

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO
POR PASTA BASE DE COCAÍNA VOLATILIZADA***

Martín Galvalisi

Orientadora: **Dra. Cecilia Scorza, IIBCE**

Co-orientador: **Dr. Juan Andrés Abin Carriquiry, IIBCE**

Tribunal: **Dra. Ana Silva y Dra. Patricia Lagos**

Laboratorio de Biología Celular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Montevideo-Uruguay
-Febrero 2013-

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer en primer lugar a Cecilia, mi orientadora, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza en mí, por estar siempre a disposición para ayudarme y principalmente por su buena onda.

A Andrés, mi co-orientador, que al igual que Cecilia, siempre con buena onda estuvo ahí cuando lo necesitaba y nos ayudó a decidir cuáles eran los mejores caminos a tomar a lo largo del proyecto.

A todos mis compañeros del labo: Josepe, Xime, María, Jess, Pao, Gaby, Patito, Ana y Mónica, por estar siempre ahí para lo que yo necesite, por los almuerzos y charlas compartidas, por las risas y por convertir el laboratorio en un lugar agradable en el cual estar.

A la gente del Laboratorio de Neuroquímica, por estar siempre dispuestos a darme una mano y por su buena onda, con lo cual me hicieron sentir como si estuviese en mi laboratorio.

A la gente del bioterio quienes siempre con una sonrisa me dieron una mano en lo que necesitaba y se encargaron del cuidado de los animales.

A mis amigos de la vida: Bacci, Lea, Mati, Mercu, Negro, Javi y Seba; a los amigos del Rojo y a aquellos que tuve la suerte de conocer a lo largo de esta carrera. La verdad que no sé si me ayudaron mucho con esto de recibirme... pero seguro que fue con ellos con quienes pase varios de los mejores momentos en estos años.

A mi familia por su apoyo incondicional y por siempre incentivarme para que haga lo que a mí realmente me gusta hacer.

Y por último, a Buffy y Ramona, por sacrificar horas de sueño para quedarse conmigo y convertirse así en mis principales compañeras de estudio a lo largo de la carrera.

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Definición de Pasta Base de Cocaína	3
1.2 Antecedentes del grupo de investigación	4
1.3 Vías de administración y su implicancia en adicción	5
1.4 Bases neurales en la acción de drogas de abuso	7
1.5 Mecanismo de acción de cocaína	9
1.6 Mecanismo de acción de cafeína	9
2. Hipótesis de Trabajo	11
3. Objetivo General	11
4. Objetivos Específicos	11
5. Materiales y Métodos	13
5.1. Animales	13
5.2. Drogas y dosis	13
5.3. Cámara inhalatoria	14
5.4. Procedimiento de volatilización e inhalación	14
5.5. Modelo Comportamental	15
5.6. Sacrificio de los animales para el análisis de los niveles tisulares de dopamina y metabolitos	15
5.7. Análisis Estadístico	16
6. Resultados	17
6.1. Caracterización del efecto estimulante inducido por cafeína volatilizada y su relación con el sistema DAérgico	17
6.2. Caracterización del efecto estimulante de muestras de PBC con diferente contenido en cocaína y cafeína y su relación con el sistema DAérgico	19
6.3. Evaluación de la contribución de la cafeína en el efecto estimulante producido por PBC y su relación con el sistema DAérgico	22
7. Discusión	26
7.1. Caracterización del efecto estimulante inducido por cafeína volatilizada y su relación con el sistema Daérgico	26
7.2. Caracterización del efecto estimulante de muestras de PBC con diferente contenido en cocaína y cafeína y su relación con el sistema DAérgico	27
7.3. Evaluación de la contribución de la cafeína en el efecto estimulante producido por PBC y su relación con el sistema DAérgico	28
8. Conclusiones	30
9. Perspectivas	31
10. Referencias	32

La Pasta Base de Cocaína (PBC) aparece en nuestro país en el año 2002 y se instala rápidamente generando varios problemas en la salud pública. Esta es una droga psicoestimulante ilegal, cuyos efectos determinan un perfil clínico característico en sus consumidores. La fuerte dependencia a la droga es una de las consecuencias inmediatas luego de su consumo repetido. Se han intentado conocer aquellos factores que contribuyan a la aparición de esa gran dependencia con el fin de determinar tratamientos y terapias específicas para los pacientes adictos a la PBC.

Se sabe que la vía de administración (inhalación pulmonar) es un factor determinante en el efecto estimulante y en el poder adictivo de drogas de abuso; sin embargo, aún no se había estudiado desde el punto de vista pre-clínico su incidencia en el caso de PBC. En estudios previos hemos demostrado que el contenido químico en cocaína (principal alcaloide) y cafeína (principal adulterante) en determinadas muestras incautadas de PBC sería un factor importante que participa en el efecto estimulante inducido por la droga; aunque su influencia no había sido estudiada aún utilizando la vía inhalación pulmonar.

El objetivo del presente trabajo de pasantía se centró en: 1) determinar si la volatilización de diferentes muestras de PBC induce un efecto estimulante, así como estudiar la contribución de la cafeína volatilizada en dicho efecto; 2) caracterizar el efecto estimulante inducido por cafeína volatilizada; 3) evaluar los cambios neuroquímicos en el sistema dopaminérgico en el núcleo accumbens (sistema particularmente vinculado al efecto estimulante y reforzador de drogas de abuso) provocado por los diferentes tratamientos volatilizados.

Ratas macho fueron tratadas con PBC 1 y 2 (con bajo y alto contenido en cafeína, respectivamente), cafeína (25, 50 y 75 mg) y combinaciones de PBC 1 con cafeína agregada (10.5 y 25 mg). La volatilización de las drogas fue realizada reproduciendo el dispositivo casero que usan los consumidores de PBC y en condiciones controladas. El efecto estimulante fue estudiado a través del registro de la actividad locomotora horizontal y la exploratoria vertical ("rearings") utilizando el modelo de campo abierto y un programa de video seguimiento. Los cambios neuroquímicos fueron evaluados mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica.

Los resultados mostraron lo siguiente: 1) cafeína volatilizada indujo un efecto estimulante dosis-dependiente; 2) PBC 2 indujo un efecto estimulante más potente que PBC 1; 3) el agregado de cafeína 25 mg potenció el efecto estimulante inducido por PBC 1 en mayor medida que el agregado de 10.5 mg de cafeína; 4) la combinación

de cafeína y PBC 1 indujo un efecto significativamente menor que el producido por PBC 2; 5) cafeína 50 mg fue el único tratamiento que se asoció con cambios significativos en el sistema DAérgico en el NAcc.

El presente trabajo demostró la inducción del efecto estimulante en animales tratados con PBC volatilizada, evidenciando también por primera vez el efecto estimulante *per se* producido por cafeína volatilizada y la capacidad de ésta de potenciar el efecto producido por PBC volatilizada. A su vez, nuestro modelo comportamental sugiere que al menos otro factor además de la cafeína (la temperatura de volatilización de PBC), podría estar jugando un rol fundamental en la diferente capacidad estimulante observada. Este trabajo aporta información relevante que demuestra la incidencia de la vía de administración junto al de la composición química en el efecto farmacológico de PBC.

1. INTRODUCCIÓN.

Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso de bajo costo que se consume en el Uruguay desde el año 2002. Su rápida instauración y la alta dependencia que genera en sus consumidores ha provocado un serio problema de salud pública en nuestro país ¹. La escasa información publicada que existía en ese momento favoreció el inicio de una línea de investigación que se lleva a cabo en el Laboratorio de Biología Celular, iniciándose formalmente en el año 2007 y que continúa desarrollándose hasta el momento. Dicha línea de trabajo tiene como objetivo principal conocer los efectos que ejerce la droga en el Sistema Nervioso Central (SNC) así como comprender los factores que llevan a la aparición del perfil clínico característico de sus consumidores. El presente trabajo de pasantía se desarrolló en el marco de esta línea de trabajo y fue parte de un proyecto de iniciación financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación 2010-2011.

1.1 Definición de Pasta Base de Cocaína

PBC es un producto intermediario en el procesamiento requerido para la extracción del alcaloide cocaína y su purificación, hasta la obtención final de la cocaína en su forma de clorhidrato (Figura 1). Se obtiene de la maceración de las hojas del arbusto *Erythroxylon coca* con ácido sulfúrico u otros productos químicos alcalinos y solventes orgánicos. La mezcla posee un color amarillento o amarronado, semisólido, conteniendo cocaína – en su forma de base libre- otros alcaloides de la planta, residuos de kerosene y ácido sulfúrico además de otras impurezas que forman parte del procesamiento ^{1,2}.

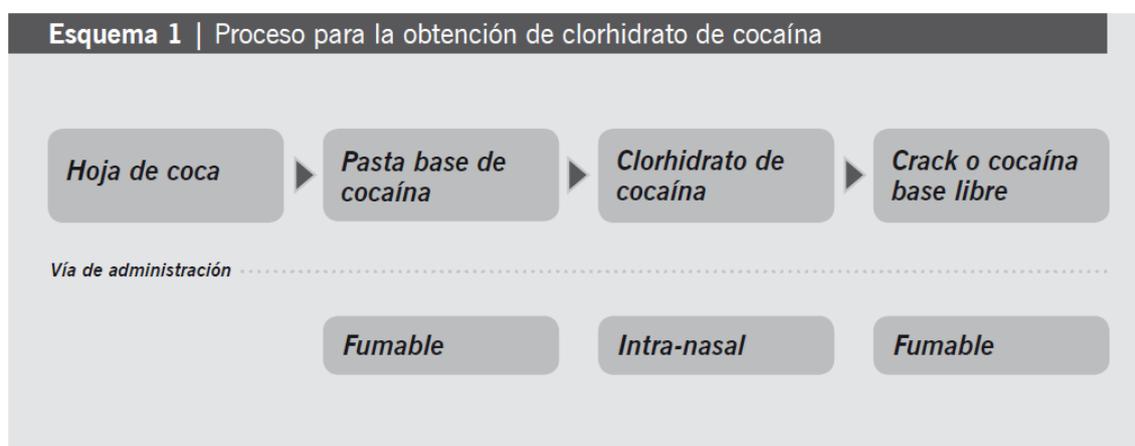


Figura 1. El esquema muestra que PBC constituye un paso previo al clorhidrato de cocaína, a diferencia del crack que es posterior a este. La vía de administración de la PBC es a través de la inhalación pulmonar, de ahí que se clasifica, al igual que el crack, como una cocaína fumable. El clorhidrato de cocaína se consume principalmente por vía intranasal. Tomado de Meikle y cols., 2009.

