

***Efecto agudo de la Pasta Base
de Cocaína sobre el sueño y la
actividad electroencefalográfica:
Rol de la cafeína***

Natalia Schwarzkopf

Orientador:

Dr. Pablo Torterolo

Co-orientadoras:

Dra. Cecilia Scorza

Dra. Patricia Lagos

Laboratorio de Neurobiología del Sueño,
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina
UdelaR.

PEDECIBA Biología, Sub-área Neurociencias

Marzo, 2017

RESUMEN

La pasta base de cocaína (PBC) es una droga de abuso, psicoestimulante, e ilegal. La misma surge de etapas tempranas en el procesamiento de las hojas de coca para la extracción y purificación del alcaloide cocaína hasta la obtención final del clorhidrato de cocaína. La presencia de cocaína en su forma de base, define a la PBC como un tipo de cocaína fumable.

Se sabe que el consumo crónico de PBC genera un perfil clínico prototípico que lo distingue del observado para el consumo de clorhidrato cocaína. La rápida y alta dependencia y serias alteraciones en el ciclo sueño-vigilia, son algunos de las características del perfil clínico de PBC.

La cafeína es el principal adulterante activo detectado en la PBC. Se ha reportado que la presencia de cafeína potencia la actividad locomotora generada por PBC. Por lo tanto, la interacción entre cocaína y cafeína podrían explicar, en parte, las diferencias clínicas observadas entre los consumidores de clorhidrato de cocaína y PBC.

Dado los escasos estudios sobre los efectos neurobiológicos de la PBC, en particular, en relación a su efecto sobre el sueño, nuestro objetivo fue caracterizar en ratas, los efectos agudos de la PBC sobre ciclo sueño-vigilia y la actividad electroencefalográfica. Particularmente analizaremos los efectos de la cafeína como adulterante.

Para esto, ratas macho fueron crónicamente implantadas con electrodos corticales y musculares para registros polisomnográficos. Sesiones de registros de 6 hs se realizaron en condiciones de libre movimiento, durante la fase de luz, luego de la administración i.p de PBC₁ (con alto contenido en cafeína) y comparado con dosis equimolares de cocaína, cocaína + cafeína, PBC₂ (con bajo contenido en cafeína) y solución salina.

En cada serie experimental se analizó el tiempo total de los estados de vigilia y sueño, así como las latencias al sueño. Por otra parte, durante la vigilia se analizaron, la potencia y la coherencia de las distintas bandas de frecuencia del EEG.

Los resultados mostraron que:

1. El tratamiento con PBC₁ demostró un efecto promotor de la vigilia significativamente mayor que el de cocaína pura, sugiriendo un rol preponderante de la cafeína.
2. La combinación de cocaína y cafeína produjo un efecto similar al inducido por PBC₁.
3. El grupo tratado con PBC₂ presentó un efecto similar al de cocaína pura en relación a la vigilia y al sueño.
4. El grupo tratado con PBC₁ se diferenció del grupo tratado con cocaína en relación a la sincronización local (potencia) y a la distancia (coherencia) del EEG durante la vigilia, sugiriendo nuevamente la participación de la cafeína en este efecto.

En conjunto, los resultados obtenidos ponen en evidencia el rol aditivo de la cafeína con la cocaína en los efectos producidos sobre el ciclo sueño-vigilia y los perfiles electroencefalográficos. Por lo tanto, esta tesis aporta datos que relevantes que podrían explicar el perfil clínico característico de los consumidores de PBC.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABREVIATURAS	5
PRESENTACIÓN DE LA TESIS	6
INTRODUCCIÓN	6
1. CLORHIDRATO DE COCAÍNA	6
2. PASTA BASE DE COCAÍNA	
2.1 Características de consumo y formas de PBC	7
2.2 Composición química de PBC	9
2.3 Vía de administración y sintomatología clínica de los consumidores	10
2.4 Estudios pre-clínicos en ratas con PBC	12
3. CICLO SUEÑO-VIGILIA	
3.1 La vigilia y el sueño en la rata	14
3.2 Potencia y coherencia en el EEG de la rata	15
3.3 Efecto de la cocaína y la cafeína sobre la vigilia, el sueño y la actividad EEG	17
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVO GENERAL	19
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS	20
8. RESULTADOS	
8.1 Efecto de la PBC ₁ sobre la vigilia y el sueño	26
8.2 Efecto de la cocaína sobre la vigilia y el sueño	28
8.3 Efecto del sucedáneo PBC ₁ sobre la vigilia y el sueño	31
8.3.1 Efectos similares entre PBC ₁ y su sucedáneo	34
8.4 Efecto de la PBC ₂ sobre sobre la vigilia y el sueño	35
8.5 Comparación del efecto de la PBC ₁ con sus dos controles: PBC ₂ y CC	38
8.6 Efecto de la PBC ₁ y la cocaína sobre la potencia y la coherencia	40
9. DISCUSIÓN	
9.1 Efecto de la PBC ₁ . Comparación con salino, CC, sucedáneo y PBC ₂	47
9.2 Bases del efecto activador de la cocaína	48
9.3 Bases del efecto activador de la cafeína	49
9.4 Bases neurológicas de la acción aditiva de CC y cafeína durante la vigilia	51
9.5 Efecto de la cocaína y la PBC ₁ sobre la potencia y la coherencia	52
10. CONCLUSIONES	55
11. PERSPECTIVA	56
12. PRESENTACIÓN DE DATOS	57
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ABREVIATURAS

ANOVA:	análisis de varianza (por sus sigla en inglés “ANalysis Of VAriance”).
AW:	vigilia activa (por su sigla en inglés “active wakefulness”).
BF:	Cerebro Basal Anterior (por su nombre en inglés “Basal Forebrain”);
Caf:	cafeína
CC:	cocaína
CPF:	Corteza Pre-frontal
DA:	dopamina
EEG:	electroencefalograma
EEM:	error estándar
EMG:	electromiograma
HFOs:	oscilaciones de frecuencia rápidas (por su sigla en inglés High Frequency Oscillations).
HL:	Hipotálamo Lateral
HP-TMN:	Hipotálamo Posterior- núcleo Tuberomamilar
HPO:	Hipocampo
LC:	Locus Coeruleus
LFP:	Potencial de campo (por su sigla en inglés: local field potencial).
LDT/ PPT:	núcleo tegmental laterodorsal/ pedúnculo-pontino
LS:	sueño ligero (por su sigla en inglés “light sleep”).
NAcc:	Núcleo Accumbens
NPO:	Núcleo Pontis Oralís
NDR:	Núcleo Dorsal del Rafe
sNREM:	sueño no-REM
PBC:	Pasta Base de Cocaína
QW:	vigilia tranquila (por su sigla en inglés “quiet wakefulness”).
RA1/RA2a:	receptores de adenosina 1 y A2a
RDA1/ 2:	receptores de dopamina 1 y 2
S1i:	corteza somatosensorial primaria izquierda
SN:	Sustancia Nigra
V1i:	corteza visual primaria izquierda
sREM:	sueño REM (por su sigla en inglés “rapid eyes movement”).
SRAA:	sistema reticular activador ascendente
SWS:	sueño de ondas lenta (por su sigla en inglés “slow wave sleep”).
SNC:	Sistema Nervioso Central
VTA:	Área Tegmental Ventral (por su sigla en inglés “ventral tegmental area”).

PRESENTACIÓN DE TESIS

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Sueño, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina (UdelaR), en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Scorza, del Departamento de Neurofarmacología Experimental del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable en el marco del proyecto de investigación ANII-FSS-2009-1_ 1613, titulado: “Estudio pre-clínico de los cambios anátomo-funcionales y conductuales inducidos por Pasta Base de Cocaína. Farmacología y proyección clínica”.

INTRODUCCIÓN

1. CLORHIDRATO DE COCAÍNA

El clorhidrato de cocaína es el resultado final del procesamiento de las hojas de coca (*Erythroxylon coca*). Esta es una droga ilegal de abuso, psicoestimulante, de distribución mundial, que presenta un alto consumo en la población mundial. Es considerada junto al éxtasis y la marihuana una droga “recreativa” (Doktorgrades 2007; Schierenbeck et al. 2008). Durante la fase inicial de su consumo produce una sintomatología típica denominada “kick”; caracterizada por euforia, activación motora, hipervigilancia y aumento del tono simpático (Schierenbeck et al., 2008). Frente a la ausencia de la droga, se ingresa en una etapa de abstinencia caracterizada por síntomas de letargia, comportamiento antisocial y deseos de consumir nuevamente (craving o búsqueda de la droga). Su consumo habitual es mediante el “esnifado” intranasal aunque puede darse también la administración intravenosa.

2. PASTA BASE DE COCAÍNA

La pasta base de cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso con propiedades psicoestimulantes, que se clasifica como una cocaína fumable. Junto con el crack comparten la misma vía de administración, la inhalación pulmonar. Ambas drogas presentan puntos de fusión bajos y por medio de calor pueden ser volatilizadas por sublimación o ebullición (Castaño, 2000). La PBC es un producto intermedio en el procesamiento químico para la extracción y purificación del alcaloide cocaína hasta la obtención final de clorhidrato de cocaína. A diferencia del clorhidrato de cocaína, en la PBC y el crack, el alcaloide cocaína se encuentra en su forma de base, característica que les confiere la propiedad de ser fumados. El crack a diferencia de la PBC, es un paso posterior al clorhidrato de cocaína. Se obtiene por el agregado de bicarbonato de

sodio y agua al clorhidrato y mediante el calentamiento se volatiliza únicamente la cocaína base (Figura 1).

La síntesis de PBC comienza con la maceración de las hojas de coca del arbusto *Erythroxylum coca*, en una solución con amoníaco u otra sustancia alcalina, solventes orgánicos como querosén o gasoil, y ácido sulfúrico (Figura 1). La mezcla resultante contiene un porcentaje variable de cocaína base, e impurezas que surgen del procesamiento químico, como restos de solventes y otros metabolitos o alcaloides de la planta (ElSholy et al., 1991; JND, 2008). Finalizado este proceso, la PBC tiene la apariencia de un polvo de consistencia pastosa y color blanco amarillento o amarronado, dependiendo del grado de avance del proceso de purificación y cantidad de cocaína e impurezas que contenga la mezcla.

A su vez, como la mayoría de las drogas ilícitas, la PBC se vende con el agregado de sustancias adulterantes. Los adulterantes se clasifican en dos tipos: los inactivos, definidos como aquellas sustancias que se agregan exclusivamente con el fin de aumentar su volumen; y los activos, sustancias que poseen la capacidad de imitar o potenciar los efectos de la droga (Cole et al. 2010; 2011). Estos últimos pueden poseer un efecto psicoactivo, por lo que constituyen un factor relevante que debe ser considerado a la hora de estudiar los efectos neurobiológicos de las drogas de abuso. Las principales sustancias adulterantes presentes en distintas drogas de abuso son: lidocaína, cafeína, fenacetina, paracetamol y levamisol (Evrard et al., 2010).

