One-way ANOVA seguido por un post-test Fisher's LSD entre los grupos experimentales, observándose una disminución significativa de la razón (DOPAC/DA) en NAcc entre Grupo MTA v/s Salino Control (A), entre Grupo MT-But v/s Salino Control (B) y entre Grupo MTA v/s MT-But (C).

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis nos demuestran que MT-But, un derivado de MTA, pierde la propiedad de estimular farmacológicamente vías dopaminérgicas relacionadas con motivación y locomoción, y que han sido demostradas previamente para MTA [35]. No obstante si se pudo demostrar que MT-But tiene una actividad inhibitoria de la MAO, observada por una reducción significativa del contenido de DOPAC en NAcc. Sin embargo, no podemos descartar que MT-But genere efectos sobre otros sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos, como el serotoninérgico. Por lo tanto, otros experimentos deben ser realizados para evaluar esta posibilidad.

### 6.1 Efectos Neuroquímicos de MT-But y MTA

Los niveles extracelulares de DA en NAcc aumentaron significativamente luego de la administración de MTA (ver Figura 13), lo que corrobora la capacidad de esta droga para inducir la liberación de este neurotransmisor, demostrada previamente en cuerpo estriado (35). Sin embargo los niveles extracelulares de DA no se modificaron significativamente luego de la administración de MT-But. El aumento en la liberación de DA en NAcc inducida por MTA fue demostrado previamente por estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo* que evidenciaron un mecanismo de acción directo en inhibir el DAT como bloqueador [35], de forma similar a las acciones de cocaína o metilfenidato [46].

Otro mecanismo de acción descrito para MTA es la propiedad farmacológica de inhibir la MAO [29,41,47]. En este sentido, el análisis de contenido de DA y DOPAC en NAcc nos demuestra que MTA produce un aumento en el contenido de DA y una disminución del



contenido de DOPAC. Esto es muy interesante, ya que a través del efecto bloqueador de DAT que posee MTA [35], se produciría el aumento del contenido de DA mediado por el bloqueo de DAT, que impediría la recaptación de DA por el terminal presináptico y la formación de DOPAC producido por la MAO mitocondrial del terminal. Adicionalmente, MTA en la hendidura sináptica estaría inhibiendo a la MAO postsináptica, lo que reforzaría aún más la reducción en el contenido de DOPAC. Por otro lado, en el caso de las ratas tratadas con MT-But en que no se observó un aumento en el contenido de DA, pero sí una reducción significativa del contenido de DOPAC (ver Figura 14), este efecto se podría deber fundamentalmente a la inhibición de la MAO postsináptica que produciría la reducción del contenido de DOPAC y explicaría la leve tendencia a aumentar los niveles extracelulares de DA en NAcc que se observa en la figura 13 y que no alcanza a dar cuenta de un aumento en el contenido de DA en NAcc inducido por MT-But (ver Figura 14). En este sentido, se ha reportado el efecto Inhibidor de MAO (IMAO) de varios derivados anfetamínicos [47] principalmente sobre la isoforma A para drogas psicoestimulantes y entactógenas, pero no así para anfetaminas alucinógenas [29]. La actividad IMAO de MTA y MT-But ha sido reportada previamente por estudios *in vitro* [29,37,41,47] estableciéndose que MTA tiene una actividad inhibitoria aproximadamente 3.4 veces mayor que MT-But (MTA  $IC_{50}$  0.25  $\mu$ M v/s MT-But  $IC_{50}$  0.84  $\mu$ M; [41]). Esta diferencia en la potencia inhibitoria sobre la MAO podría darnos cuenta de las diferencias estadísticamente significativas observadas en el contenido de DOPAC en NAcc entre ratas tratadas con MTA y MT-But.