Con el consumo crónico de PBC se establece una rápida y fuerte dependencia con la droga, aparecen alteraciones en algunas funciones cognitivas (atención, memoria, razonamiento) y en el ciclo sueño-vigilia. Los consumidores pueden presentar un alto nivel de impulsividad/agresividad así como demuestran una rotura de los códigos sociales. Estas alteraciones establecen un perfil clínico diferencial al observado luego del consumo crónico de cocaína ^{1,3}. La incidencia de dos factores, vía de administración (inhalación pulmonar) y composición química ^{3,4}, podrían explicar el perfil clínico diferente entre ambas drogas de abuso. El fumar PBC implica que la droga se absorba y alcance rápidamente el cerebro ⁴, efecto que en general se asocia al rápido e intenso efecto adictivo de una droga de abuso. Adicionalmente, dependiendo de los componentes presentes en su composición química ^{5,6}, la PBC podría promover distintos niveles de estimulación del SNC e incidir en el poder adictivo de la droga. A pesar de la relación que poseen ambos factores sobre el comportamiento inducido por una droga de abuso, hasta el momento no se ha obtenido suficiente información que permita evaluar el grado de incidencia de cada una de ellas en la acción farmacológica producida por la PBC.

1.2 Antecedentes del grupo de investigación

Interesados en el estudio de la incidencia de las dos variables mencionadas en el efecto farmacológico de la PBC, en primer lugar se estudió el efecto estimulante inducido por diferentes muestras de PBC y se evaluó la participación de la composición química en el mismo ^{5,6}. Para llevar a cabo este estudio, se realizó un análisis del contenido químico de siete muestras de PBC incautadas en Montevideo. Cabe destacar que las mismas fueron proporcionadas por el Instituto Técnico Forense (ITF) a través de un mecanismo legal desarrollado por el IIBCE, el ITF y la Junta Nacional de Drogas.

Es sabido que la composición química de las muestras incautadas de PBC puede ser variable dependiendo de la incautación. De acuerdo a lo esperado, el análisis realizado determinó que cocaína (en su forma de base) fue el principal alcaloide presente en la PBC, cuyo contenido varió entre un 20 y 70 %. Otros componentes del metabolismo de la planta, tales como ecgonina, *trans* y *cis-cinamoyl* cocaína aparecieron en un porcentaje muy bajo (menos del 4 %) comparado con cocaína ⁶. Esta composición coincidió con la descrita para muestras incautadas de PBC provenientes de Perú y Colombia y analizadas en los respectivos países ⁷. Además, es conocido que las muestras de PBC se venden frecuentemente adulteradas. Las razones por las cuales las drogas ilícitas son adulteradas son variadas. En muchos casos las sustancias adicionales que contienen las drogas de abuso son agregadas con el único fin de aumentar el volumen de la droga, siendo estas sustancias definidas como adulterantes pasivos. Por otra parte, las sustancias agregadas pueden cumplir el objetivo de imitar o potenciar los efectos de la droga de base, por lo que se definen como adulterantes activos ⁸.

Anfetamina, lidocaína y cafeína son los adulterantes activos más comúnmente encontrados en drogas ilegales de abuso ^{5,6,9}. Sin embargo, en las muestras de PBC estudiadas, cafeína fue la única sustancia encontrada como adulterante ⁶. Cabe destacar que la cafeína tiene la capacidad de ser volatilizada y alcanzar así rápidamente el SNC cuando es fumada, contribuyendo a los efectos sobre el SNC producido por la PBC ^{6,10}.

En relación a los experimentos comportamentales, los resultados indicaron que, luego de la administración sistémica intraperitoneal (i.p.), dos de las muestras de PBC estudiadas indujeron un efecto estimulante diferencial con respecto a la administración de cocaína en concentraciones equimolares. A través de estos experimentos, se pudo determinar que cocaína era uno de los principales componentes responsables de la aparición del efecto estimulante inducido por las diferentes muestras de PBC. Sin embargo, a determinadas dosis, la presencia de cafeína en las muestras de PBC era la responsable de potenciar el efecto estimulante inducido por PBC en relación al grupo inyectado con cocaína. Es decir que, dependiendo de la presencia y la cantidad de cafeína, PBC puede generar un efecto estimulante más potente.

Por otra parte, el efecto estimulante inducido por las PBC se relacionó con un aumento en la transmisión dopaminérgica en el Núcleo Accumbens (NAcc) ⁵, efecto que comparten todas las drogas de abuso y que refleja un aumento en la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico ¹¹⁻¹³.

A partir de esta primera serie de resultados fueron extraídas las siguientes conclusiones: 1) dependiendo de la composición química de las muestras de PBC se pueden obtener distintos niveles de estimulación del SNC; y 2) la adulteración con cafeína puede generar una potenciación del efecto estimulante de la PBC. En relación a estas conclusiones surgió la pregunta: ¿en qué medida estos resultados son extrapolables a la clínica teniendo en cuenta que la vía de administración ensayada es diferente a la utilizada por las personas consumidoras de PBC?.

1.3 Vías de administración y su implicancia en adicción.

Se ha sugerido que la vía de administración es un factor relevante que influye en la biodisponibilidad de la droga, sus efectos reforzadores y el potencial riesgo de su abuso ¹⁴. De hecho, está ampliamente aceptado que cuanto más rápido la droga alcanza el cerebro, mayor es su poder adictivo ⁴.

La Figura 2 muestra las concentraciones plasmáticas de cocaína que se obtienen luego de la administración a voluntarios sanos de dosis equipotentes de cocaína a través de cuatro diferentes vías de administración: oral, esnifada, fumada e intravenosa. Luego de esnifar cocaína, su absorción por la mucosa nasal o por el tracto digestivo es similar a la observada luego de su administración oral, aunque más lenta que al fumarla o incluso que al ser administrada por vía intravenosa. El pico plasmático de cocaína se produce normalmente a los 60 minutos después de su administración nasal u oral, mientras que la administración de cocaína fumada o inyectada por vía intravenosa produce un pico a los 30 minutos ¹⁵.

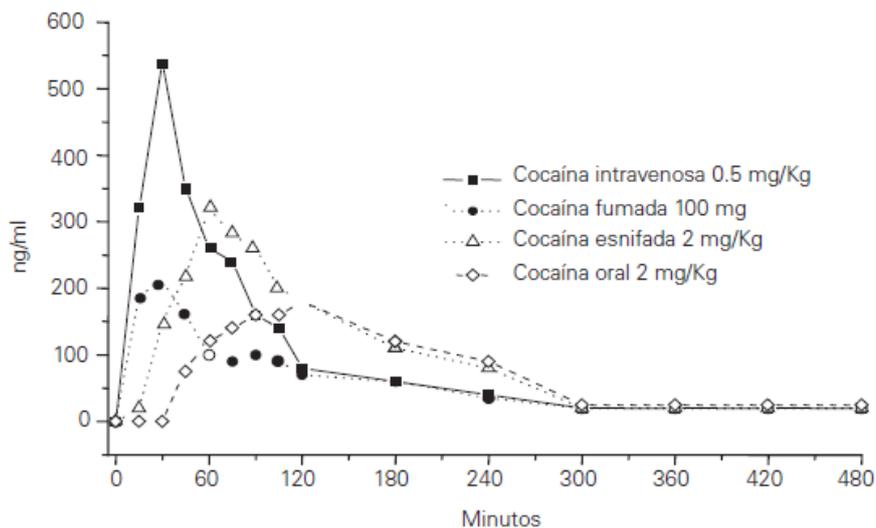


Figura 2. Niveles plasmáticos de cocaína en humanos, luego de su administración por diferentes vías a dosis equipotentes. Tomado de Lizasoain y cols., 2002.

Para el caso de PBC aún no hay evidencias reportadas que muestren la biodisponibilidad de la droga o sus componentes en plasma o en cerebro. Sin embargo, dado que PBC es definida como una forma fumable de cocaína, los datos de cocaína fumada de la Figura 2 podrían extrapolarse a lo correspondiente para PBC. Una característica importante que debe ser señalada es que la cocaína presente en la PBC está en su forma de base, proporcionándole un punto de sublimación bajo, hecho que facilita su volatilización a bajas temperaturas. Por su parte, la cocaína en su forma de clorhidrato, posee un punto de volatilización muy alto, lo que impide su sublimación sin que sea destruida por el calor ^{3,5}. Esta propiedad hace que la vía de administración sea considerada uno de los factores fundamentales que explique el poder adictivo de la PBC.

De hecho, existen datos que demuestran que las vías de administración fumada e intravenosa tienen un mayor riesgo de abuso que la vía intranasal ¹⁴. La razón por la cual la velocidad con la que las drogas alcanzan el cerebro puede determinar el poder

adictivo de las mismas aún no está del todo clara. La primera explicación a este fenómeno sugiere que las drogas administradas rápidamente promueven la transición a la adicción gracias a que generan un mayor efecto subjetivo de euforia o placer¹⁶. Sin embargo, no habría necesariamente una relación causal entre la capacidad que poseen las drogas de producir placer y su propiedad adictiva¹³. A medida que se desarrolla la adicción, las drogas adquieren mayores niveles de incentivo, mientras que las sensaciones de placer que experimentan los adictos generalmente no aumentan. Parecería, por tanto, que aunque el placer producido por las drogas podría tener un papel importante en la modulación en el consumo de la misma, otros factores distintos a la propiedad de producir euforia por la rápida administración de las drogas podría contribuir a su capacidad para promover la adicción⁴.

La segunda explicación sugiere que las drogas que alcanzan el cerebro más rápidamente son más adictivas debido a que poseen un mayor poder reforzador^{4,17}. Para niveles equivalentes de cocaína que alcanzan el cerebro (evaluado como niveles equivalentes de transportadores de dopamina bloqueados), se ha demostrado que cuando ésta ingresa rápidamente en el sistema (fumado o intravenosa) produce efectos subjetivos más fuertes en comparación a cuando ingresa al sistema por una vía lenta (esnifada)¹⁴.

Por otra parte, estudios realizados por Samaha y Robinson⁴ demostraron que las diferencias en la velocidad a la que se administra una droga determinan su capacidad de producir el fenómeno de sensibilización comportamental. Este fenómeno producido por las drogas psicoestimulantes se da como consecuencia de la administración repetida de las drogas, lo que provoca un aumento en el efecto comportamental cuando el animal es re-expuesto a la droga luego de un período de abstinencia. La sensibilización comportamental involucra cambios plásticos y duraderos en las áreas que integran el circuito motivacional, como son la corteza prefrontal (CPF), el NAcc y el área tegmental ventral (ATV)¹⁸. Los resultados obtenidos por estos autores indicaron que los procesos neuroadaptativos iniciados por drogas adictivas eran sensibles a la velocidad a la cual eran administradas. Debido a esto, los autores postulan que la razón por la cual es importante la velocidad de absorción de las drogas en el desarrollo de la adicción estaría relacionada con la capacidad de inducir formas de plasticidad neuro-conductual que contribuyen al uso compulsivo y excesivo de las drogas⁴.