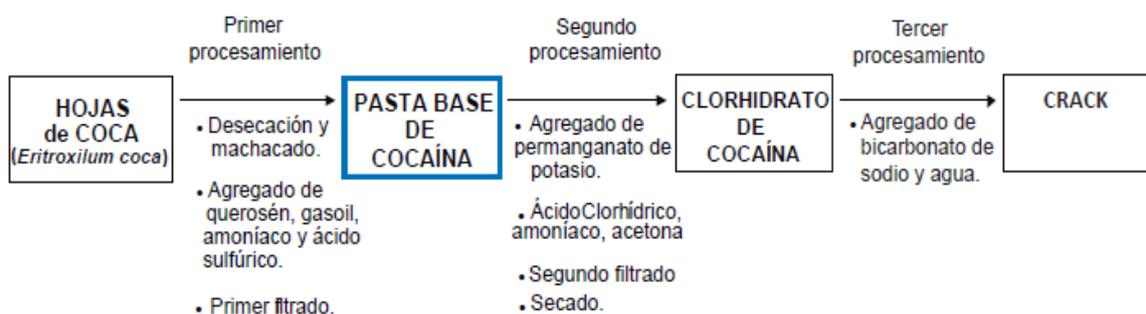


Figura 1. Esquema del proceso de elaboración del Clorhidrato de Cocaína (modificado de Prieto, 2012).

2.1 Características del consumo y formas de PBC.

En Uruguay existen registros de presencia de PBC desde el año 2000, aunque su consumo se expandió e instauró definitivamente en el mercado de drogas a partir del año 2002, favorecido por la crisis económica y la ausencia de otras drogas como el clorhidrato de cocaína o la marihuana (JND, 2007). En ese momento se hablaba de una “droga nueva”, que generaba un perfil clínico diferente, aunque la PBC era extensamente consumida desde la década de los 60-70’ en los países productores de

CC como Colombia, Bolivia y Perú (Jeri, 1982; UNODC, 2013). Su rápida expansión por Latinoamérica fue impulsada por su bajo costo, fácil acceso y la prohibición de venta de precursores químicos del CC (Pascale et al, 2014).

De acuerdo con la 5ta Encuesta Nacional en Hogares sobre Consumo de Drogas, el consumo de PBC en nuestro país presenta una prevalencia anual de 0,4 %. Esta prevalencia es baja en comparación con otras drogas de abuso como el alcohol, marihuana y el clorhidrato de cocaína (JND, 2012). Aun así, es importante tener en cuenta que el consumo de PBC se encuentra heterogéneamente distribuido en las diferentes regiones geográficas (segmentación territorial y socioeconómica), de forma que en zonas más vulnerables, (al norte y oeste de Montevideo), su prevalencia anual alcanza el 4 % (JND, 2013). Pese a su baja prevalencia, las características y consecuencias de su consumo a nivel social y sanitario hacen que la droga posea una alta visibilidad, y sea al día de hoy uno de los principales problemas en materia de drogas ilegales de nuestro país. Las dos formas más comunes de comercialización de PBC son: la “tiza” para el tráfico internacional, y la “gota” o “chasqui”, que es la unidad de dosificación que le llega al consumidor (Figura 2). Se estima que cada chasqui o “dosis” posee entre 0,1- 0,5 gr. de PBC, mientras que las tizas poseen entre 10-15 gr. La Junta Nacional de Drogas ha estimado que los consumidores dependientes de PBC pueden consumir más de 20 dosis por día, lo que daría un consumo diario de hasta 10-20 gr. Es decir que, el costo para mantener la adicción es más alto que el de un consumidor de CC, que es próximo a 2- 3 gr. día.

La PBC se puede consumir con otras drogas como tabaco o marihuana, en forma de cigarrillos, mediante pipas u otros dispositivos similares de fabricación casera (Pascale et al., 2010).

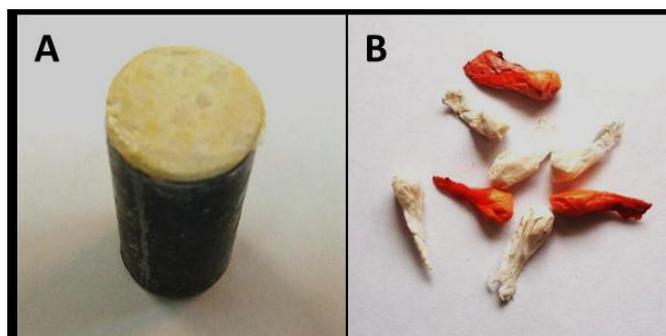


Figura 2. Muestras representativas de PBC en su formato tiza (A) y chasqui (B), (tomado de Meikle y cols., 2009).

2.2 Composición química de la PBC.

El acceso a diferentes incautaciones policiales de PBC en Montevideo proporcionadas por el Instituto Técnico Forense, con la autorización del Ministerio de Salud Pública y en acuerdo con la JND, ha permitido al grupo de la Dra. Scorza analizar una serie de muestras de PBC incautadas, que potencialmente serían consumidas (Tabla 1).

De su análisis químico se desprende que cocaína base es el principal componente en la mayoría de las muestras. La concentración del alcaloide cocaína varió entre: 20 y 68.9 %. Otros componentes detectados en porcentajes mínimos han sido: ecgonina (metabolito generado por la hidrólisis de la cocaína) y cis-cinnamoyl cocaína (metabolito de la planta que está comúnmente presentes en los extractos, previo al agregado de permanganato, indicativo de la PBC) (Meikle et al., 2009; Moraes et al., 2010; López-Hill et al., 2011).

En la PBC, la cafeína fue el principal adulterante activo detectado y su porcentaje varió entre: 1 y 15 %. Cada muestra de PBC analizada presentó una relación de concentración entre cocaína y cafeína distinta, que permitió clasificarlas en tres grupos: 1. Alto porcentaje de cocaína (CC) y cafeína, 2. Alto porcentaje de CC y bajo de cafeína, 3. Bajo porcentaje de CC y alto de cafeína (López-Hill et al., 2011). Si bien esta serie de muestras analizadas es pequeña (Tabla 1), en los últimos análisis en los que se incluyó una mayor cantidad de muestras incautadas, se han detectado, aunque en menor proporción otros adulterantes, tales como: aminopirina y levamisol (Galvalisi et al. 2015).

La cafeína puede ser volatilizada, característica que explicaría su uso como adulterante de una droga fumable (Gostic et al., 2009, Galvalisi et al. 2016). La cafeína es considerada una de las sustancias psicoactivas más utilizada en humanos. Se puede consumir en infusiones (mate, café, té) o chocolate (Mikkelsen et al., 1978; Nehlig et al., 1999) . En consumidores regulares de café se han descripto diferentes efectos psicoestimulantes, como aumento del estado de alerta. En concentraciones altas (250 mg) puede desarrollar un desorden denominado “cafeinismo”, caracterizado por nerviosismo, ansiedad, insomnio, irritabilidad y palpitations. En ocasiones asociado con la generación de estados de psicosis y anorexia nerviosa (Stillner et al., 1978; Sours, 1983).

Muestras de PBC	Cocaína base (%)	Cis-cinamoil cocaína (%)	Trans-cinamoil cocaína (%)	Cafeína (%)
PBC 1	68.9 ± 3.6	1.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2	15.0 ± 0.1
PBC 2	67.4 ± 1.2	4.2 ± 0.2	1.9 ± 0.2	14.0 ± 0.2
PBC 3	59.3 ± 0.6	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.2	14.0 ± 0.1
PBC 4	59.9 ± 4.5	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2	14.0 ± 0.5
PBC 5	68.2 ± 2.0	Nd	Nd	1.0 ± 0.5
✦ PBC 6	50.2 ± 1.0	Nd	Nd	1.0 ± 0.5
✦ PBC 7	20.7 ± 0.2	Nd	Nd	10.3 ± 0.5
PBC 8	64.6 ± 0.2	Nd	Nd	19.0 ± 0.5
PBC 9	48.4 ± 0.2	Nd	Nd	0.0 ± 0.0
PBC 10	55.3 ± 0.2	Nd	Nd	15.0 ± 0.5
Cocaína	89.6 ± 0.0	-	-	-
Cafeína	-	-	-	100.0 ± 0.0

Tabla 1. Análisis cuantitativo de algunas muestras de PBC. Los datos están expresados como Media ± EEM. La cuantificación de cocaína, cis y trans-cinamoil cocaína y cafeína se realizó tomando como referencia soluciones estándares de cada una de las sustancias: cocaína y cafeína. Nd: no determinado. Tomado de Prieto y cols. (2012)✦ En la presente tesis las muestras de PBC utilizadas se han denominado como **PBC₁** a la **PBC₇**; y **PBC₂** a la **PBC₆**.

2.3 Vía de administración y sintomatología clínica de los consumidores.

La inhalación pulmonar principal vía de administración de PBC facilita que los diferentes compuestos de la PBC se absorban a gran velocidad (Figura 4). Además, su naturaleza liposoluble le permite atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica, alcanzando el Sistema Nervioso Central (SNC) en pocos segundos. Estas características refuerzan el potente y veloz efecto euforizante de la droga, y estarían implicadas en el potente poder adictivo de la PBC (Lizasoain et al., 2002). En la encuesta de la JND del 2012 se ha registrado que los consumidores crónicos de PBC experimentan mayor y más rápida dependencia en comparación con los consumidores de CC. Un 53 % de los consumidores de PBC presentaron signos de dependencia, en relación a un 34 % para los consumidores de CC.

El perfil clínico del individuo que consume PBC, se puede sistematizar en 4 etapas (Jeri, 1982; Triaca et al., 2009):

1. **Euforia:** disminución de las inhibiciones, hiperactividad motora, hiperideación, disminución del apetito, aumento de frecuencia cardíaca, respiratoria y presión arterial y una fuerte alteración sobre el ciclo sueño-W.
2. **Disforia:** angustia, ansiedad, apatía, inseguridad, deseo de seguir consumiendo, indiferencia sexual.
3. **Consumo ininterrumpido:** búsqueda ininterrumpida de la droga para evitar etapa de disforia, que se acompaña por un deseo incontrolable de volver a consumir (craving).

4. **Psicosis y alucinaciones:** ideas paranoides, alucinaciones y agresividad, acompañadas de una alta dependencia a la droga.

Al consumirse en forma crónica, los reportes médicos describen un perfil clínico caracterizado por insomnio, anorexia, irritabilidad, alteraciones de memoria y concentración, pensamiento rígido, impulsividad y agresividad (Bojórquez, 1991; Pérez, 2003). En algunos casos también puede observarse la aparición de psicosis paranoide y alucinaciones dependiendo de la cantidad consumida, así como conductas antisociales. Cuando el adicto se encuentra sin acceso a la droga entra en una etapa de **Síndrome de Abstinencia**, en la cual puede presentar una profunda depresión, letargia, irritabilidad e ideas suicidas.