Utilizando un protocolo experimental parecido al utilizado en esta tesis, Golembiowska y cols. midieron el contenido de DA y DOPAC en NAcc tras una administración aguda de 5.0 mg/kg i.p. de *p*-metoxianfetamina (PMA) y *p*-metoximetanfetamina (PMMA), observando un aumento significativo en el contenido de DA respecto al grupo control, atribuible por los autores al efecto inhibitor de la recaptación de DA [48]. En este trabajo no se observaron cambios estadísticamente significativos en el contenido de DOPAC que podrían ser explicados por la menor actividad IMAO de PMA ( $IC_{50}$  0.55  $\mu$ M; [29]) y PMMA ( $IC_{50}$  1.7  $\mu$ M; [29]), que MTA ( $IC_{50}$  0.25  $\mu$ M; [29]). Sin embargo, el protocolo experimental para medir el contenido de DOPAC fue distinto al utilizado en esta tesis.

En esta tesis evaluamos la razón (DOPAC/DA) (ver Tabla 1), como una forma de estudiar los efectos bloqueadores de DAT e IMAO. En este sentido, la reducción del cociente (DOPAC/DA) respecto a un grupo control puede reflejar la reducción del metabolismo mediado en este caso por la actividad IMAO, o por un aumento de neurotransmisor que puede ser producido por el bloqueo de la recaptación. En el caso de las ratas tratadas con MTA en donde se observó la menor razón de los tres grupos experimentales, se puede establecer que la reducción del cociente se debe a un efecto mixto entre la actividad IMAO y bloqueante de DAT. Por otro lado, la reducción del cociente (DOPAC/DA) observado por la administración de MT-But se debería principalmente a su acción IMAO.

## **6.2 Efectos Conductuales de MT-But y MTA**

Como se observó en la Figura 9.B, la actividad locomotora acumulativa y la preferencia de lugar condicionado (ver Figura 11) inducidos por la administración de MTA, aumentaron significativamente. Sin embargo en ambas pruebas conductuales la administración de MT-But no produjo cambios estadísticamente significativos (ver Figuras 10.B y 11). Estas pruebas conductuales son un fiel reflejo de los efectos neuroquímicos de estas drogas y como discutimos previamente se producirían por el aumento en la liberación mesolímbica y mesoestriatal de DA inducida por MTA. En ambos casos el aumento de DA favorecería la activación de vías generadoras de locomoción (vía directa e indirecta estriatal) y de motivación (a nivel del NAcc), a través de favorecer un aumento de la transmisión sináptica entre neuronas dopaminérgicas y neuronas espinosas medianas [9]. En el caso de MT-But no favorecería la generación de actividad locomotora ni de CPP, ya que no produciría un aumento de la transmisión sináptica.

## **6.3 Relación Estructura Actividad e Hipótesis Serotoninérgica en la Atenuación Dopaminérgica**

Estudios llevados a cabo por Richard Glennon y cols. [30] demostraron como la actividad biológica de los derivados anfetamínicos varía según la estructura de cada molécula. Esto llevó a clasificar a los derivados anfetamínicos en los tres grupos funcionales antes mencionados. Además, en una caracterización adicional de la relación estructura-actividad de las anfetaminas [49,50] se describió que el análogo alfa desmetilado de la anfetamina (feniletilamina) no provoca los efectos psicoestimulantes producidos por la

droga parental, debido al rápido metabolismo por la MAO y una menor lipofilia de la molécula [49,50]. Por esta razón, la ausencia del grupo metilo en la anfetamina genera una disminución de la potencia psicoestimulante [51]. Posteriormente se demostró que los derivados alfa etilhomólogos de PMMA [31] o de MDMA [52,53] tienen una disminución de su potencia psicoestimulante. En resumen, la ausencia del grupo metilo en el carbono alfa de la cadena alifática de los derivados anfetamínicos o sustituciones mayores, disminuyen la potencia psicoactiva de las moléculas. En este contexto nuestros resultados son coherentes con estos estudios previos, y dan cuenta que posiblemente la causa de ausencia de efecto dopaminérgico observado con MT-But, tenga que ver con la presencia de un grupo etilo en posición alfa.