1.4 Bases neurales en la acción de drogas de abuso

Las bases neurobiológicas del efecto reforzador de las drogas de abuso incluyen a las regiones y sistemas que integran el circuito motivacional o de recompensa^{19,20}. Se sabe que el consumo agudo de psicoestimulantes induce la activación de diversos

centros nerviosos, entre los que destaca el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Figura 3). Este sistema participa en la mediación del efecto motivacional y reforzador de estímulos placenteros tales como la búsqueda de alimento o pareja sexual, siendo debido a esto, clave en el efecto reforzador de las drogas de abuso ^{19,21}. A pesar de que las drogas adictivas presentan una gran diversidad molecular y actúan sobre diversos receptores y estructuras, existe un factor común entre ellas, que es que luego de su administración aguda, aumentan la transmisión dopaminérgica en el NAcc, el cual juega un papel importante en los efectos reforzadores de las conductas adictivas ^{12,13,19,21}.

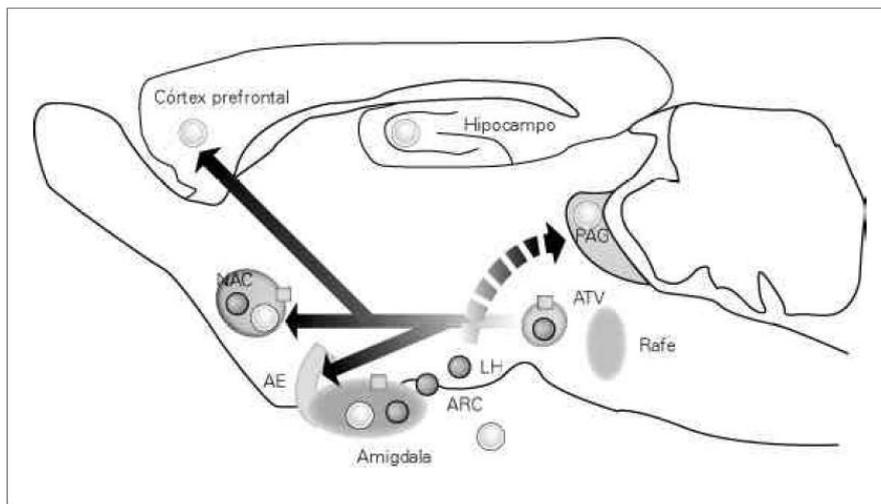


Figura 3. Esquema del sistema motivacional o de recompensa en un corte sagital de cerebro de rata. El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (línea continua gruesa) se origina en el ATV y proyecta al núcleo accumbens (NAC), la amígdala extendida (AE) y a la corteza prefrontal. Tomado de Fernández-Espejo, 2002.

El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico se origina en el ATV y su activación durante el consumo agudo de psicoestimulantes induce un incremento en la liberación de dopamina (DA) en el NAcc, la amígdala y la CPF ^{20,21}.

El ATV contiene entre un 60 y 65 % de neuronas dopaminérgicas y es una de las principales regiones involucrada en la propiedad reforzadora de las drogas de abuso. Sus proyecciones liberan DA en las diferentes regiones del circuito mesocorticolímbico en respuesta a eventos motivacionales relevantes ^{13,19}. La liberación de DA en el circuito promueve el inicio de respuestas conductuales adaptativas hacia los eventos motivacionales, y, al hacerlo, facilita los cambios celulares que establecen asociaciones aprendidas con el evento ²². De esta manera, el organismo puede emitir más eficazmente una respuesta adaptativa del comportamiento cuando el evento se repite. Por su parte, la CPF regula la relevancia motivacional general y determina la intensidad de la respuesta conductual ¹⁹.

1.5 Mecanismo de acción de cocaína

La cocaína bloquea el transportador de monoaminas en las terminales sinápticas, lo que inhibe la recaptación de DA (Figura 4). Esto resulta en un aumento de la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica, aumentando la actividad dopaminérgica, particularmente en el ATV y en el NAcc, es decir, en las principales áreas del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.^{11,12,15,23}

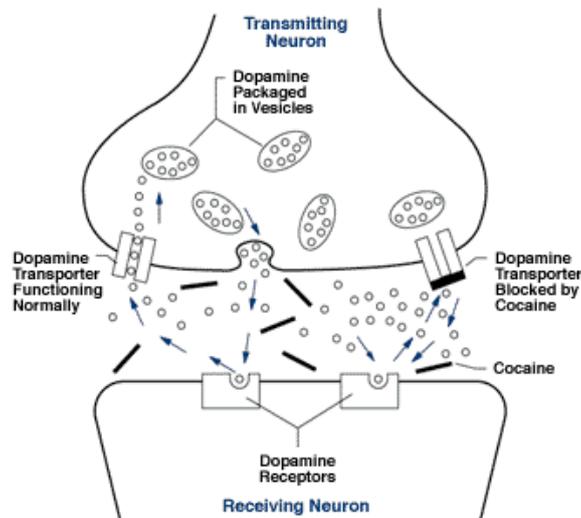


Figura 4. Mecanismos de acción de la cocaína. La cocaína inhibe la recaptación de dopamina uniéndose al transportador de dopamina (DAT) e inhibiendo su actividad, aumentando así la disponibilidad de ésta en la hendidura sináptica y promoviendo su transmisión vía receptores DAérgicos.

1.6 Mecanismo de acción de cafeína

La cafeína es un antagonista no selectivo de los receptores de adenosina, cuyo efecto estimulante es producido al contrarrestar el efecto tónico de la adenosina endógena sobre los receptores centrales de adenosina. En particular, la cafeína bloquea los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} ²⁴. Estos receptores tienen efectos bioquímicos opuestos: la activación de los receptores A_1 reducen los niveles de AMP cíclico, mientras que la de los receptores A_{2A} los aumentan^{25,26}.

La mayoría de los receptores de adenosina A_1 se encuentran localizados en las terminales presinápticas de numerosas regiones del cerebro, donde al ser estimulados por adenosina inhiben la liberación de varios neurotransmisores, dentro de los que se encuentran la DA, el glutamato y la acetilcolina^{27,28}. Se cree que la inhibición

producida sobre los receptores A_1 es la responsable de los efectos positivos producidos por la cafeína sobre la excitación, la vigilancia y la atención ²⁹.

En contraste con la amplia distribución de los receptores A_1 , la expresión de los receptores A_{2A} en el cerebro está limitada a regiones muy inervadas por fibras dopaminérgicas, como es el caso del cuerpo estriado ^{26,30}. En el estriado, los receptores A_{2A} están altamente expresados post-sinápticamente en una gran población de neuronas espinosas medianas. Hay evidencias que indican que la cafeína produce su efecto estimulante en la actividad motora al actuar sobre estas neuronas del estriado. En particular, la mayoría de los efectos bioquímicos y comportamentales de la cafeína se han relacionado con la capacidad de este fármaco para reducir la inhibición ejercida por la adenosina endógena en la transmisión de DA estriatal ²⁶. Una gran cantidad de evidencias indican la existencia de una relación antagónica compleja entre los receptores A_{2A} de adenosina y los receptores de DA D2, en las neuronas de proyección estriatal. Estudios realizados en preparaciones de membranas del cuerpo estriado muestran que la activación de receptores de adenosina A_{2A} reduce la afinidad de los receptores de DA D2 por sus agonistas ³¹. Esto nos sugiere que la cafeína estimula la actividad motora contrarrestando el control inhibitorio que ejercen los receptores de adenosina A_{2A} sobre los receptores de DA D2 estriatales ^{26,32}.

Como ya se ha mencionado, además de cocaína (base), cafeína está presente en muestras de PBC como principal adulterante, siendo la combinación de cocaína y cafeína la responsable del mayor efecto estimulante encontrado en algunas muestras de PBC. La propiedad de ser volatilizadas, permite que tanto cocaína como cafeína, accedan rápidamente al cerebro y contribuyan así a los efectos centrales de la PBC. Sin embargo, hasta el momento, no se han reportado experimentos pre-clínicos mostrando el efecto estimulante inducido por muestras incautadas de PBC reproduciendo la vía de administración que se utiliza en humanos. Tampoco se ha comprobado la participación de cafeína volatilizada en el efecto estimulante de PBC.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

En base a los antecedentes mencionados y conociendo la relevancia de la vía de administración en el efecto farmacológico de una droga de abuso, postulamos como hipótesis que PBC suministrada por la vía inhalatoria pulmonar induce un efecto estimulante que se potencia por la presencia de cafeína como adulterante. A su vez, el efecto estimulante se asocia a un aumento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc.

3. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo de esta pasantía se centró en: 1) caracterizar el efecto estimulante en animales sometidos a la inhalación de diferentes muestras incautadas de PBC; 2) evaluar la contribución de la cafeína en dicho efecto; 3) caracterizar el efecto estimulante producido por diferentes cantidades de cafeína volatilizada; 4) estudiar los cambios neuroquímicos inducidos por los diferentes tratamientos sobre el sistema dopaminérgico del NAcc.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

4.1. Caracterización del efecto estimulante inducido por cafeína volatilizada y su relación con el sistema DAérgico.

4.1.1. Determinar el efecto estimulante inducido por la volatilización de diferentes cantidades de cafeína.

4.1.2. Evaluar los cambios en los niveles tisulares de DA de los animales tratados así como también la actividad DAérgica (o recambio DAérgico) en el NAcc.

4.2. Caracterización del efecto estimulante de muestras de PBC con diferente contenido en cocaína y cafeína y su relación con el sistema DAérgico.

4.2.1. Determinar el efecto estimulante inducido por la volatilización de muestras de PBC incautadas con alto contenido en cocaína, sin adulterante.

4.2.2. Determinar el efecto estimulante inducido por la volatilización de muestras de PBC incautadas con alto contenido en cocaína y adulteradas con cafeína.

4.2.3. Evaluar los cambios en los niveles tisulares de DA de los animales tratados así como también la actividad DAérgica (o recambio DAérgico) en el NAcc.

4.3. Evaluación de la contribución de la cafeína en el efecto estimulante producido por PBC y su relación con el sistema DAérgico.

4.3.1. Determinar el efecto estimulante inducido por la volatilización de muestras de PBC (sin adulterante) con el agregado de una cantidad conocida de cafeína (PBC + cafeína).