Existen evidencias que demuestran que la velocidad con la cual la droga alcanza el cerebro es uno de los factores fundamentales para determinar su efecto psicoactivo y potencial adictivo (Bojórquez, 1991; Gossop et al., 1992; Samaha et al., 2005). Se ha argumentado que ésta puede ser la razón por la que el crack, es más adictivo que el CC aspirado (Hatsukami et al., 1996). En este sentido, se piensa que el uso de una vía rápida de administración constituye uno de los factores que explicarían el perfil clínico observado en los consumidores de PBC. Sin embargo, considerando que la PBC no es una droga pura, sus componentes podrían promover distinto grado de estimulación a nivel del SNC e incidir en el poder adictivo de la droga. Por lo tanto, es importante considerar el factor “composición química” en los distintos efectos generados por la PBC.

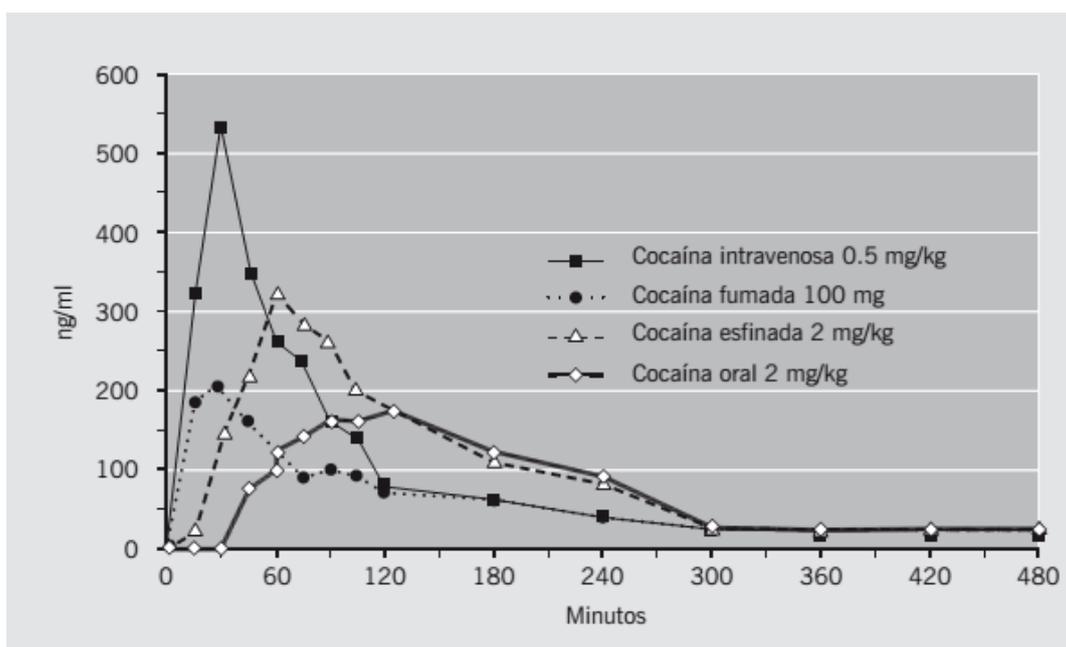


Figura 4. El gráfico representa variaciones temporales en los niveles plasmáticos de cocaína en humanos, administrada a dosis equivalentes y a través de diferentes vías, (modificado de Jones, 1998).

2.4 Estudios pre-clínicos en ratas con PBC.

Scorza y colaboradores fueron pioneros en el estudio de las acciones de PBC a nivel del SNC, y del rol de cafeína como principal adulterante (López Hill et al. 2011; Meikle et al. 2013; Prieto et al. 2015; Prieto et al. 2016, Galvalisi et al. 2016). En animales, evaluaron el efecto estimulante agudo inducido por tres muestras representativas de la diversidad química de la PBC (Tabla 1), denominadas: PBC 1 (alto contenido de cocaína base y cafeína); PBC 5 (alto contenido de cocaína base, bajo contenido de cafeína); PBC 7 (bajo contenido de cocaína base, alto contenido de cafeína), y se lo comparó con el efecto estimulante inducido por un grupo tratado con cocaína sin adulterar. Todos los tratamientos fueron administrados a dosis equivalentes en cocaína base y, mediante el registro automático de la distancia recorrida, (índice de la actividad locomotora), se evaluaron las posibles diferencias entre los grupos experimentales.

De sus resultados obtenidos se destaca que, todas las muestras de PBC indujeron un efecto estimulante, evidenciado por una mayor distancia recorrida respecto al control.

Las PBC 1 y 5 (5mg/kg) generaron efectos muy similares a los animales inyectados con CC sin adulterar. Lo que sugiere que la CC presente en ambas muestras de PBC fue la principal responsable de generar la acción estimulante. Por otro lado, observaron que la inyección de las PBC 7 a una dosis equivalente de cocaína base de 5 mg/kg, indujo un aumento en la actividad locomotora significativamente mayor al generado por la cocaína pura. Esta diferencia indicó que, además de la cocaína base, otros compuestos participaban del efecto estimulante de la PBC 7.

Con el fin de confirmar si la cafeína era la responsable de este fenómeno, utilizaron el sucedáneo (CC + cafeína) a dosis equivalentes a su contenido en la PBC 7 (5 y 2,5 mg/kg respectivamente). En esos experimentos evidenciaron que la co-administración de cocaína y cafeína reproducía el efecto hiperlocomotor provocado por la PBC 7 (López-Hill et al., 2011; Prieto et al., 2012). El mismo fenómeno se evidenció utilizando dosis más altas de PBC 1 (20 mg/kg) vs. CC (20 mg/kg). Adicionalmente, fue demostrado que la combinación de cocaína y cafeína, a la proporción que aparece en la PBC 7, es capaz de aumentar el poder motivacional de la CC (Prieto et al. 2016), sugiriendo que en la PBC, la presencia de cafeína, no solo participa en el efecto estimulante sino también reforzador de la droga.

3. CICLO SUEÑO- VIGILIA

El ciclo sueño- vigilia es el ritmo circadiano más evidente en los mamíferos y las aves. En este ciclo, se pueden distinguir claramente tres estados comportamentales: la vigilia (W), el sueño no-REM o lento (sNREM) y el sueño REM (sREM, por su sigla en inglés rapid eye movements, movimientos oculares rápidos). La polisomnografía ha sido la herramienta básica para distinguir estos estados tanto en humanos como en animales de experimentación. Ésta consiste en el registro simultáneo del electroencefalograma (EEG) que es el registro de la actividad bioeléctrica cerebral, el electromiograma (EMG) que es el registro de la actividad eléctrica muscular y el electrooculograma (EOG) que registra los movimientos oculares. El estado de W se caracteriza por una interacción óptima con el ambiente, en donde se desarrollan diversos comportamientos para la supervivencia. En el humano, durante la W se observan ondas de alta frecuencia y baja amplitud. En el estado de sueño existe una marcada disminución de la interacción con el ambiente, un aumento del umbral de reacción a estímulos externos, una disminución de la actividad y tono muscular, así como la adopción de una posición adecuada para conservar el calor. Desde el estado de W se ingresa al estado sNREM, y de éste se alcanza el sREM. En el ser humano, actualmente se reconocen tres fases (numeradas del 1 al 3) relacionadas con la profundidad del sNREM. En las etapas más profundas del sNREM no existe o es mínima la actividad cognitiva (Dement y Kleitman, 1957; Hobson et al., 2009). Además, se acompaña de un aumento tónico de la actividad parasimpática que determina cambios característicos de la actividad visceral (disminución de la frecuencia cardíaca, de la presión arterial, etc.). En el EEG se observan ondas deltas, husos de sueño y complejos K. A continuación se ingresa en la etapa de sREM, donde ocurren principalmente los sueños (actividad onírica). Además, se acompaña de atonía muscular y cambios fásicos en la actividad autonómica. El EEG es similar a la W, pero a nivel del EMG no se evidencia actividad, por la atonía muscular característica de esta etapa.

3.1 La vigilia y el sueño en la rata.

En las ratas, modelo animal utilizado en este trabajo, el ciclo sueño-W se caracteriza por ser policíclico, con ciclos ultradianos enmarcados en una periodicidad circadiana, donde el estado de W predomina en la fase de oscuridad.

Como se muestra en la Figura 5, el EEG durante la W se caracteriza por ondas de alta frecuencia y baja amplitud. La actividad theta (4.5- 9.0 Hz) correspondiente a la actividad oscilatoria del hipocampo, se observa a nivel de las cortezas posteriores durante la W (Núñez-Molina, 2004). El EMG presenta alta amplitud. En el sNREM se distinguen dos etapas. El LS o de transición entre la W y el sueño, evidenciado a nivel EEG por ondas de alto voltaje interrumpidas por actividad rápida de menor voltaje y mayor frecuencia. El SWS o sueño de ondas lentas caracterizado por ondas continuas de mayor amplitud y menor frecuencia, que van desde 1.0- 4.0 Hz; (banda delta), se intercalan con husos de sueño, caracterizados por una frecuencia de 9.5 -14.5 Hz (banda sigma), y reducción en la amplitud del EMG. En la etapa de transición SWS-sREM se observa un aumento de los husos de sueño. En el sREM predominan las ondas de baja amplitud y alta frecuencia, así como actividad theta que también es generada a nivel del hipocampo. El EMG no presenta actividad (atonía muscular), a excepción de sacudidas musculares espontáneas.

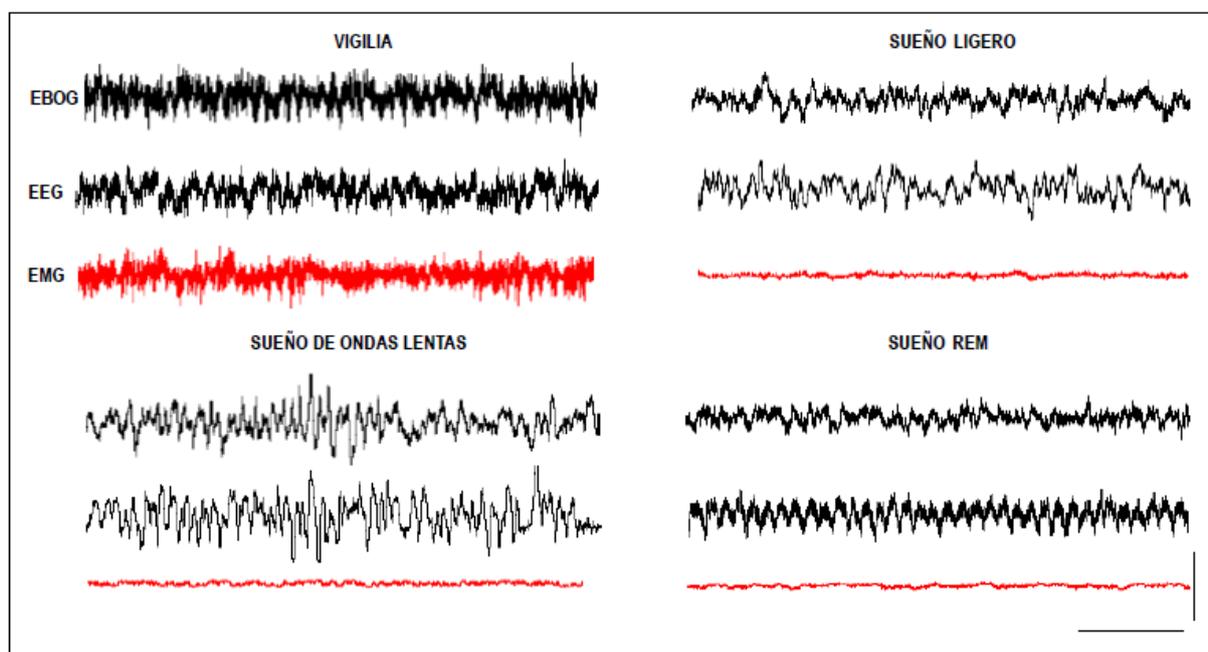


Figura 5. Registro polisomnográfico durante la vigilia y los estados de sueño de la rata. Durante la W en el EEG (corteza V1) se observan ondas de baja amplitud y alta frecuencia, acompañado de alta amplitud en el EMG. Durante el sueño ligero disminuye la actividad muscular (EMG), en el EEG se observan ondas de alta amplitud interrumpidas por ondas de amplitud menor y frecuencia mayor. En el sueño de ondas lentas hay menor actividad muscular y en el EEG se observan ondas lentas de alta amplitud. En el sREM se observan ondas de baja amplitud y alta frecuencia, así como el ritmo theta hipocampal en las cortezas posteriores. EEG: electroencefalograma; EMG: electromiograma; EBOG: electrograma del bulbo olfatorio; V1: visual primaria. Barras de calibración 1 seg y 400 μ v.