El MTA como droga entactógena se caracteriza por poseer efectos serotoninérgicos [40], adicionales a los dopaminérgicos [35]. De hecho, comparativamente los efectos dopaminérgicos de MTA son menores a los producidos por anfetamina. Esta atenuación dopaminérgica observada en drogas entactógenas (en comparación a las anfetaminas psicoestimulantes) se podría explicar como consecuencia del aumento extracelular de 5-HT. En este sentido, se ha demostrado que el aumento de 5-HT activaría receptores 5-HT<sub>2c</sub> (acoplados a proteína G<sub>q</sub>) que se encuentran expresados principalmente en neuronas GABAérgicas del VTA y del NAcc [54,55]. La activación de receptores 5-HT<sub>2c</sub> en VTA por acción de drogas entactógenas llevaría a la activación de neuronas GABAérgicas del VTA, disminuyendo la liberación de DA en NAcc. En este sentido, a nivel preclínico se ha demostrado que el uso de antagonistas 5-HT<sub>2c</sub> provocaría mayores efectos

recompensantes, mientras que estudios con agonistas 5-HT<sub>2c</sub> disminuirían los efectos dopaminérgicos [55,56].

#### **6.4 Proyecciones Para Futuras Investigaciones**

Como se pudo observar, el principal efecto observado en esta tesis de MT-But fue la actividad IMAO, asociada al no desarrollo de conductas tipo adictivas inducidas por la administración de la droga. Por esta razón y a nivel preclínico, el indagar los efectos de MT-But en modelos de animales depresivos sería la progresión lógica de experimentos a realizar en el futuro. Además, y considerando el efecto liberador de 5-HT observado con MTA, sería muy relevante estudiar a través de microdiálisis cerebral *in vivo*, los posibles efectos serotoninérgicos de MT-But, específicamente en áreas ricas en terminales serotoninérgicos como Hipocampo.

## 7. CONCLUSIONES

- La administración sistémica de MT-But no afecta significativamente la locomoción horizontal en ratas machos adultas, mientras que la droga control MTA si produce un aumento en la actividad locomotora acumulativa.
- La administración sistémica y crónica de MT-But no produce la conducta tipo adictiva de preferencia de lugar condicionado a la droga, mientras que la droga control MTA si produce CPP.
- La liberación de DA en NAcc no se ve afectada tras la administración sistémica de MT-But, mientras que MTA provoca un notorio aumento en los niveles extracelulares de DA en NAcc, respecto a la liberación basal.
- La administración sistémica de MT-But produce una disminución en el contenido de DOPAC en NAcc pero no así de DA, mientras que MTA es capaz de disminuir el contenido de DOPAC y aumentar el contenido de DA en la misma área cerebral.
- La sustitución del grupo metilo en el carbono alfa de la cadena alifática de la molécula de MTA por un grupo etilo (MT-But), anula los efectos dopaminérgicos observados con MTA.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 2002; 36: 229-240.
- [2] Bassareo V, Di Chiara G. 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. *J Neurosci* 1997; 17: 851-861.
- [3] Radhakishun FS, van Ree JM, Westerink BH. Scheduled eating increases dopamine release in the nucleus accumbens of food-deprived rats as assessed with on-line brain dialysis. *Neurosci Lett* 1988; 85: 351-356.
- [4] Pfaus JG, Damsma G, Nomikos GG, Wenkstern DG, Blaha CD, Phillips AG *et al.* Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res* 1990; 530: 345-348.
- [5] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 217-238.
- [6] Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American journal of psychiatry* 2005; 162: 1403-1413.
- [7] Gysling K, Wang RY. Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res* 1983; 277: 119-127.
- [8] Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 1992; 12: 483-488.
- [9] Morikawa H, Paladini CA. Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* 2011; 198: 95-111.
- [10] Koob GF, Arends MA, Le Moal M. *Drugs, Addiction, and the Brain*. Elsevier; 2014.
- [11] Koob GF. Addiction is a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. *Front Psychiatry* 2013; 4: 72.
- [12] Koob GF. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res* 2010; 1314: 3-14.
- [13] Volkow ND, Morales M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 2015; 162: 712-725.
- [14] Huang YH, Lin Y, Brown TE, Han MH, Saal DB, Neve RL *et al.* CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: a critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) receptors. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 2751-2760.
- [15] Herrera-Marschitz M, Arbuthnott G, Ungerstedt U. The rotational model and microdialysis: Significance for dopamine signalling, clinical studies, and beyond. *Prog Neurobiol* 2010; 90: 176-189.
- [16] Kalivas PW, Peters J, Knackstedt L. Animal models and brain circuits in drug addiction. *Molecular interventions* 2006; 6: 339-344.
- [17] O'Brien CP, Gardner EL. Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models. *Pharmacol Ther* 2005; 108: 18-58.
- [18] Steketee JD, Kalivas PW. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological reviews* 2011; 63: 348-365.
- [19] Fuentealba JA. Modelos animales para el estudio de la adicción a drogas de abuso. In: Andrés M, Fuentealba J, Gysling K, Sotomayor-Zárate R editors. *Bases científicas de la drogadicción*: Ediciones Universidad Católica de Chile; 2010. pp. 55-64.
- [20] Hedou G, Homberg J, Feldon J, Heidbreder CA. Expression of sensitization to amphetamine and dynamics of dopamine neurotransmission in different laminae of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 2001; 40: 366-382.
- [21] Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 613-672.
- [22] Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2007; 47: 681-698.