4.3.2. Evaluar los cambios en los niveles tisulares de DA de los animales tratados así como también la actividad DAérgica (o recambio DAérgico) en el NAcc.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Animales

Se utilizaron 50 ratas macho cepa-Wistar de 250-330 gr. del Bioterio de IIBCE los cuales fueron mantenidos en grupos de a 6 en cajas de plástico transparentes (50 x 37.5 x 21 cm) a 22 ± 2 °C con un ciclo de luz/oscuridad constante (07:00-19:00 h) y con acceso libre a comida y agua. Todos los experimentos que se llevaron a cabo se encuentran bajo las normativas de protocolos aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del IIBCE y bajo la regulación de la Ley de experimentación animal N° 18.611. Los experimentos fueron realizados en el cuarto de experimentación del Laboratorio de Biología Celular con condiciones de luz y temperatura similares a las del Bioterio.

5.2. Drogas y dosis

Se utilizaron dos muestras de PBC de diferentes incautaciones proporcionadas por el ITF con la autorización de la Comisión de Lucha contra las Toxicomanías y el aval de la Junta Nacional de Drogas y del Ministerio de Salud Pública. Cafeína fue obtenida de Sigma-Aldrich.

Tanto las muestras de PBC como la cafeína fueron volatilizadas utilizando un dispositivo casero similar a aquellos utilizados por los consumidores de PBC (Figura 5). Las dosis de las diferentes PBC fueron calculadas en base a su contenido en cocaína base, siendo éstas equiparadas a 50 mg de cocaína (Tabla 1). Esta estrategia nos permitió estudiar el efecto farmacológico inducido por las dos muestras de PBC volatilizadas, determinando también la relevancia de la cafeína en dicho efecto. La cafeína fue administrada a tres diferentes dosis (25, 50 y 75 mg), para obtener una curva dosis-respuesta.

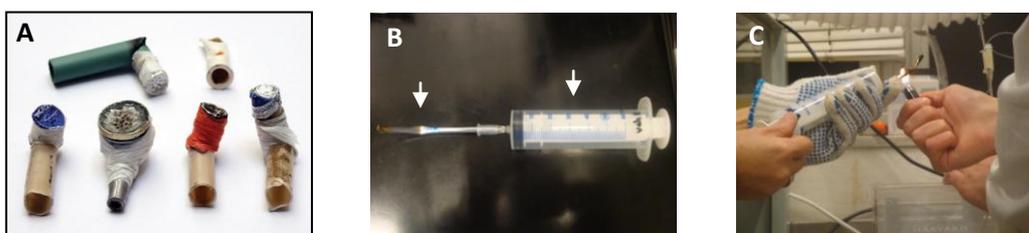


Figura 5. Dispositivos caseros utilizados por los consumidores de PBC **(A)**. Dispositivo utilizado durante el protocolo para llevar a cabo la volatilización de la PBC y la cafeína. Las flechas señalan el tubo de metal y jeringa respectivamente **(B)**. Mecanismo mediante el cual se llevó a cabo la volatilización de las diferentes muestras **(C)**.

Muestra	Cocaína Base (%)	Cafeína (%)	Mg PBC
PBC 1	68.2	1	73.3
PBC 2	66.5	14	75.2

Tabla 1. En base al contenido de cocaína de las muestras de PBC, se calculó la cantidad de PBC administrada en los tratamientos equiparando la cantidad de cocaína a 50 mg. Se muestra el contenido de cafeína de cada una de las muestras de PBC. Datos tomados de López y cols. 2011.

5.3. Cámara inhalatoria

Para la realización de los experimentos conductuales se diseñó una cámara inhalatoria de material acrílico, rectangular de 23 x 15 x 10 cm con una capacidad de 3.331 cm³ para la exposición de los animales a la volatilización de las drogas. El diseño de dicha cámara se basó en diferentes trabajos ya publicados adaptados a nuestras condiciones^{33,34}. La cámara posee un orificio de entrada, el cual permite la colocación de una jeringa de 60 ml. mediante la cual se inyectó el humo generado por la droga volatilizada.

5.4. Procedimiento de volatilización e inhalación.

La volatilización de la droga se realizó mediante el uso de un tubo de metal; en uno de sus extremos se colocó la droga a ser quemada, mientras que en el otro se colocó la jeringa para realizar el vacío necesario para extraer el humo de la volatilización (Figura 5-B). El humo generado fue inmediatamente inyectado en la cámara inhalatoria, con la previa introducción del animal.

Todo el procedimiento se realizó bajo una campana de extracción de aire. Para estandarizar la exposición de los animales a las diferentes drogas, se utilizó el mismo volumen de inyección, el mismo tiempo de exposición dentro de la caja y se volatilizaron cantidades equivalentes de cocaína base (para cada PBC estudiada). Los animales permanecieron expuestos al humo un máximo de 10 min en la caja. Se realizó una curva dosis repuesta para cafeína volatilizada utilizando las mismas condiciones descritas para la volatilización de PBC. El grupo control se dejó por 10 min libre de humo en el interior de la caja. Inmediatamente después, se colocó el animal en la caja de comportamiento para evaluar el efecto estimulante inducido por los tratamientos mediante el registro de su actividad locomotora (Figura 6).

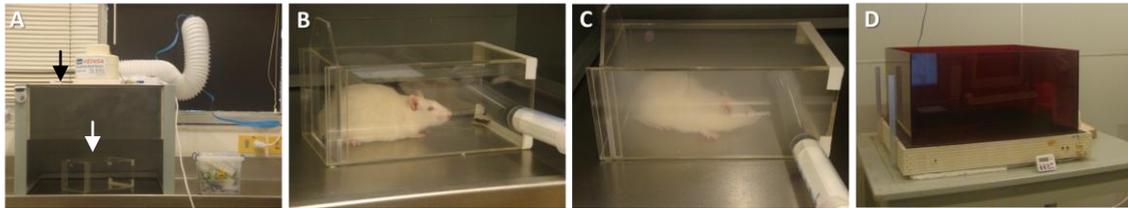


Figura 6. Los experimentos fueron realizados bajo campana, indicada por flecha negra **(A)**. Los animales fueron colocados dentro de una cámara inhalatoria, indicada por flecha blanca **(A, B)**, donde fueron expuestos en forma aguda a dos muestras de PBC y a diversas dosis de cafeína volatilizadas. Luego de la exposición al humo de la droga **(C)**, los animales fueron colocados inmediatamente en el modelo “open field” **(D)** asociado al software Ethovision XT7 (Noldus), mediante el cual se cuantificó automáticamente la actividad locomotora del animal.

5.5. Modelo Comportamental

El estudio del efecto estimulante se realizó mediante la evaluación de la actividad locomotora horizontal y la actividad exploratoria vertical (número de “rearings”) de los animales inmediatamente después de la volatilización de las distintas drogas a estudiar. Se utilizó el modelo de campo abierto u “open field” (OF) (Figura 6-D), el cual consiste en una caja cuadrada (60 x 60 cm) con paredes de acrílico rojas de 40 cm de alto. Los experimentos fueron filmados mediante una cámara asociada a un software Ethovision XT 7 de video-seguimiento el cual permite cuantificar parámetros tales como la distancia recorrida (m), velocidad del movimiento (m/s), tiempo de permanencia en distintas zonas del OF (centro, periferia, esquinas) así como el patrón locomotor de los animales. Para simplificar la presentación de los resultados, se priorizaron los parámetros de distancia recorrida y el número de “rearings” para mostrar los cambios en el efecto comportamental inducido por las drogas a estudiar.

5.6. Sacrificio de los animales para el análisis de los niveles tisulares de dopamina y metabolitos

Una vez finalizados los experimentos comportamentales, los animales fueron sacrificados por decapitación para la extracción de los cerebros y la disección de los NAcc. Se evaluaron los cambios neuroquímicos inducidos por los diversos tratamientos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc. Los niveles tisulares de DA y su principal metabolito, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), fueron cuantificados mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-DE; Figura 7). Para ello, las muestras de tejido fueron pesadas y posteriormente sonicadas en un volumen de ácido perclórico 0.1 M de acuerdo al peso de la muestra (600 µl aproximadamente). El homogenato fue centrifugado a 15.000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue inyectado en el HPLC-DE.

A través de la cuantificación del DOPAC se calculó el recambio DAérgico (DOPAC/DA) como una medida de la actividad DAérgica en el NAcc. La evaluación de dichos cambios permitió confirmar la influencia de los tratamientos volatilizados a nivel neuroquímico.



Figura 7. Equipo de HPLC-DE utilizado para la cuantificación de los niveles tisulares de DA y DOPAC

5.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante métodos paramétricos ANOVA seguido de test de comparación múltiple de Newman Keuls o mediante el test t de Student, según el caso. El nivel de significación será de $p < 0.05$.

6.1. Caracterización del efecto estimulante inducido por cafeína volatilizada y su relación con el sistema DAérgico.

Efecto estimulante inducido por la volatilización de diferentes cantidades de cafeína.

Se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes cantidades de cafeína volatilizada para caracterizar su efecto sobre la actividad locomotora en 30 min. En la Figura 8 se observa que la cafeína indujo un efecto estimulante dosis-dependiente con una distribución en forma de U invertida, siendo cafeína 50 mg la dosis que produjo el mayor efecto estimulante. Cafeína 50 y 75 mg indujeron un aumento significativo en la actividad locomotora tanto en relación con los controles ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente) como con los tratados con cafeína 25 mg ($p < 0.01$ y $p < 0.05$). Por otro lado, cafeína 25 mg produjo un aumento no significativo en la distancia recorrida con respecto a los controles.

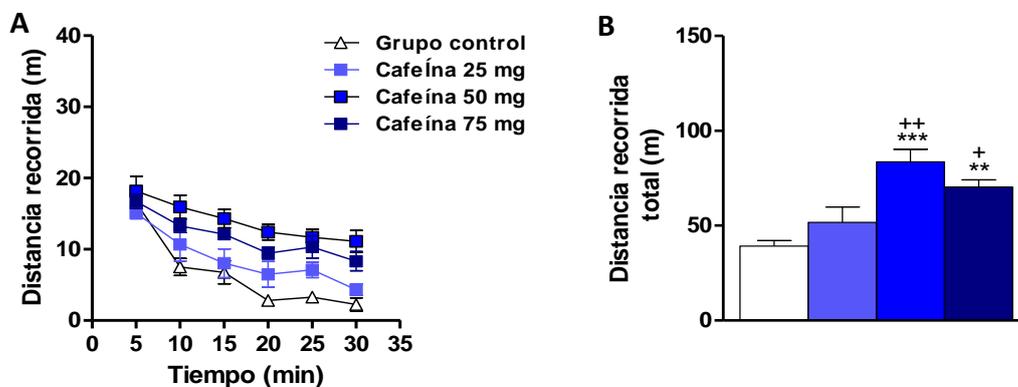


Figura 8. Efecto dosis respuesta sobre la actividad locomotora inducido por cafeína en función del tiempo (A) y la comparación entre las dosis en los 30 min de registro (B). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = vs grupo control; + = vs cafeína 25 mg. *** = $p < 0.001$; **, += $p < 0.01$; + = $p < 0.05$. N=5-7.