3.2 Potencia y coherencia en el EEG de la rata.

El estudio cuantitativo del EEG nos permite obtener información específica sobre la actividad bioeléctrica cerebral en condiciones fisiológicas, farmacológicas o patológicas. El análisis de la actividad eléctrica más utilizado es el análisis espectral. Esta técnica nos permite conocer mediante diferentes algoritmos matemáticos, el grado de activación de distintas áreas corticales involucradas en la generación de una actividad determinada y el grado de sincronización cortical existente entre distintas áreas corticales.

Mediante la función transformada rápida de Fourier, se puede descomponer una onda en sus componentes sinusoidales. El análisis espectral de EEG mediante esta aproximación, muestra que los componentes de frecuencia del EEG varían entre la W y el sueño. La potencia espectral es el cuadrado de la amplitud para cada componente de frecuencia. La coherencia espectral, permite cuantificar el grado de interacción funcional entre las áreas registradas. La coherencia entre distintas regiones corticales reflejaría la fuerza de las interconexiones funcionales mutuas, involucradas en la integración o “binding” de eventos neuronales separados espacialmente (Rieder et al., 2010; Castro et al., 2013). Dos ondas son coherentes a determinada frecuencia cuando tienen una relación de fase constante a esa frecuencia y la relación entre las amplitudes a esa frecuencia se mantiene constante (Bullock et al., 2003; Edelman and Tononi, 2000).

Clásicamente, los componentes de frecuencia del EEG de la rata se clasifican en las siguientes bandas: delta δ (1.0- 4.0 Hz), theta θ (4.5- 9.0 Hz), sigma σ (9.5- 14.5 Hz), beta β (15- 30 Hz) y gamma γ (30.5- 100 Hz) (Maloney y Jones, 1997; Buzsáki et al., 2013). La actividad mayor a los 100 Hz, se ha denominado Épsilon. Recientemente diferentes autores han denominado al intervalo de frecuencias entre 110-160 Hz como “High Frequency Oscillation, HFO” (Scheffzük et al., 2011; Tort et al., 2010; Tort et al., 2013).

En la Figura 6A se muestra un ejemplo del hipnograma, el EEG y la potencia espectral en el tiempo (espectrograma) durante los diferentes estados del ciclo sueño-W en la rata durante 3 horas de registro. Se observa al inicio del registro en el hipnograma un predominio del estado de W, representado en el espectrograma por actividad theta y gamma. El sNREM, se caracteriza por un aumento de las ondas lentas (banda δ) y de los picos de frecuencia sigma, correspondiente a los husos de sueño. El sREM es identificado por la actividad theta. En B se muestra el perfil de la potencia espectral en una ventana de 100 segundos para cada estado comportamental. Durante la W se observa una mayor potencia de las frecuencias más

altas (beta, gamma, high gamma y ϵ) en relación al sNREM y sREM. Durante el sueño sNREM aumenta la potencia de las frecuencias más bajas (principalmente de delta y sigma). Durante el sREM se observa un aumento en la banda theta y gamma.

Actualmente existen escasos estudios en ratas que caracterizan la coherencia inter e intrahemisférica para las diferentes bandas de frecuencia durante la W y el sueño. Experimentos recientes realizados en nuestro laboratorio en ratas y gatos han observado cambios entre los estados de sueño y W a nivel de la potencia y de la coherencia en la banda gamma de frecuencia. A nivel de la potencia se observó una disminución durante el sNREM y un aumento durante la W y el sREM. En cambio a nivel de la coherencia observamos un aumento durante la W y una disminución durante sNREM. La coherencia gamma se abole durante el sREM (Castro et al., 2014; Cavelli et al., 2015).

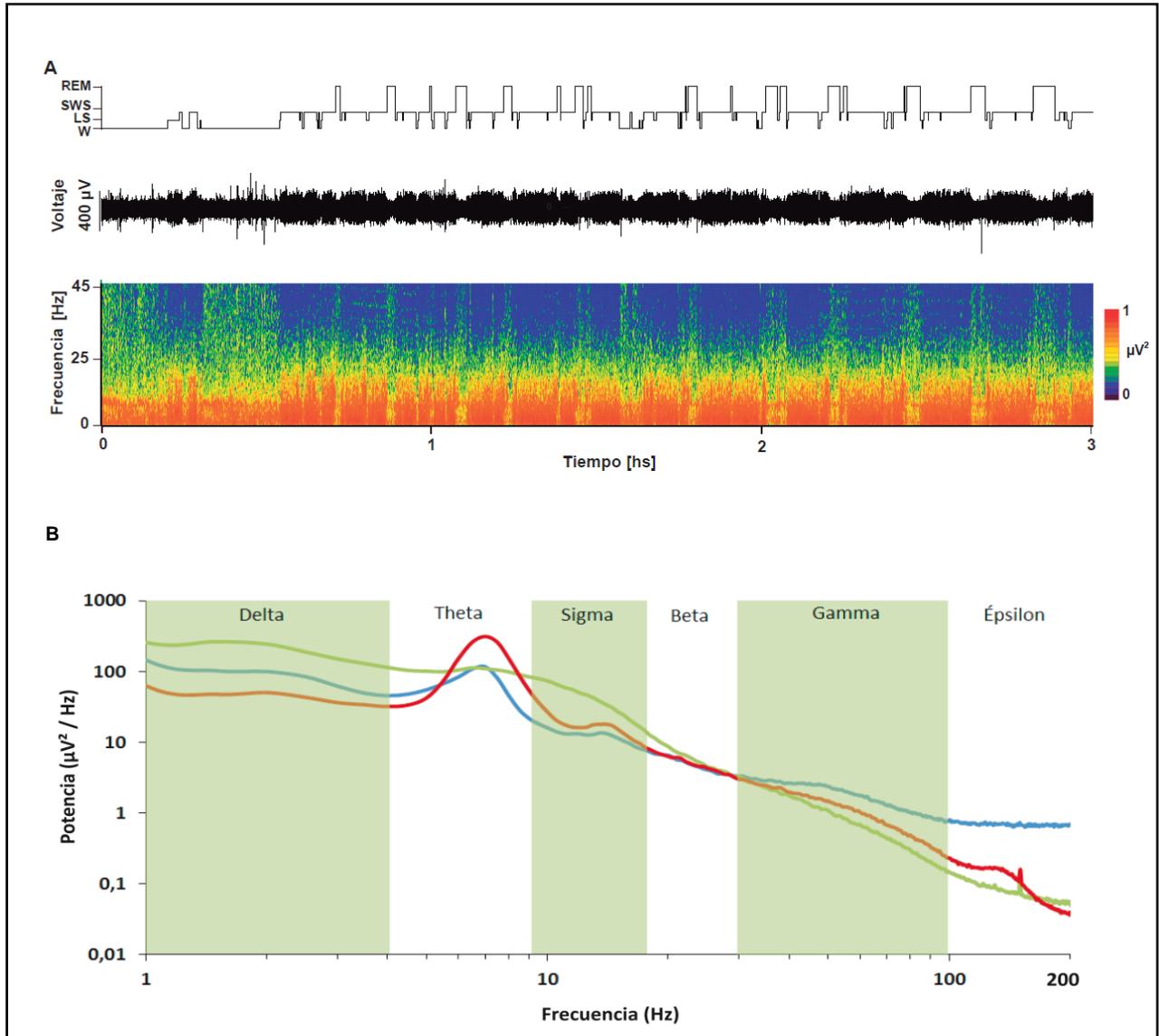


Figura 6. Perfil espectral de la potencia durante la vigilia y el sueño en la rata.

En **A** se muestra el hipnograma, el registro crudo del EEG (corteza S1) y el espectrograma durante 3 hs del registro. En **B** se grafica el promedio de 12 ventanas de 100 s de duración de la potencia espectral en función de la frecuencia (1-200 Hz), durante la W (azul), el sNREM (verde) y el sREM (rojo), con una resolución de frecuencia de 0,5 Hz. Alternando el color de fondos de la gráfica se delimitan las diferentes bandas de frecuencia. Delta (1-4 Hz); Theta (4.5-9 Hz); Sigma (9.5-14.5 Hz); Beta (15-30 Hz); Gamma (30.5-100 Hz); Épsilon (101- 200 Hz). EEG: electroencefalograma, S1: somatosensorial primaria

3.3 Efecto de cocaína y cafeína sobre la vigilia, el sueño y la actividad EEG.

Las alteraciones en el ciclo sueño-W son una característica común en personas que consumen CC, en condiciones agudas, crónicas y en la etapa de abstinencia (Margolin et al., 1996; Doktorgrades et al., 2007; Schierenbecket al., 2008; Angarita et al., 2014). Experimentos en ratas a diferentes dosis de CC (2.5, 5.0 y 10 mg/kg) han demostrado un aumento significativo en el estado de vigilia en forma dosis-

dependiente, acompañado por una disminución en el sueño NREM y un aumento en la latencia del sueño REM (Hill et al. 1977; Knapp et al., 2007).

La administración de CC en forma aguda o crónica, en humanos, genera un aumento en las potencias de alta frecuencia, principalmente en la banda β , y una disminución en las potencias de baja frecuencia durante la vigilia (Roemer et al 1995). Además, experimentos realizados en ratas con administración i.v. de CC a bajas dosis (1.5 y 3.0 mg/kg) han mostrado activación del EEG (corteza pre-frontal), dado por una reducción de la potencia delta, theta y un incremento en la banda beta con la dosis de 3 mg/ Kg. Este aumento en la potencia beta se correlacionó temporalmente con un aumento en los niveles extracelulares de noradrenalina a nivel de la corteza pre-frontal, medidos con microdiálisis (Chang et al., 1995; Ferger et al., 1996).