- [23] Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol* 2005; 75: 406-433.
- [24] Egana LA, Cuevas RA, Baust TB, Parra LA, Leak RK, Hochendoner S *et al.* Physical and functional interaction between the dopamine transporter and the synaptic vesicle protein synaptogyrin-3. *J Neurosci* 2009; 29: 4592-4604.
- [25] Sitte HH, Freissmuth M. Amphetamines, new psychoactive drugs and the monoamine transporter cycle. *Trends in pharmacological sciences* 2015; 36: 41-50.
- [26] UNDOC. The challenge of new psychoactive substances 2013.
- [27] Baumann MH, Volkow ND. Abuse of New Psychoactive Substances: Threats and Solutions. *Neuropsychopharmacology* 2016; 41: 663-665.
- [28] Corrigan WA, Coen KM, Saouda FM, Robertson JM, Lodge BA. Discriminative stimulus properties of substituted amphetamine derivatives. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1992; 43: 1117-1119.
- [29] Matsumoto T, Maeno Y, Kato H, Seko-Nakamura Y, Monma-Ohtaki J, Ishiba A *et al.* 5-hydroxytryptamine- and dopamine-releasing effects of ring-substituted amphetamines on rat brain: a comparative study using *in vivo* microdialysis. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014; 24: 1362-1370.
- [30] Glennon RA. Stimulus properties of hallucinogenic phenalkylamines and related designer drugs: formulation of structure-activity relationships. *NIDA research monograph* 1989; 94: 43-67.
- [31] Glennon RA, Young R, Dukat M, Cheng Y. Initial characterization of PMMA as a discriminative stimulus. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1997; 57: 151-158.
- [32] Winstock AR, Wolff K, Ramsey J. 4-MTA: a new synthetic drug on the dance scene. *Drug and alcohol dependence* 2002; 67: 111-115.
- [33] Huang X, Marona-Lewicka D, Nichols DE. p-methylthioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotonin-releasing agent. *European journal of pharmacology* 1992; 229: 31-38.
- [34] Gobbi M, Moia M, Pirona L, Ceglia I, Reyes-Parada M, Scorza C *et al.* p-Methylthioamphetamine and 1-(m-chlorophenyl)piperazine, two non-neurotoxic 5-HT releasers *in vivo*, differ from neurotoxic amphetamine derivatives in their mode of action at 5-HT nerve endings *in vitro*. *J Neurochem* 2002; 82: 1435-1443.
- [35] Sotomayor-Zarate R, Quiroz G, Araya KA, Abarca J, Ibanez MR, Montecinos A *et al.* 4-Methylthioamphetamine increases dopamine in the rat striatum and has rewarding effects *in vivo*. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2012; 111: 371-379.
- [36] Li Q, Murakami I, Stall S, Levy AD, Brownfield MS, Nichols DE *et al.* Neuroendocrine pharmacology of three serotonin releasers: 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butane (MBDB), 5-methoxy-6-methyl-2-aminoindan (MMAi) and p-methylthioamphetamine (MTA). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1996; 279: 1261-1267.
- [37] Scorza MC, Carrau C, Silveira R, Zapata-Torres G, Cassels BK, Reyes-Parada M. Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives: structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1361-1369.
- [38] Scorza C, Silveira R, Nichols DE, Reyes-Parada M. Effects of 5-HT-releasing agents on the extracellular hippocampal 5-HT of rats. Implications for the development of novel antidepressants with a short onset of action. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1055-1061.
- [39] Sotomayor-Zarate R, Jara P, Araos P, Vinet R, Quiroz G, Renard GM *et al.* Improving amphetamine therapeutic selectivity: N,N-dimethyl-MTA has dopaminergic effects and does not produce aortic contraction. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2014; 114: 395-399.
- [40] Gobbi M, Funicello M, Gerstbrein K, Holy M, Moya PR, Sotomayor R *et al.* N,N-dimethylthioamphetamine 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: 1770-1780.