Simultáneamente al registro de la actividad locomotora, se cuantificó, durante los primeros 15 minutos en el OF, el número de “rearings” realizados (exploración vertical). Dicho parámetro, al igual que la distancia recorrida (exploración horizontal), permite aportar información complementaria sobre el efecto estimulante producido por las drogas.

Como se aprecia en la Figura 9, los animales tratados con cafeína 50 y 75 mg realizaron un número significativamente mayor de “rearings” con respecto al grupo control ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente).

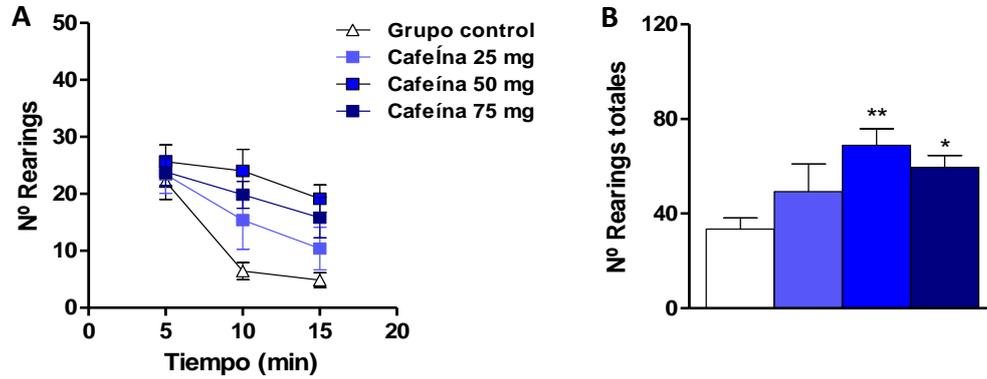


Figura 9. Efecto dosis respuesta sobre el número de “rearings” inducido por cafeína en función del tiempo (A). Comparación entre dosis en los 15 min de registro. (B). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= vs grupo control. **= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$. N=5-7.

Niveles tisulares de DA y sus metabolitos en el NAcc de los animales tratados.

Cafeína 50 mg fue la única dosis que indujo un aumento significativo en los niveles tisulares de DA en el NAcc en comparación con el grupo control. Si bien el efecto fue mayor que con la dosis de 25 mg, resultó significativamente mayor a la dosis de cafeína 75 mg ($p < 0.05$; Figura 10A). Por su parte, dicho aumento se correspondió con un valor de recambio dopaminérgico (DOPAC/DA) significativamente menor con respecto al valor control ($p < 0.05$; Figura 10B). Tanto la dosis de 25 mg como la de 75 mg de cafeína tendieron a disminuir dicho parámetro con respecto al control.

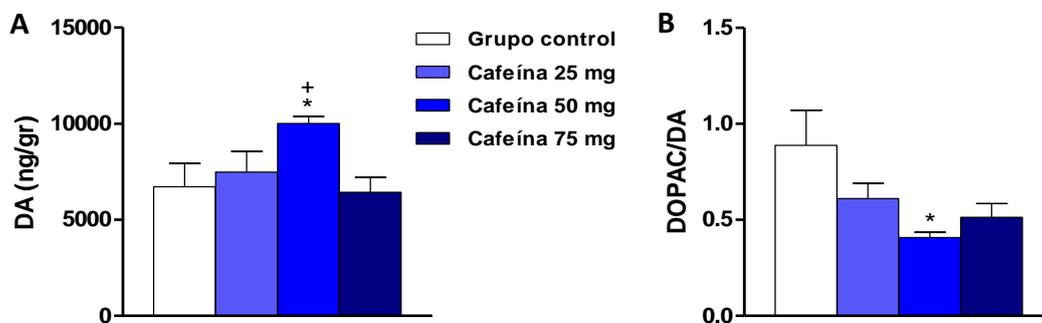


Figura 10. Niveles tisulares (ng/gr tejido) de DA (A) y el recambio (DOPAC/DA; B) en el NAcc de animales expuestos a cafeína (25, 50 y 75 mg) volatilizada y evaluados 30 min después de la exposición a la droga. Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= vs grupo control; += vs cafeína 75 mg. *, += $p < 0.05$. N=5-6.

6.2. Caracterización del efecto estimulante de muestras de PBC con diferente contenido en cocaína y cafeína y su relación con el sistema DAérgico.

Efecto estimulante inducido por la volatilización de una muestra de PBC incautada con alto contenido en cocaína, sin adulterante.

Como se observa en la Figura 11, no hubo diferencias significativas entre la distancia recorrida por el grupo tratado con PBC 1 y el grupo control. Sin embargo, cuando se analizó la actividad locomotora total, se observó que la muestra de PBC tendió a aumentar dicho parámetro, aunque no resultó en un efecto estadísticamente significativo ($p=0.0506$).

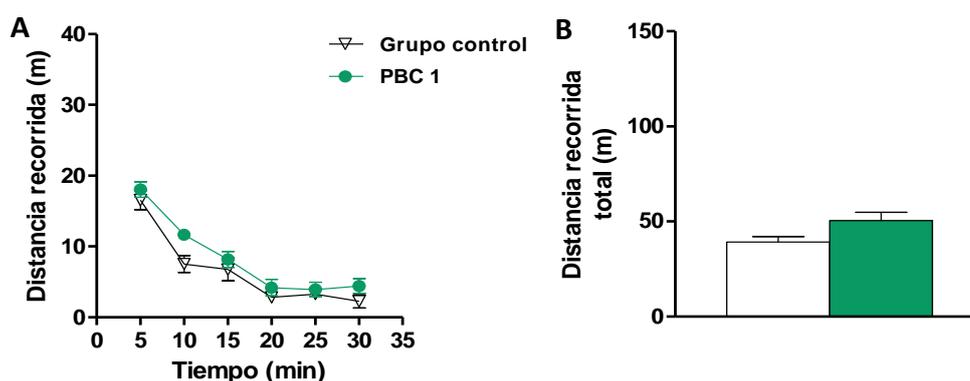


Figura 11. Actividad locomotora de animales tratados con PBC 1 volatilizada expresada en intervalos de 5 min (A) y en los 30 min totales de registro (B). Media \pm EEM. Student *t*-Test. N=6-7.

La figura 12 muestra el número de “rearings” realizado por los animales tratados durante los primeros 15 minutos en el OF. Al igual que en la distancia recorrida, el número de “rearings” realizado por los animales tratados con PBC 1 tendió a aumentar en comparación con el grupo control, sin alcanzar la significancia estadística.

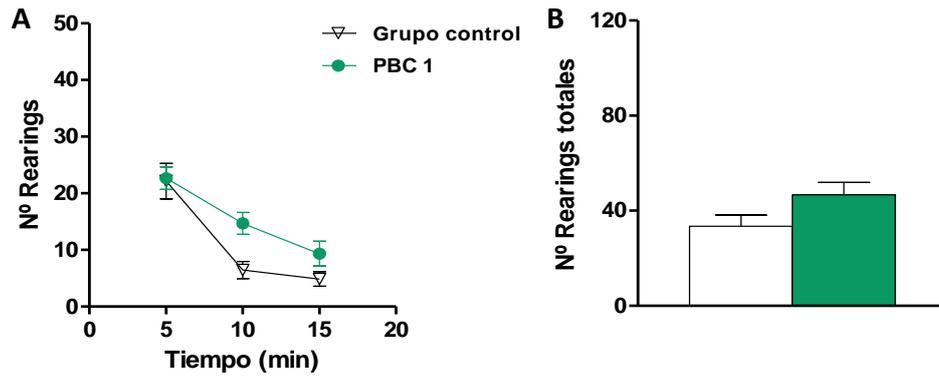


Figura 12. Número de “rearing” realizados por animales tratados con PBC 1 volatilizada expresado en intervalos de 5 min (A) y en los 15 min totales de registro (B). Media \pm EEM. Student t-Test. N=6-7.

Niveles tisulares de DA y sus metabolitos en el NAcc de los animales tratados con PBC1.

Los animales expuestos a PBC 1 mostraron valores similares a los controles tanto en los niveles de DA como de recambio dopaminérgico (Figura 13).

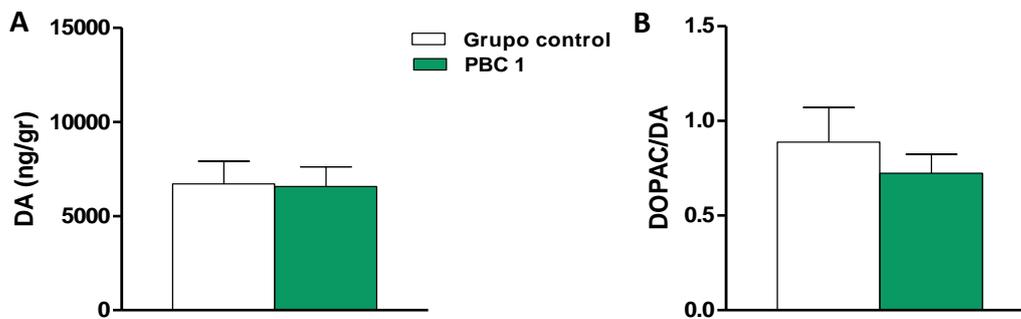


Figura 13. Niveles tisulares (ng/gr tejido) de DA (A) y el recambio (DOPAC/DA; B) en el NAcc de animales expuestos a PBC 1 volatilizada y evaluados 30 min después de la exposición a la droga. Media \pm EEM. Student t-Test. N= 6.

Efecto estimulante inducido por la volatilización de una muestra de PBC incautada con alto contenido en cocaína y adulterada con cafeína.

Las Figuras 14 y 15 muestran los resultados de la actividad locomotora de los animales expuestos a PBC 2 volatilizada. El análisis estadístico reveló que la administración de PBC 2 volatilizada aumentó significativamente tanto la actividad locomotora de los animales ($p < 0.001$, Figura 14) como el número de “rearing” realizados ($p < 0.001$, Figura 15) comparado con el grupo control.