Por otra parte, ha sido ampliamente demostrado que la cafeína también inhibe la generación del sueño, aumentando la W y la actividad psicomotora (Lieberman et al, 1987; Nehlig, 1999). En humanos, disminuye el tiempo total de sueño y aumenta su latencia. También superficializa el sNREM aumentando la duración de la fase N2 del sueño (también llamado "sueño lento ligero") y disminuye la duración de N3 (o "sueño lento profundo"). Estudios electroencefalográficos en humanos han demostrado que el sueño es de menor calidad en las primeras 3- 4 h después de la ingestión de café; este tiempo correspondería al requerido para su metabolización a nivel hepático (Müller-Limmroth, 1972). La cafeína no interfiere en el tiempo total, ni en la duración de los episodios del sREM (Březinová, 1974; Roehrs et al., 2008). En ratas, administraciones sistémicas de 12.5- 25 mg/kg de cafeína disminuyen la duración total del sueño y aumentan la latencia al sueño REM (Radulovacki et al., 1980). A nivel EEG se conoce que la cafeína inyectada a nivel de la corteza pre-frontal al igual que los antagonistas de adenosina A1(compuestos que comparten el mecanismo de acción de cafeína) producen una disminución significativa de la potencia delta (Van Dort et al., 2009).

En base a los antecedentes presentados, y considerando que el ciclo sueño-vigilia es una de las alteraciones más frecuentes dentro del perfil clínico de los consumidores de PBC, hasta nuestro conocimiento, no existen estudios sobre el efecto agudo de la PBC sobre la W, el sueño y la actividad electroencefalográfica.

4. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta que: no hay estudios sobre los efectos de la PBC sobre el sueño y la actividad electroencefalográfica y que PBC induce un efecto motor estimulante agudo el cual se ve potenciado en aquellas muestras adulteradas con cafeína, elaboramos la siguiente hipótesis de trabajo: 1). PBC adulterada con cafeína producirá un aumento mayor en la W, en comparación con CC. 2) PBC generará un perfil electroencefalográfico distinto a la CC.

La realización de dicha tesis aportará información preclínica relevante sobre el efecto de la PBC en el SNC no explorados hasta el momento.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de PBC adulterada con cafeína, sobre el ciclo sueño-vigilia y la actividad electroencefalográfica en ratas adultas.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6.1 Estudiar el efecto de la PBC₁ (con bajo contenido en cocaína base y alto en cafeína) sobre el ciclo sueño-W. Comparar los resultados con cocaína pura a dosis equivalentes.

6.2 Comparar el efecto de la PBC₁ con su sucedáneo, CC + cafeína, a las proporciones que aparecen en la PBC₁ sobre el ciclo sueño-W, utilizando los controles cocaína y cafeína puras a dosis equivalentes.

6.3 Realizar un control de los efectos inducidos por la PBC₁ sobre el ciclo sueño-W utilizando otra muestra de PBC. PBC₂ (con alto contenido en cocaína base y bajo en cafeína) fue elegida y se comparó su efecto con cocaína pura a dosis equivalentes.

6.4 Estudiar el efecto de PBC₁ sobre la actividad electroencefalográfica (potencia y coherencia). Comparar los resultados con cocaína pura a dosis equivalentes.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Instalaciones

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Neurobiología del Sueño, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR.

Animales de experimentación

En relación a los 4 objetivos específicos se utilizaron 24 ratas macho (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar, entre 280-300 gr. Las ratas fueron alojadas individualmente en una caja de acrílico (60cm x 50cm x 45cm), con un ciclo de luz- oscuridad 12/12 h (luces encendidas a las 13:00 PM), temperatura (22 ± 1 °C), con alimento y agua *ad libitum*.

El protocolo experimental realizado ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (CEUA), expediente N° 071140001681- 09 y se realizó de acuerdo con la “Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio” (8va edición, National Academy Press, Washington DC 2010). Se realizó el mayor esfuerzo para minimizar el número, el dolor y el estrés de los animales durante la realización de los experimentos.

Drogas

Las muestras de PBC utilizadas fueron incautadas por la Policía, proporcionadas por el Instituto Técnico Forense, con la autorización del Ministerio de Salud Pública y en acuerdo con la Junta Nacional de Drogas. Las mismas fueron donadas por la Dra. Scorza, responsable de éste proyecto para la realización de los estudios de la Tesis. Las dos muestras ensayadas fueron analizadas en la Plataforma de Servicios analíticos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, bajo la responsabilidad del Dr. Andrés Abin Carriquiry y la asistencia técnica de la MSc. Marcela Martínez.

El contenido en cocaína base y cafeína de las muestras PBC₁ y PBC₂ seleccionadas (PBC 7 y 6, respectivamente denominadas en la Tabla 3) para éste estudio fue el siguiente: PBC₁: 20,7% de cocaína base y 10,3% de cafeína; PBC₂: 50,2% de cocaína base y 1% de cafeína. Para disolver la muestra de PBC se utilizó una solución de ácido clorhídrico al 2 % y agua destilada, y se llevó a un pH óptimo para su administración sistémica (pH= 6- 6,5) con hidróxido de sodio. CC y cafeína se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Alemania), y ambas fueron disueltas en salino (NaCl

0.9%). Las dosis de PBC, cocaína y cafeína utilizadas en este trabajo fueron elegidas de acuerdo a estudios comportamentales realizados anteriormente (López et al. 2011).

Procedimiento quirúrgico

Los procedimientos quirúrgicos realizados son similares a los utilizados previamente por nuestro grupo (Cavelli et al., 2015; Benedetto et al., 2013; Lagos et al., 2009). Los animales fueron implantados crónicamente con electrodos para monitorizar los estados de W y sueño. Previo al procedimiento quirúrgico, los animales fueron tratados con una dosis de antibióticos sistémicos (penicilina 50.000 U i.p). Se realizó anestesia general con ketamina- xilazina (90 mg/kg; 5 mg/kg i.p., respectivamente). La cabeza del animal fue colocada en el marco estereotáctico, con exposición del cráneo. Con el fin de registrar el EEG, los electrodos (2,5 cm de cable es soldado a un tornillo de acero inoxidable de 1mm diámetro) se atornillan en la bóveda craneal, sobre las cortezas somatosensorial primaria izquierda (S1I), visual primaria izquierda (V1I) y cerebelo, el cual se utilizó como referencia (Figuras 7 y 8). Un par de electrodos se insertaron en los músculos de la nuca a fin de registrar el EMG. Los electrodos se soldaron a un conector que se fijó al cráneo con acrílico dental. Finalizada la cirugía, se administró un analgésico c/24 horas por 48 horas (ketoprofeno, 1mg/Kg s.c.). Los márgenes de la incisión fueron mantenidos limpios y se le aplicó antibiótico tópico (neomicina) a nivel de la herida quirúrgica.

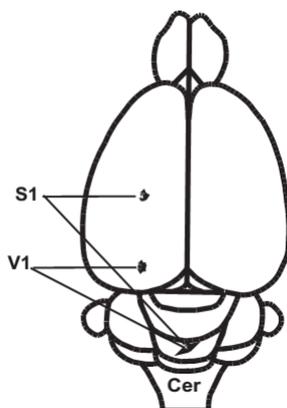


Figura 7. Posición de los electrodos de registro utilizada. En la figura se presenta un esquema del cerebro de la ratona con la posición de los electrodos de registro en la superficie de la corteza (Paxinos and Watson, 1982). Los electrodos activos se refieren a un electrodo común o indiferente posicionado sobre el cerebelo. Los electrodos corticales fueron colocados en el mismo hemisferio. S1: corteza somato sensorial primaria, V1: corteza visual primaria. Cer: cerebelo.

Habitación y sesiones experimentales de registros

Luego del procedimiento quirúrgico, se coloca el animal en una jaula de acrílico y se lo aloja en una caja de registro Faraday, atenuadora de sonidos, para su recuperación y habituación. Aproximadamente una semana después, el animal es conectado a un conector giratorio que permite registrarlo en condiciones de libre movimiento.

Se realizaron registros polisomnográficos, de la actividad simultánea de ambas áreas corticales con electrodos monopolares, y del EMG en forma bipolar. Se utilizó un electrodo indiferente común a las cortezas registradas, necesario para un correcto análisis de coherencia (Bullock et al., 1995; Núñez et al., 1997; Cantero et al., 2000). Las señales bioeléctricas fueron amplificadas ($\times 1000$), filtradas (0.1-200 hz), digitalizadas (512 hz, 2^{16} bits) y almacenadas en una PC utilizando el software Spike 2 de "Cambridge Electronic Design" (CED).

Las sesiones experimentales se realizaron durante 20 días aproximadamente. Cada registro duró 6 horas (entre las 17:00 a 23:00 horas, de la fase de luz), coincidente con la fase de sueño de las ratas. Una vez testeado el registro, al inicio de la sesión se realizaron las inyecciones de las distintas drogas o solución salina (control). Las dosis de las drogas fueron administradas de forma intercaladas con registros basales en todos los experimentos. El orden de administración de las drogas y el salino fueron balanceados (Figura 9).



Figura 8.1 Aparato esterotáxico. Permite localizar las cortezas a registrar mediante sistema de coordenadas tridimensional.

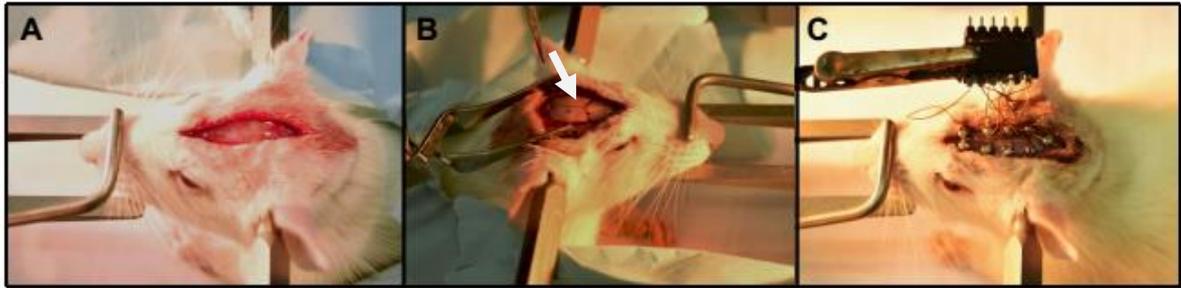


Figura 8.2 Cirugía estereotáctica. **A** exposición del cráneo; **B** ubicación de cortezas a registrar utilizando bregma como cero de referencia (flecha); **C** colocación de tornillos soldados a conector y posterior fijación al cráneo con acrílico dental.



Figura 8.3 Conexión del animal al sistema de registro y visualización en la computadora de los registros polisomnográficos.