- [41] Hurtado-Guzman C, Fierro A, Iturriaga-Vasquez P, Sepulveda-Boza S, Cassels BK, Reyes-Parada M. Monoamine oxidase inhibitory properties of optical isomers and N-substituted derivatives of 4-methylthioamphetamine. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2003; 18: 339-347.
- [42] Cruz G, Riquelme R, Espinosa P, Jara P, Dagnino-Subiabre A, Renard GM *et al.* Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2014; 46: 322-327.
- [43] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. 2005.
- [44] Espinosa P, Silva RA, Sanguinetti NK, Venegas FC, Riquelme R, Gonzalez LF *et al.* Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats. *Neural plasticity* 2016; 2016: 4569785.
- [45] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Compact sixth edition. Academic Press. 2009.
- [46] Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *European journal of pharmacology* 2003; 479: 23-40.
- [47] Vilches-Herrera M, Miranda-Sepulveda J, Rebolledo-Fuentes M, Fierro A, Luhr S, Iturriaga-Vasquez P *et al.* Naphthylisopropylamine and N-benzylamphetamine derivatives as monoamine oxidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2009; 17: 2452-2460.
- [48] Golembiowska K, Jurczak A, Kaminska K, Noworyta-Sokolowska K, Gorska A. Effect of Some Psychoactive Drugs Used as 'Legal Highs' on Brain Neurotransmitters. *Neurotoxicity research* 2016; 29: 394-407.
- [49] Nichols D. *Medicinal Chemistry and Structure-Activity Relationships*. Amphetamine and its Analogs 1994.
- [50] Young R, Glennon RA. Discriminative stimulus properties of amphetamine and structurally related phenalkylamines. *Medicinal research reviews* 1986; 6: 99-130.
- [51] Huang JT, Ho BT. Discriminative stimulus properties of d-amphetamine and related compounds in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1974; 2: 669-673.
- [52] Nichols DE, Oberlender R. Structure-activity relationships of MDMA-like substances. *NIDA research monograph* 1989; 94: 1-29.
- [53] Oberlender R, Nichols DE. (+)-N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine as a discriminative stimulus in studies of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine-like behavioral activity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1990; 255: 1098-1106.
- [54] Bubar MJ, Cunningham KA. Prospects for serotonin 5-HT<sub>2R</sub> pharmacotherapy in psychostimulant abuse. *Progress in brain research* 2008; 172: 319-346.
- [55] Bubar MJ, Cunningham KA. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence. *Current topics in medicinal chemistry* 2006; 6: 1971-1985.
- [56] Bauer CT, Banks ML, Blough BE, Negus SS. Role of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in effects of monoamine releasers on intracranial self-stimulation in rats. *Psychopharmacology* 2015; 232: 3249-3258.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Certificado de Curso de Manejo y Uso de Ratas y Ratones para Experimentación