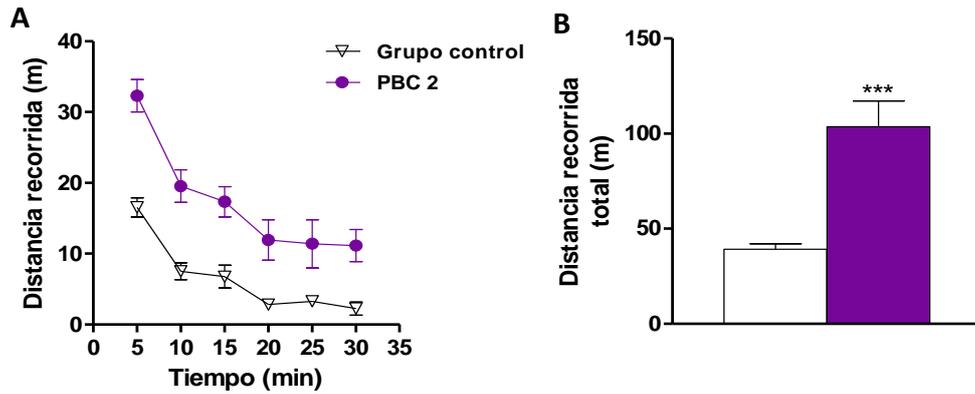


Figura 14. Actividad locomotora de animales tratados con PBC 2 volatilizada expresada en intervalos de 5 min (A) y en los 30 min totales de registro (B). Media \pm EEM. Student *t*-Test. * = vs grupo control. *** = $p < 0.001$. N=6-7.

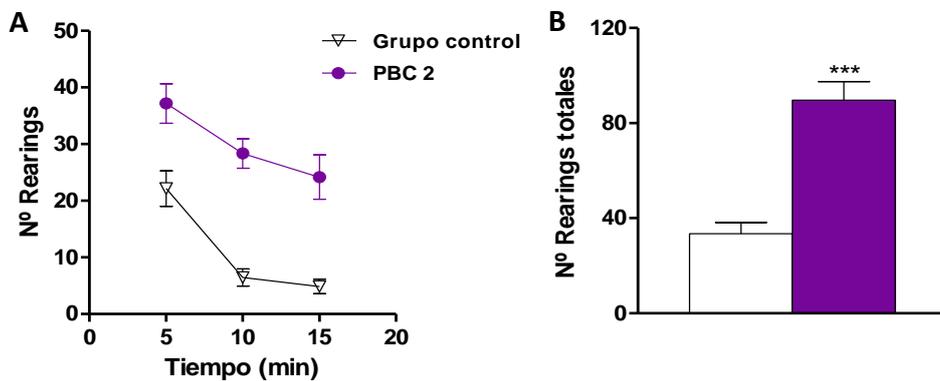


Figura 15. Número de “rearings” realizados por animales tratados con PBC 2 volatilizada expresado en intervalos de 5 min (A) y en los 15 min totales de registro (B). Media \pm EEM. Student *t*-Test. * = vs grupo control. *** = $p < 0.001$. N=6-7.

Niveles tisulares de DA y sus metabolitos en el NAcc de los animales tratados con PBC2.

Se observó una tendencia al aumento en los niveles de DA y una disminución en el valor de recambio dopaminérgico en los NAcc obtenidos de animales tratados con PBC 2 con respecto al grupo control (Figura 16).

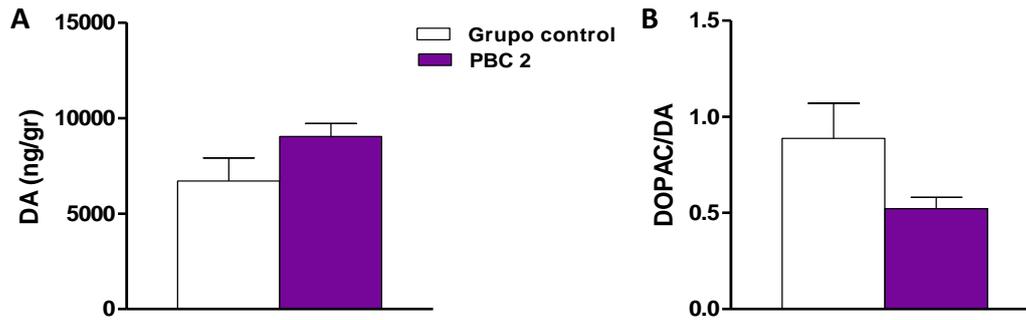


Figura 16. Niveles tisulares (ng/gr tejido) de DA (A) y el recambio (DOPAC/DA; B) en el NAcc de animales expuestos a PBC 2 volatilizada y evaluados 30 min después de la exposición a la droga. Media \pm EEM. Student t-Test. N= 6.

6.3. Evaluación de la contribución de la cafeína en el efecto estimulante producido por PBC y su relación con el sistema DAérgico.

Efecto estimulante inducido por la volatilización de PBC 1 con el agregado de cantidades conocidas de cafeína (PBC 1 + cafeína 25 mg).

En la Figura 17 se muestra la actividad locomotora de animales tratados con PBC 1 y PBC 1 + cafeína 25 mg. Aquellos animales tratados con PBC 1 + cafeína 25 mg mostraron una actividad locomotora significativamente superior a los controles ($p < 0.01$) y a aquellos tratados únicamente con PBC 1 ($p < 0.05$), evidenciando una potenciación por parte de la cafeína del efecto estimulante inducido por PBC 1.

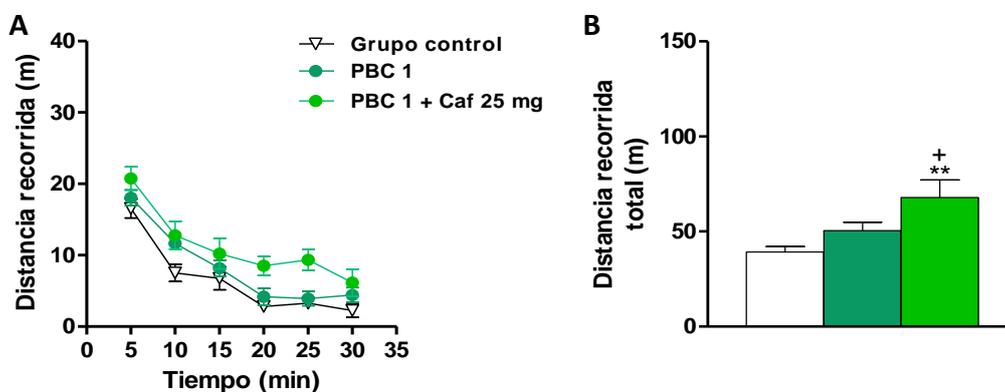


Figura 17. Efecto dosis respuesta sobre la actividad locomotora inducido por PBC 1 y la combinación de PBC 1 con 25 mg de cafeína en función del tiempo (A). Comparación entre tratamientos en los 30 min de registro. (B). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = vs grupo control; + = vs PBC 1. ** = $p < 0.01$; += $p < 0.05$. N=5-7.

En la Figura 18 se puede observar que los animales tratados con PBC 1 + cafeína 25 mg realizaron un número de “rearings” significativamente mayor al realizado por los animales controles ($p < 0.05$). A diferencia de lo observado en el análisis de la distancia recorrida, no se observaron diferencias significativas entre los animales tratados con PBC 1 y aquellos tratados con PBC 1 + cafeína 25 mg.

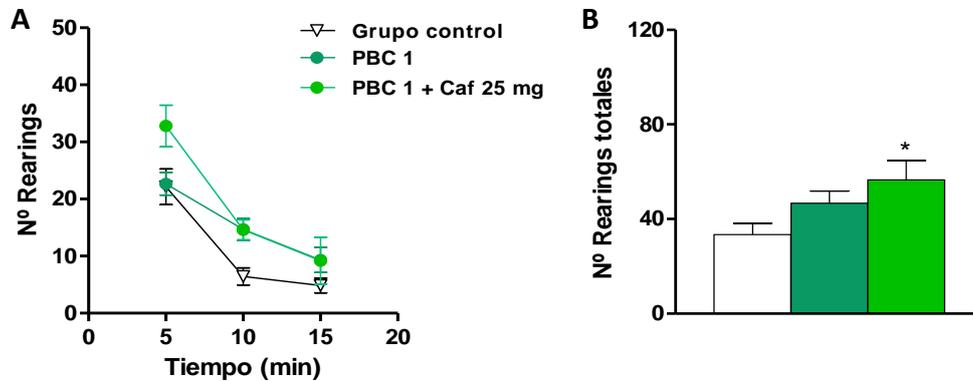


Figura 18. Efecto dosis respuesta sobre el número de “rearings” inducido por PBC 1 y la combinación de PBC 1 con 25 mg de cafeína en función del tiempo (A). Comparación entre tratamientos en los 15 min de registro. (B). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= vs grupo control. * = $p < 0.05$. N=5-7.

Niveles tisulares de DA y sus metabolitos en el NAcc de los animales tratados.

Como se observa en la Figura 19, no hubo diferencias significativas entre los niveles tisulares de DA de los animales controles y aquellos tratados con PBC 1 y la combinación de PBC 1 y cafeína 25 mg. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas en el valor de recambio dopaminérgico (DOPAC/DA) entre los diferentes tratamientos.

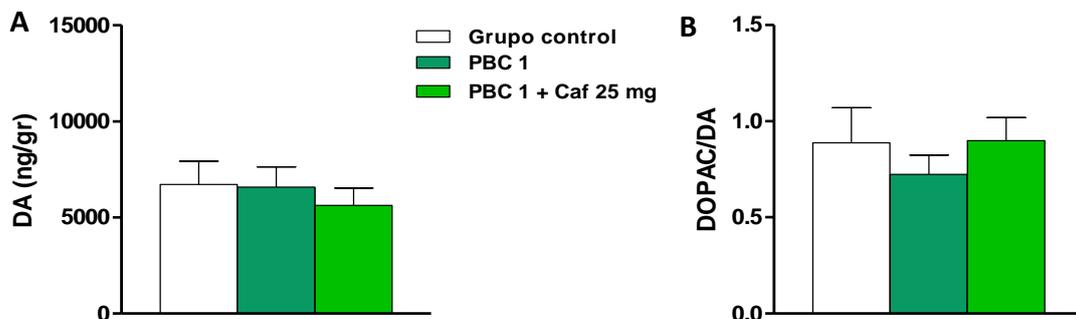


Figura 19. Niveles tisulares (ng/gr tejido) de DA (A) y el recambio (DOPAC/DA; B) en el NAcc de animales expuestos a PBC 1 y PBC 1 + cafeína 25 mg y evaluados 30 min después de la exposición a la droga. Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. N= 6.

Efecto estimulante inducido por la volatilización de PBC 1 con el agregado de la proporción de cafeína encontrada en la PBC 2 (PBC 1 + cafeína 10.5 mg).