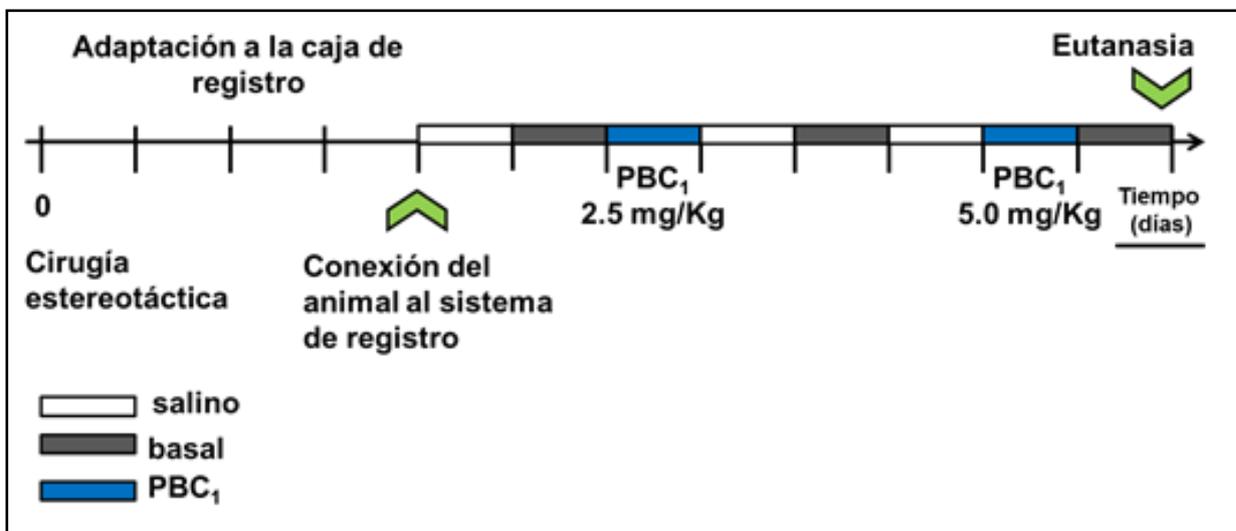


Figura 9. Diseño experimental representativo (Experimento 1A). Se destaca que la inyección de las drogas se realizó de forma alterna entre las diferentes dosis y se espaciaron como mínimo tres días. Cada animal recibió un máximo de tres drogas. Los registros fueron de 6 hs de duración durante la fase de luz. El registro se comienza luego de la inyección de la droga.

Grupos experimentales

Experimento 1. Se utilizaron 12 animales que se dividieron en dos grupos de 6 cada uno. Experimento 1A, fue tratado con la muestra PBC₁, a una dosis equivalente de cocaína base de 2.5 y 5 mg/kg (cada animal recibió ambas dosis). Experimento 1B, fue tratado con cocaína pura a la misma dosis. Los tratamientos controles se realizaron con salino.

Experimento 2. Se utilizaron 6 animales. Cada animal fue tratado con: cocaína a una dosis de 5 mg/kg; cafeína a una dosis de 2.5 mg/kg; y la combinación de cafeína a 2.5 mg/kg + CC 5 mg/kg (sucedáneo de la PBC1). La dosis de cafeína (2.5 mg/kg) fue calculada en base al contenido de cafeína en la muestra de PBC1.

Experimento 3. Se utilizaron 6 animales. Cada animal recibió PBC₂ a una dosis equivalente de cocaína base de 5 mg/kg y cocaína pura a una dosis de 5 mg/kg. Los tratamientos controles se realizaron con salino.

Análisis de los datos

La actividad polisomnográfica registrada en las 6 horas. se analizó en épocas de 10 segundos (Benedetto et al., 2013). En cada época se determinó cuál es el estado predominante: W, sNREM o sREM. El sNREM se clasificó en LS y SWS. También se analizó, el número de episodios para cada estado comportamental, la duración de cada episodio, así como la latencia al LS, SWS y sREM (medido desde el comienzo del registro).

Para analizar la actividad electroencefalográfica se utilizó el mismo procedimiento empleado en trabajos previos de nuestro grupo (Castro et al., 2013, 2014; Cavelli et al., 2015; Torterolo et al, 2016). Se examinaron por registro, 12 ventanas de 100 segundos libres de artefactos, dentro de los primeros 90 min de la W (donde observamos el mayor efecto de las drogas). Los registros se analizaron mediante las siguientes funciones matemáticas.

Coherencia: Para analizar la media de la coherencia entre pares de canales del EEG se utilizó el algoritmo matemático "*Magnitude Squared Coherence*". La coherencia se obtiene de la densidad espectral cruzada ("cross spectral density" o csd) entre las dos ondas normalizadas por el producto de la potencia de la densidad espectral ("power spectral density" o psd) de cada onda. De modo que la coherencia entre dos ondas a y b, a una frecuencia determinada (f) se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{coh}(f) = \frac{|\sum \text{csd}_{ab}(f)|^2}{\sum \text{psd}_a(f) \sum \text{psd}_b(f)}$$

Para obtener los valores de coherencia utilizamos el “script” de Spike 2, COHER 1S de CED. Este divide el periodo de tiempo (ventana de 100 segundos) analizado en 100 bloques de tiempo, con un tamaño de “bin” de 1024 muestras y una resolución de frecuencias de 0.5 Hz para una frecuencia de muestreo de 512 Hz. Los valores de coherencia fueron transformados a valores z' por medio de la transformación Z de Fisher. La coherencia se expresa en función de la frecuencia y varía de 0 para ondas totalmente incoherentes a 1 para ondas totalmente coherentes.

Potencia: la potencia, es el cuadrado de la amplitud del rango del espectro de la onda, que se obtiene por la transformada rápida de Fourier. Los valores se obtuvieron utilizando el “script” mencionado anteriormente.

Análisis estadístico

Los datos de W, sNREM y sREM en cada grupo experimental se evaluaron mediante la prueba de ANOVA de una vía pareada para el experimento 1A, 1B, 2 y 3 con el post hoc de Tukey. Cuando se comparó entre los distintos tratamientos realizados se utilizó las pruebas de ANOVA de una vía no pareada (comparación entre PBC₁, PBC₂ y CC) y también la prueba de T-test no pareada de dos colas (Comparación PBC₁, CC+ caf). Los valores de Coherencia-Z y de potencia frente a las diferentes drogas (experimento 1), también fueron evaluados por ANOVA de una vía (prueba no pareada) y el post-hoc de Tukey. Estos análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5. La hipótesis nula se rechazó con un $p < 0.05$. Los valores se expresan como la media \pm error estándar (EEM).

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de la PBC₁ sobre la vigilia y el sueño.

En el hipnograma (Figura 10) se muestra en un animal representativo, el efecto de la PBC₁ sobre la W y el sueño. Con la dosis equivalente en cocaína base de 2.5 mg/kg se observó un aumento en el tiempo de W post-inyección, así como en la latencia al sREM. Con la dosis de 5 mg/kg se destaca que hubo un mayor aumento en la W durante la primera hora post-inyección, así como una marcada disminución de los episodios de SWS en las primeras 3 horas de registro. En relación a la dosis de 2.5 mg/kg y al salino la latencia al LS fue mayor. Con la dosis de 5 mg/kg la latencia al sREM aumentó, en relación a la dosis menor.

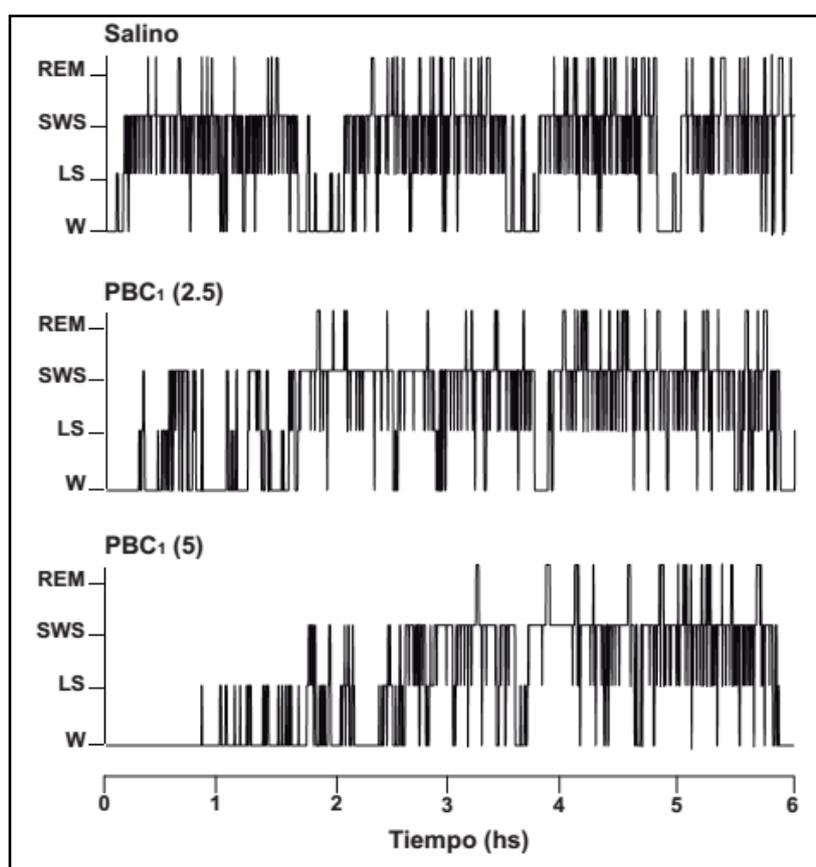


Figura 10. Hipnogramas durante las 6 hs de registro, de un animal representativo tratado con salino y PBC₁ a 2.5 y 5 mg/kg.

En la Tabla 2, se muestran los resultados de este grupo experimental para las 6 horas de registro. Se observó un aumento significativo de la W a la dosis mayor, en comparación con la dosis de 2.5 mg/kg y al salino. Este efecto se relaciona con un aumento en la duración de los episodios de W. El sNREM disminuyó a expensas de cambios en el LS y en el SWS. Se observa, una

tendencia a la caída en el tiempo total de LS ($p < 0.08$, $F=3.5$) y un aumento significativo en su latencia, en relación al salino y a la dosis de 2.5 mg/kg. También, se evidenció una disminución significativa en el tiempo total de SWS con la dosis de 5 mg/kg y un aumento en su latencia. Además, disminuyó significativamente el número de episodios de SWS. Por último, la PBC₁ (5 mg/kg) produjo un aumento significativo en la latencia al sREM, tanto en relación a la menor dosis como al salino.