**Universidad  
de Valparaíso**  
CHILE

**Dirección de Investigación**

La Dirección de Investigación en conjunto con el **Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales** otorga el presente certificado a:

***Fabrizio Guajardo***

quien ha participado en calidad de asistente en el **Curso "Manejo y uso de ratas y ratones para experimentación - Versión 2015"** aprobando con nota 6,5.

***La jornada realizada contó con 8 horas de duración.***

*APALACV*

Dr. Adrián Palacios Vargas  
**Director de Investigación**  
Universidad de Valparaíso

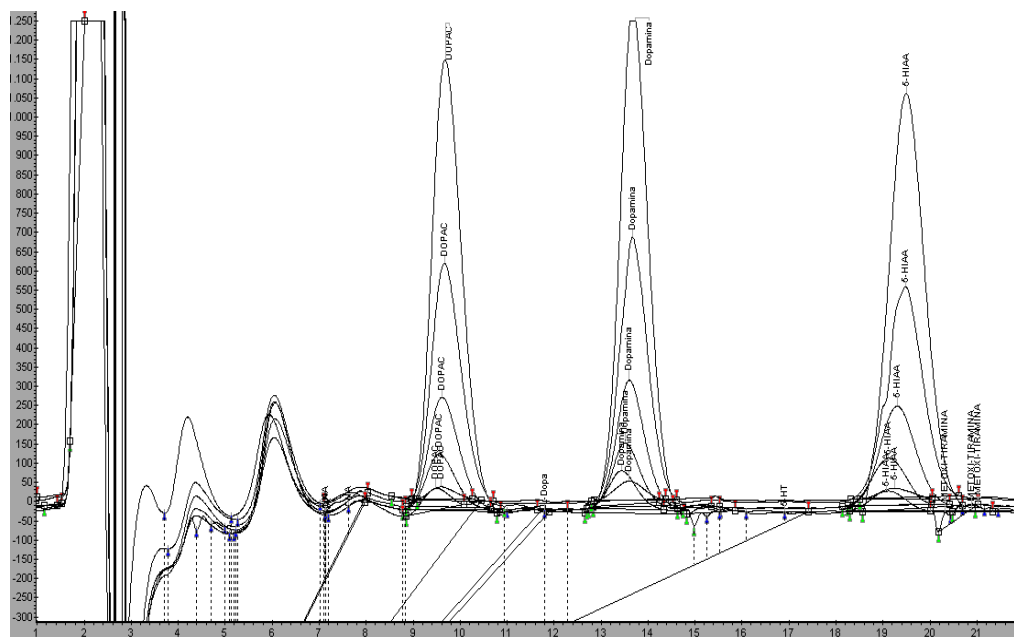
*Sebastián San Martín*

Dr. Sebastián San Martín Henríquez  
**Presidente**  
Comité Institucional de Bioética para la  
Investigación con Animales UV

## 9.2 Planilla de Registro de Microdiálisis

Microdiálisis n°			
RATA			
Rata n°		Camada	
Peso Rata (g)		Sexo	
Sonda		% Recuperación	
COORDENADAS			
	Coordenadas rata	Coord. NAcc	Coord. finales
AP			
ML			
DV			
VHCi 8%			
Dosis ataque			
Hora		Cantidad (mL)	
Dosis mantención			
Hora		Cantidad (mL)	
PROTOCOLO			
Droga		Dosis	
Flujo		uL/min	
Tiempo de recogida		min	
V PCA 0,02N		3 uL	
V total		uL	
Tiempo estabilización		90 min	

### 9.3. Agrupación de Cromatogramas Representativos de la Curva Calibrado Para Medición de DA y DOPAC



### 9.4. Curva de Calibrado de DA