En base a los resultados obtenidos en el ítem anterior, pudimos observar que a pesar de que cafeína fue capaz de potenciar el efecto estimulante producido por PBC 1 (actividad de PBC 1 vs. PBC 1 + cafeína 25 mg), el efecto fue menor al observado en los animales tratados con PBC 2, aún cuando dicha muestra presenta un contenido de cafeína de 10.5 mg⁶. Para profundizar el estudio de dicho resultado, nos planteamos comparar el efecto estimulante inducido por PBC 2 y la combinación de PBC 1 (que no contiene cafeína) y cafeína a la dosis de 10.5 mg.

En la Figura 20 se muestra la actividad locomotora de animales tratados con PBC 1 + cafeína 10.5 mg en comparación con la inducida por PBC 2. Los resultados demostraron que el tratamiento con PBC 1 + cafeína 10.5 mg no indujo un aumento en la actividad locomotora con respecto a los animales controles. La actividad locomotora inducida por PBC 2 fue significativamente mayor a la observada en los animales tratados con la combinación de PBC 1 + cafeína 10.5 ($p < 0.001$).

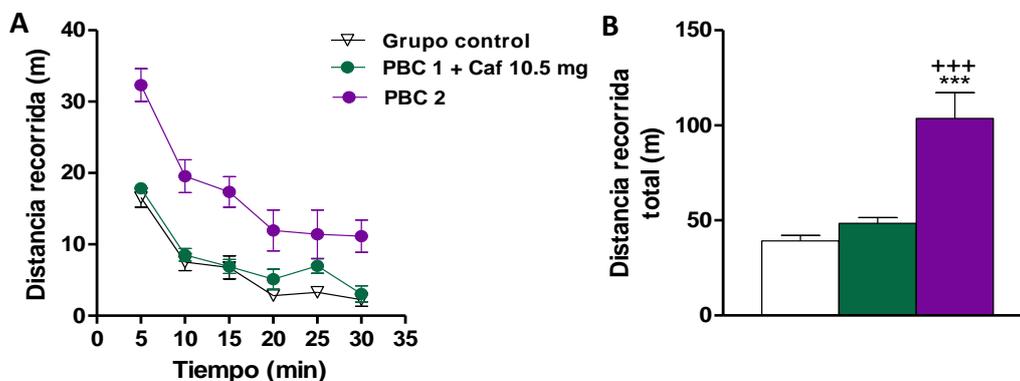


Figura 20. Efecto dosis respuesta sobre la actividad locomotora inducido por PBC 1 + cafeína 10.5 mg y PBC 2 en función del tiempo (A). Comparación entre tratamientos en los 30 min de registro (B). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = vs grupo control; + = vs PBC 1 + cafeína 10.5 mg. ***, +++ = $p < 0.001$. N=6-7.

Como se observa en la Figura 21, la cafeína a una dosis de 10.5 mg fue capaz de potenciar el efecto producido solo por PBC 1 induciendo un número de “rearings” significativamente mayor que el realizado por los animales controles ($p < 0.05$). A pesar de la potenciación observada, estos animales no alcanzaron los niveles de estimulación observado por los tratados con PBC 2, los cuales realizaron un número de “rearings” significativamente mayor tanto en relación a PBC 1 + cafeína 10.5 mg como con respecto al control ($p < 0.01$).

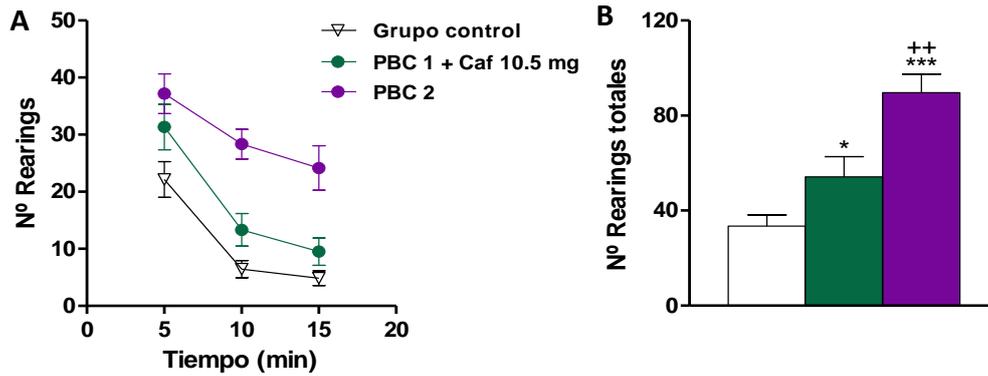


Figura 21. Efecto dosis respuesta sobre el número de “rearings” inducido por PBC 1 + cafeína 10.5 mg y PBC 2 en función del tiempo (A). Comparación entre tratamientos en los 15 min de registro. (B). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= vs grupo control; += vs PBC 1 + cafeína 10.5 mg. ***= $p < 0.001$; ++= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$. N=6-7.

Niveles tisulares de DA y sus metabolitos en el NAcc de los animales tratados.

La Figura 22 muestra que no se encontraron cambios significativos en los niveles tisulares de DA entre los animales tratados con la combinación de PBC 1 + cafeína 10.5 mg, la muestra PBC 2 y el grupo control. A pesar de ello, se observó una tendencia al aumento en los niveles de DA únicamente en los animales tratados con PBC 2, así como había sido determinado en experimentos anteriores (Figura 16). Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas en el valor de recambio dopaminérgico (DOPAC/DA) entre los diferentes tratamientos, aunque si se observó una tendencia a la disminución en dicho parámetro entre los animales tratados y el grupo control.

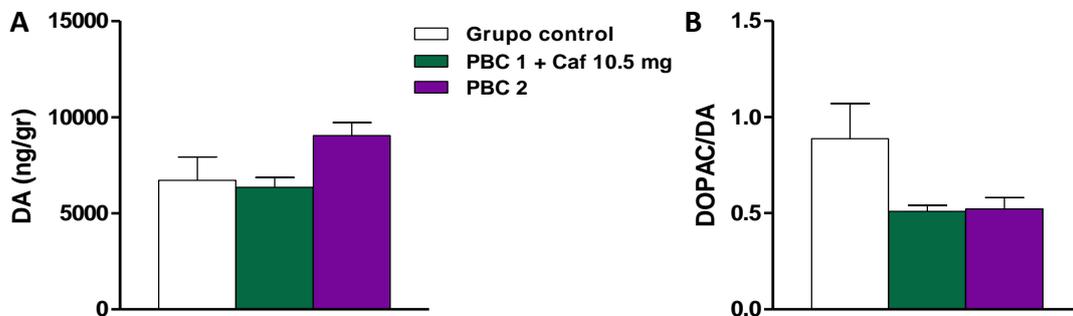


Figura 22. Niveles tisulares (ng/gr tejido) de DA (A) y el recambio (DOPAC/DA; B) en el NAcc de animales expuestos a PBC 1 + cafeína 10.5 mg y PBC 2 evaluados 30 min. después de la exposición a la droga. Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. N= 6-7.

Durante el desarrollo de esta pasantía se caracterizó el efecto estimulante producido por 2 muestras de PBC provenientes de distintas incautaciones realizadas en el Uruguay bajo la vía de administración inhalatoria, así como el efecto estimulante *per se* de cafeína. Además, se evaluó la contribución de la cafeína en el efecto estimulante inducido por PBC. Los efectos comportamentales fueron asociados con cambios neuroquímicos en el sistema DAérgico del NAcc.

7.1. Caracterización del efecto estimulante inducido por cafeína volatilizada y su relación con el sistema Daérgico.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos demostraron por primera vez el efecto estimulante inducido por cafeína volatilizada, al evaluar la actividad locomotora de los animales. Hasta nuestro conocimiento, no hay reportes en la literatura que hayan demostrado dicho efecto en animales a través del uso de la volatilización como vía de administración. El efecto demostró un perfil dosis-dependiente con una distribución en forma de U invertida, el cual concuerda con datos publicados en la literatura mostrando que cafeína genera un perfil similar luego de su administración aguda i.p. Lo reportado muestra que cafeína produce un efecto estimulante luego de su inyección a dosis entre 10 y 30 mg/kg, mientras que dosis de 3 y 100 mg/kg son inefectivas^{28,35,36}, llegando incluso la dosis de 100 mg/kg a tener efectos depresivos sobre la locomoción^{26,37}. Basándonos en este perfil de acción y en el mecanismo de acción descrito previamente para cafeína, el efecto estimulante observado en nuestros resultados podría explicarse por el bloqueo preferencial de los receptores de adenosina A_{2A}²⁶.

Nuestros resultados muestran que la dosis de 75 mg indujo un efecto estimulante, aunque fue menor que el inducido por la dosis de 50 mg. De acuerdo a lo reportado en la literatura (vía i.p.), es posible que mayores dosis de cafeína volatilizada generen una disminución más que un aumento en el efecto estimulante. Se ha demostrado que los mecanismos por los cuales dosis altas de cafeína inhiben la locomoción son independientes del bloqueo de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}³⁵. Serán necesarios estudios adicionales para esclarecer los mecanismos involucrados en este proceso; se sabe que altas dosis de cafeína son capaces de producir, entre otras cosas, la inhibición de fosfodiesterasas y la liberación de calcio intracelular²⁸.

Los datos neuroquímicos obtenidos revelaron un patrón similar al descrito en la literatura²⁸, indicando que la dosis de cafeína que generó un mayor efecto estimulante indujo un aumento en los niveles de DA en el NAcc, indicando un posible aumento en la transmisión DAérgica. A su vez, nuestros datos demostraron que el

aumento significativo de los niveles tisulares de DA inducido por la dosis de 50 mg de cafeína se acompañó de una disminución en el recambio DAérgico, el cual reflejaría una alteración en el metabolismo DAérgico, lo cual apoya la hipótesis de un aumento en la transmisión DAérgica. En relación a un posible mecanismo que explique los resultados obtenidos, Solinas y colaboradores ²⁸ demostraron que el aumento en los niveles extracelulares de DA en el NAcc (medidos por microdiálisis) se debe a la acción de la cafeína sobre los receptores A₁, dado que dicho efecto se reprodujo con antagonistas de los receptores A₁ y no por antagonistas A_{2A}. Además, por su localización pre-sináptica, los receptores A₁ participarían en la modulación de la liberación de DA. Así, aunque actualmente se piense que el bloqueo de los receptores de adenosina A_{2A} es el mecanismo responsable del efecto estimulante producido por cafeína, el bloqueo de los receptores de adenosina A₁ puede también jugar un papel relevante en dicho efecto.

Si bien no poseemos un correlato de la cantidad exacta de cafeína que fue inhalada por lo animales, el efecto inducido por la droga tuvo una repercusión a nivel comportamental y neuroquímico. Resulta imprescindible realizar un análisis bioquímico para determinar el nivel plasmático de cafeína en el plasma de los animales tratados, de forma tal de conocer con mayor exactitud la cantidad de cafeína absorbida por los animales, validando así aún más el modelo utilizado.