Tabla 2. Efecto de la PBC ₁ sobre la vigilia y el sueño durante las 6 hs de registro				
	Salino	PBC₁ (2.5)	PBC₁ (5.0)	F (2, 10)
Vigilia				
Tiempo (min)	117 ± 7.6	117 ± 6 ⁺⁺	168 ± 13 ^{**}	10.8
Nº de episodios	88 ± 60	63 ± 47	52 ± 147	0.7
Duración de los episodios (min)	1.3 ± 0.3	1.8 ± 0,4	3.0 ± 0.9 [*]	4.0
Sueño Ligero (LS)				
Tiempo (min)	42.7 ± 5.0	43.5 ± 4.0	25 ± 6.7	3.5
Nº de episodios	148 ± 32	162 ± 25	101 ± 43	1.3
Duración de los episodios (min)	0.27 ± 0.3	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.01	1.4
Latencia (min)	13.2 ± 3.8	27.1 ± 6.0 ⁺⁺	70 ± 13 ^{**}	9.9
Sueño de Ondas Lentas (SWS)				
Tiempo (min)	178.5 ± 7.1	177 ± 6.0 ⁺⁺	140 ± 6.8 ^{**}	7.9
Nº de episodios	167 ± 140	160 ± 81	95 ± 140 [*]	0.9
Duración de los episodios (min)	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.23	1.2 ± 24.6	0.9
Latencia (min)	17.8 ± 4.3	54 ± 14	95 ± 15 [*]	7.7
Sueño NREM (LS+ SWS)				
Tiempo (min)	219.5 ± 10	202 ± 3.0	201 ± 10 [*]	10.9
Sueño REM				
Tiempo (min)	31.3 ± 1.8	26.3 ± 3.0	20.1 ± 4.1	1.5
Nº de episodios	57 ± 33	40.6 ± 18.7	35.8 ± 16	1.3
Duración de los episodios (min)	1.0 ± 0.2	1.10 ± 0.23	1.1 ± 0.26	0.4
Latencia (min)	56.0 ± 4.6	97.2 ± 9.0 ⁺⁺	165 ± 23 ^{***}	39.6

Los grados de libertad son 2 (entre grupo) y 10 (en cada grupo) de todos los datos analizados. Los tratamientos son salino y PBC₁ a 2.5 y 5 mg/kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs. Inyección de salino; + = vs droga. *, + $p < 0,05$, **, ++ $p < 0.01$. N= 6.

En la Figura 11, se observa el análisis por hora de los registros, luego de la administración de PBC₁. En la misma se muestra que los animales tratados con PBC₁ a la dosis de 5 mg/kg presentaron un aumento en la W durante las primeras 3 hs del registro en comparación con su salino. La dosis de 2.5 mg/kg en relación al salino, aumentó la W únicamente en la primera hora y mostró un descenso significativo en la segunda y tercera hora con respecto la dosis mayor. Este aumento en la W se acompañó de una disminución del LS y el SWS en la primera hora y segunda hora del registro (para el SWS) con la mayor dosis, en comparación con el salino. La dosis menor disminuye únicamente la primera hora del SWS. El sREM disminuyó en la primera hora del registro con ambas dosis en relación al salino.

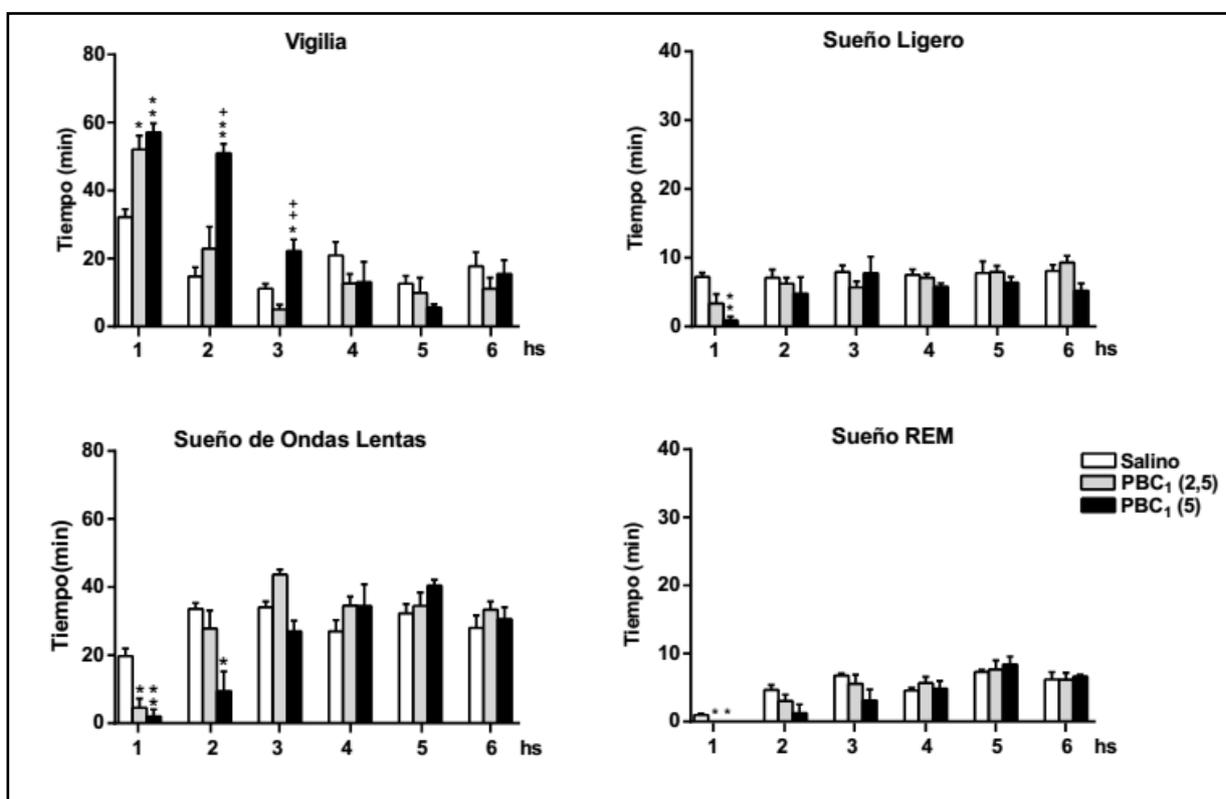


Figura 11. Efecto de las diferentes dosis de PBC₁ sobre la vigilia y el sueño. Análisis hora por hora de las 6 hs. de registro luego de la inyección i.p. Las dosis están en mg/kg. Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs. cada grupo control; † = vs droga. *, † p < 0.05, **, †† p < 0.01. N = 6.

8.2 Efecto de la cocaína sobre la vigilia y el sueño.

Se evaluó el efecto sistémico agudo de CC a las dosis de 2.5 y 5 mg/kg sobre la W y el sueño.

En la Figura 12, se ilustra un hipnograma representativo de un animal tratado con CC durante las 6 hs del registro polisomnigráfico. En el hipnograma no se observó diferencia entre el salino y la dosis de 2.5 mg/kg. Sin embargo, con la dosis de 5 mg/kg

se observa en relación a la dosis de 2.5 mg/kg y al salino, un aumento del tiempo que permanece en W durante los primeros 30 min, acompañado de un aumento en la latencia al sNREM.

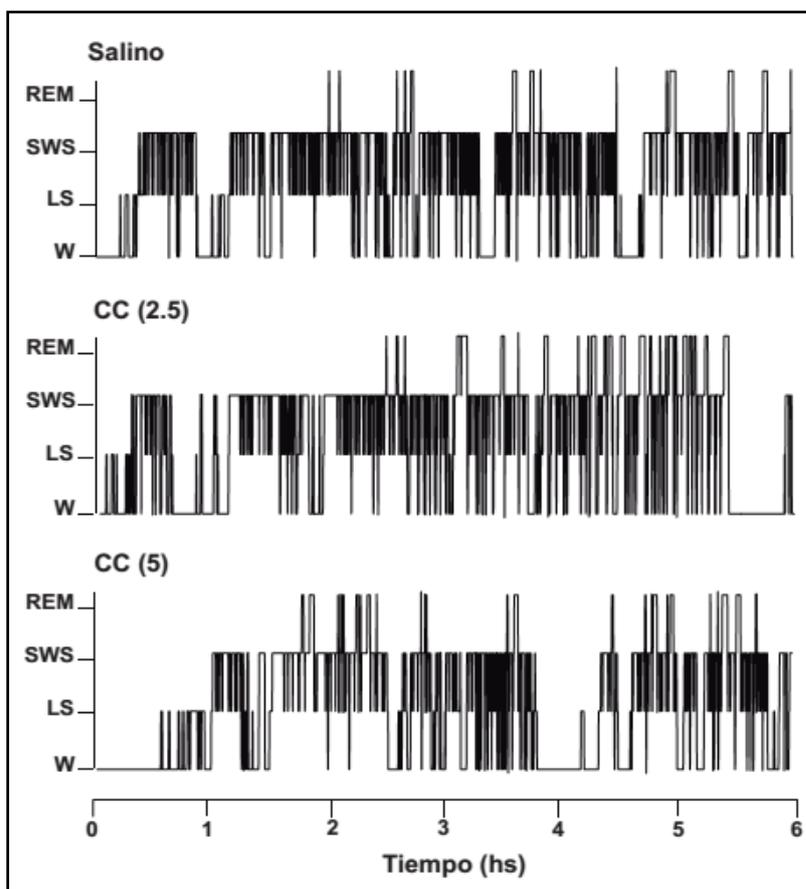


Figura 12. Hipnogramas durante las 6 hs de registro, de un animal representativo tratado con salino y CC a 2.5 y 5 mg/kg. CC= cocaína.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en las 6 hs de registro de todo el grupo. La administración de CC a la dosis de 5 mg/kg produjo una disminución significativa del sNREM en relación al salino y un aumento de la latencia al SWS entre ambas dosis y respecto al salino.

Tabla 3. Efecto de la cocaína sobre la vigilia y el sueño durante las 6 hs de registro

	Salino	CC (2.5)	CC (5.0)	F (2, 10)
Vigilia				
Tiempo (min)	113 ± 10	128 ± 5.3	132.8 ± 13	4.9
Nº de episodios	73.5 ± 9.0	56 ± 115	66 ± 143	0.9
Duración de los episodios (min)	2.01 ± 0.3	2.0 ± 0.6	2.52 ± 0.6	1.3
Sueño Ligero (LS)				
Tiempo (min)	37.8 ± 6.0	38.8 ± 6	37.3 ± 6.0	0.1
Nº de episodios	137.5 ± 20	156 ± 32	109 ± 48	0.2
Duración de los episodios (min)	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.2	0.26 ± 0.04	0.6
Latencia (min)	19.8 ± 4.7	31.0 ± 9.7	40.2 ± 2.1	3.9
Sueño de Ondas Lentas (SWS)				
Tiempo (min)	178 ± 7.1	168 ± 6	145 ± 12	12.5
Nº de episodios	130 ± 16	136 ± 14	119 ± 150	0.7
Duración de los episodios (min)	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.38	1.2 ± 0.27	0.3
Latencia (min)	20 ± 4.7	31.3 ± 9.7 ⁺⁺	71.2 ± 10 ^{**}	20.7
Sueño NREM (LS+ SWS)				
Tiempo (min)	216.3 ± 6.8	206.6 ± 7.8	172 ± 11 [*]	9.1
Sueño REM				
Tiempo (min)	31.3 ± 2.2	34 ± 3.0	31.6 ± 6.1	0.2
Nº de episodios	23 ± 1.4	28 ± 36	27 ± 23	1.1
Duración de los episodios (min)	1.2 ± 0.06	1.04 ± 0.20	1.1 ± 0.25	0.4
Latencia (min)	83.0 ± 3.8	119 ± 8.0	108 ± 14	3.0

Los grados de libertad son 2 (entre grupo) y 10 (en cada grupo) de todos los datos analizados. Los tratamientos son salino y CC a 2.5 y 5 mg/Kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs. salino; + = vs droga. *, + p < 0,05, **, ++ p < 0.01. N = 6

Cuando se analiza el registro hora por hora en los animales tratados con CC se observó un incremento significativo de la W en la primer hora del registro en relación al salino. También el SWS y el sREM disminuyeron significativamente durante la primera hora bajo el tratamiento con ambas dosis de CC (Figura 13).