7.2. Caracterización del efecto estimulante de muestras de PBC con diferente contenido en cocaína y cafeína y su relación con el sistema DAérgico.

Se realizó la caracterización del efecto estimulante de dos muestras de PBC con similares concentraciones de cocaína base, pero con diferente composición de cafeína. PBC 1 contenía bajas concentraciones de cafeína (1%), mientras que PBC 2 presentaba concentraciones altas (14%).

Los resultados que obtuvimos de los animales tratados con PBC 1 muestran que, a la dosis ensayada, no fue capaz de inducir un efecto estimulante al ser inhalado. Los animales no evidenciaron un aumento significativo ni en la distancia recorrida ni en número de “rearings” con respecto a los animales controles, al igual que tampoco mostraron diferencias en los niveles neuroquímicos analizados. Este resultado indica, en principio, que el contenido en cocaína de la muestra no fue suficiente para inducir el efecto estimulante. Aunque no se pueden comparar las dosis ensayadas, estos datos no concuerdan con nuestros datos previos, en los cuales la administración i.p. de la misma muestra de PBC sí fue capaz de producir un efecto estimulante significativo en relación al control ⁶.

En contraste, PBC 2 fue capaz de inducir un efecto estimulante, aumentando tanto la distancia recorrida como el número de “rearings” de aquellos animales tratados. Dicho efecto comportamental parece corresponderse con la cantidad de cocaína y cafeína presentes en dicha muestra en comparación con PBC 1. A pesar de ello, el efecto comportamental no se vio acompañado de cambios significativos en los niveles neuroquímicos analizados. Cabe destacar que los cambios neuroquímicos observados en los animales tratados con PBC 2 fueron menores que aquellos observados en los animales tratados con cafeína 50 mg, a pesar de mostrar un efecto estimulante muy similar. Estos resultados sugieren que dicha diferencia podría deberse a una diferente cinética en el mecanismo de acción de cocaína y cafeína, haciendo que el cambio neuroquímico producido por la droga no se manifieste totalmente mediante este protocolo experimental.

7.3. Evaluación de la contribución de la cafeína en el efecto estimulante producido por PBC.

El efecto estimulante observado en los animales tratados con la co-administración de PBC 1 y cafeína 25 mg, confirmó que la presencia de cafeína contribuye en la aparición del efecto estimulante inducido por PBC. Cabe destacar que el efecto comportamental de PBC 1 + cafeína 25 mg fue menor al inducido por la volatilización de PBC 2 (muestra que posee 10.5 mg de cafeína). Aún más, la combinación de PBC 1 y cafeína 10.5 mg, produjo un efecto significativamente menor al inducido por PBC 2, a pesar de contener las mismas concentraciones en cocaína y cafeína. Este resultado sugiere que cafeína no sería la única responsable de las diferencias observadas en el efecto estimulante inducido por ambas muestras de PBC. Otros factores podrían explicar estos resultados. Por ejemplo, diferencias en los puntos de volatilización de ambas muestras de PBC podrían explicar los efectos comportamentales obtenidos. De acuerdo a esta hipótesis, PBC 2 se volatilizaría a menor temperatura, hecho que garantiza la preservación de sus principales componentes (cocaína y cafeína) y por lo tanto su mayor acceso al cerebro. Altas temperaturas podrían deteriorar cualquiera de los dos componentes disminuyendo su cantidad y accesibilidad al cerebro. Por lo tanto, resulta imprescindible realizar un análisis bioquímico de los niveles de cocaína y cafeína en plasma, el cual permitiría determinar exactamente las concentraciones de ambas sustancias inhaladas por los animales tratados, y determinar así la existencia o no, de diferencias en la volatilización de las distintas PBC.

Pese a observarse diferencias significativas en los efectos comportamentales, éstas no se vieron reflejada en los niveles tisulares de DA y DOPAC de aquellos animales tratados con PBC 1 + cafeína 10.5 mg y los tratados con PBC 2. Estudios de microdiálisis intracerebral *in vivo* nos permitirían tener un mejor correlato neuroquímico del efecto comportamental, permitiéndonos observar las posibles diferencias neuroquímicas inducidas por los distintos tratamientos.

8. CONCLUSIONES.

- La estrategia experimental utilizada confirmó parcialmente la hipótesis de trabajo dado que, únicamente la volatilización de PBC 2 demostró generar un efecto estimulante significativo en los animales tratados. Por otra parte, se demostró que cafeína contribuyó al efecto estimulante de PBC, dado que su presencia potenció el efecto estimulante inducido por PBC 1. Este resultado sugiere que la adulteración de muestras de PBC con cafeína podría ser un factor fundamental en el efecto estimulante y el poder adictivo de la droga. Sin embargo, en nuestro modelo experimental, la temperatura de volatilización de PBC, y por tanto la mayor disponibilidad de sus componentes activos, parecen contribuir en la diferente capacidad estimulante observada.
- Por primera vez se evidenció que cafeína volatilizada indujo un efecto estimulante dosis-dependiente. Este resultado refuerza el papel relevante de los adulterantes en el efecto farmacológico de una droga estimulante.
- El abordaje experimental neuroquímico utilizado no permitió identificar cambios significativos en el sistema DAérgico en el NAcc en la mayoría de los tratamientos realizados. Futuros experimentos aplicando la técnica de microdiálisis intracerebral permitirán contar con un correlato neuroquímico más específico.
- Para confirmar los cambios comportamentales observados, es fundamental contar con un correlato bioquímico de los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína de animales sometidos a los tratamientos volatilizados.
- Se validó el modelo de volatilización como vía de administración de drogas psicoestimulantes en nuestro laboratorio.
- Este trabajo aporta información relevante que demuestra la incidencia de la vía de administración junto al de la composición química en el efecto farmacológico de PBC.

9. PERSPECTIVAS.

- Determinación del nivel plasmático de cocaína, cafeína y sus metabolitos en el plasma de los animales tratados con PBC y cafeína volatilizadas.
- Estudiar mediante el uso de la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo* los cambios neuroquímicos inducidos en el sistema DAérgico en el NAcc en animales sometidos a la volatilización de PBC y cafeína.

10. REFERENCIAS.

1. Junta Nacional de Drogas *Pasta Base de Cocaína. Prácticas y Gestión de riesgos en adolescentes uruguayos.* (2006).
2. Junta Nacional de Drogas *Drogas: más información menos riesgos.* (2007).
3. Castaño, G. A. Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones* **12**, 541-550 (2000).
4. Samaha, A.-N. & Robinson, T. E. Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends in Pharmacological Sciences* **26**, 82-7 (2005).
5. Meikle, M. N. *et al.* Primer estudio pre-clínico de la acción de pasta base de cocaína en el sistema nervioso central. *Revista de Psiquiatría del Uruguay* **73**, 25-36 (2009).
6. López-Hill, X. *et al.* Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behavioural Brain Research* **221**, 134-41 (2011).
7. ElSohly, M. A., Brenneisen, R. & Jones, A. B. Coca Paste: chemical analysis and smoking experiments. *Journal of Forensic Sciences* **36**, 93-103 (1991).
8. Cole, C. *et al.* Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Testing and Analysis* **3**, 89-96 (2011).
9. Evrard, I., Legleye, S. & Cadet-taïrou, A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy* **21**, 399-406 (2010).
10. Gostic, T., Klemenc, S. & Stefane, B. A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Science International* **187**, 19-28 (2009).
11. Carboni, E., Imperato, A., Perezzi, L. & Chiara, G. D. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* **28**, 653-661 (1989).
12. Koob, G. F. & Le Moal, M. Psychostimulants. *Neurobiology of Addiction* 69-120 (2006).
13. Robinson, T. E. & Berridge, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews* **18**, 247-291 (1993).

14. Volkow, N. D. *et al.* Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sciences* **67**, 1507-1515 (2000).
15. Lizasoain, I., Moro, M. A. & Lorenzo, P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones* **14(1)**, 57-64 (2002).
16. Hatsukami, D. & Fischman, M. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *Journal of the American Medical Association* **276(19)**, 1580-1588 (1996).
17. Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Tomasi, D. & Telang, F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 15037-42 (2011).
18. Pierce, R. C. & Kalivas, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research* **25**, 192-216 (1997).
19. Kalivas, P. W. & Volkow, N. D. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *American Journal of Psychiatry* **162**, 1403-1413 (2005).
20. Koob, G. F. & Volkow, N. D. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* **35**, 217-38 (2010).
21. Fernández-Espejo, E. Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Neurobiological Basis of Drug Addiction* **34**, 659-664 (2002).
22. Jay, T. M. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in Neurobiology* **69**, 375-390 (2003).
23. Fernández-Espejo, E. Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *The Neurobiology of Psychostimulant Addiction* **43**, 147-154 (2006).
24. Ferré, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* **20**, 35-49 (2010).
25. Londos, C., Cooper, D. M. F. & Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 2551-2554 (1980).
26. Fisone, G., Borgkvist, A. & Usiello, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 857-72 (2004).
27. Fredholm, B. B. & Dunwiddie, T. V. How does adenosine inhibit transmitter release? *TIPS Reviews* **91**, 130-134 (1988).

28. Solinas, M. *et al.* Caffeine Induces Dopamine and Glutamate Release in the Shell of the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience* **22**, 6321-6324 (2002).
29. Rainnie, D. G., Grunze, H. C. R., Mccarley, R. W. & Greene, R. W. Adenosine Inhibition of Mesopontine Cholinergic Neurons: Implications for EEG/EEG Neurons : Implications for EEG Arousal. *Science* **263**, 689-692 (1994).
30. Jarvis, M. F. & Williams, M. Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, [3H]CGS 21680. *European Journal of Pharmacology* **168**, 243-246 (1989).
31. Ferre, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B. & Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7238-41 (1991).
32. Yacoubi, M. E. *et al.* The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British Journal of Pharmacology* **129**, 1465–1473 (2000).
33. Jardim, J. R. *et al.* An Inhalation Chamber Model for Controlled Studies of Tobacco Smoke Toxicity in Rodents. *Archivos de Bronconeumología* **46**, 455-458 (2010).
34. Yamada, H. *et al.* Pharmacology , Biochemistry and Behavior Preadolescent tobacco smoke exposure leads to acute nicotine dependence but does not affect the rewarding effects of nicotine or nicotine withdrawal in adulthood in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **95**, 401-409 (2010).
35. Cauli, O. & Morelli, M. Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology* **16**, 63-77 (2005).
36. Misra, a L., Vadlamani, N. L. & Pontani, R. B. Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **24**, 761-4 (1986).
37. Garrett, B. & Holtzman, S. G. D1 and D2 dopamine receptor antagonists block caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **47**, 89-94 (1993).