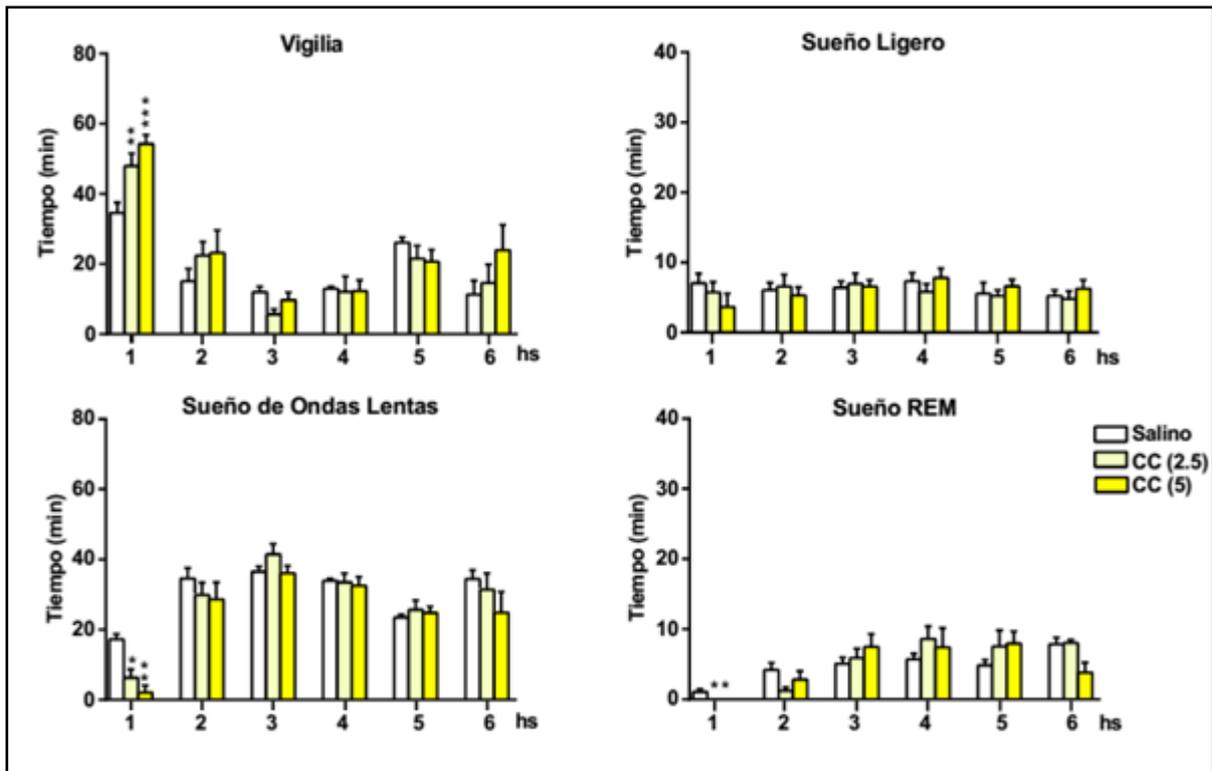


Figura 13. Efecto de las diferentes dosis de cocaína sobre la vigilia y el sueño. Análisis hora por hora de las 6 hs. de registro luego de la inyección i.p. Las dosis son en mg/kg. Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs. control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. N= 6. CC= cocaína.

8.3 Efecto del sucedáneo de PBC₁ sobre la vigilia y el sueño.

Para confirmar el rol preponderante de la cafeína en la PBC, se realizó una segunda serie experimental. Con este objetivo se utilizaron 6 animales. Cada animal se trató con cafeína a 2.5 mg/kg, CC a 5 mg/kg y la combinación de ambas drogas (sucedáneo de PBC₁). Los componentes del sucedáneo utilizados son proporcionales a los porcentajes de CC y cafeína detectados en la muestra de PBC₁.

En la Figura 14, se ilustran hipnogramas de un animal representativo tratado con salino y las drogas ensayadas durante las 6 hs de registro. Se observa en relación al salino un aumento en la W bajo los tratamientos con CC y cafeína. Pero el efecto es mayor cuando se combinan ambas drogas. A nivel de las latencias al sNREM y sREM, en comparación con el salino, se observa un perfil de acción similar entre la CC y la cafeína. Sin embargo el aumento sobre las latencias es más robusto cuando se administra CC + cafeína.

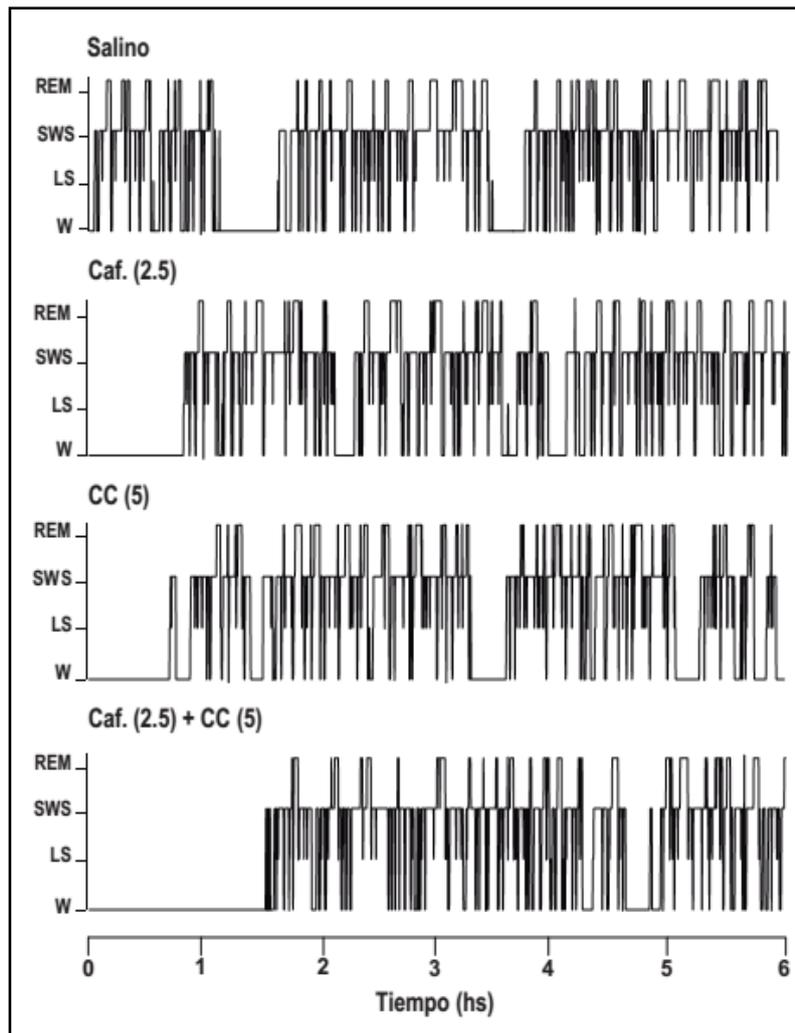


Figura 14. Hipnogramas durante las 6 hs de registro, de un animal representativo tratado con: caf a 2.5 mg/kg, CC a 5 mg/kg, CC + caf a 5 y 2.5 mg/kg. caf: cafeína

En la Tabla 4, se muestra la duración de cada estado comportamental para cada uno de los tratamientos realizados. La administración de CC + cafeína generó un aumento significativo en el tiempo total de W en relación al salino. También, se observó un aumento en la latencia al LS. El tiempo total de sNREM, presentó una disminución significativa con los tres tratamientos administrados en relación al salino. De la Tabla se puede extraer que la disminución en el sNREM es a expensas del SWS. La administración de CC y de CC + cafeína generó un aumento significativo en la latencia al SWS. Además, la combinación de ambas drogas también mostró un efecto mayor sobre la latencia al sREM, tanto en relación a la administración de salino como de cafeína.

Tabla 4. Efecto de caf, CC y CC + caf sobre la vigilia y el sueño durante las 6 hs de registro.

	Salino	caf (2.5)	CC (5.0)	CC + caf	F
Vigilia					(3, 15)
Tiempo (min)	82.2 ± 2.7	125.6 ± 10	134 ± 13	147 ± 19*	4.7
Nº de episodios	48.6 ± 6.7	54 ± 7.0	55 ± 6.8	54 ± 5.7	0.2
Duración de los episodios (min)	0.84 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.2
Sueño Ligero (LS)					
Tiempo (min)	26.1 ± 2.6	25.1 ± 4.1	25.7 ± 7.0	26.1 ± 3.9	0.08
Nº de episodios	90 ± 10	100 ± 17	103 ± 13	100 ± 16	0.33
Duración de los episodios (min)	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.2 ± 0.01	0.3
Latencia (min)	7.8 ± 1.7	43.4 ± 8.8*	48.8 ± 8.8*	67.0 ± 8.0***	9.3
Sueño de Ondas Lentas (SWS)					
Tiempo (min)	195.5 ± 4.0	149.4 ± 8.0*	150 ± 12*	141 ± 14**	6.5
Nº de episodios	103 ± 9.0	113 ± 13	114 ± 10	108 ± 14	0.7
Duración de los episodios (min)	2.1 ± 0.5	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.6
Latencia (min)	10.7 ± 2.0	48.1 ± 7.0	53.4 ± 8.0*	82.2 ± 15**	10.0
Sueño NREM (LS+ SWS)					
Tiempo (min)	228 ± 15	129 ± 11*	126 ± 13*	98 ± 15**	6.4
Sueño REM					
Tiempo (min)	53.4 ± 5.7	58 ± 5.5	49.2 ± 3.4	46.3 ± 7.3	1.6
Nº de episodios	38 ± 3.0	36.5 ± 4.0	37 ± 3.9	33.0 ± 3.3	0.3
Duración de los episodios (min)	1.4 ± 0.09	1.6 ± 0.08	1.4 ± 0.11	1.3 ± 0.1	2.3
Latencia (min)	33.1 ± 11	56 ± 6.0 ⁺	75 ± 8.0	108.1 ± 14**	8.5

Los grados de libertad son 3 (entre grupo) y 15 (en cada grupo) de todos los datos analizados. Las diferentes dosis están en mg/Kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs. salino; ⁺ = vs. CC + caf. *, ⁺ p < 0,05; ** p < 0.01. caf= cafeína. N = 6.

En la Figura 15, se observa el análisis hora por hora para cada estado comportamental. En la gráfica correspondiente a la W, se observó un aumento significativo durante la primera hora bajo los tres tratamientos farmacológicos en relación al salino. Este incremento en la vigilia se mantiene durante la segunda hora con la administración de CC + cafeína. La combinación de ambas drogas disminuyó el LS durante la primera hora. El SWS y el sREM presentaron en relación al salino una disminución durante la primera hora con los tratamiento de CC y CC + cafeína; éste último también disminuyó significativamente el SWS durante la segunda hora.

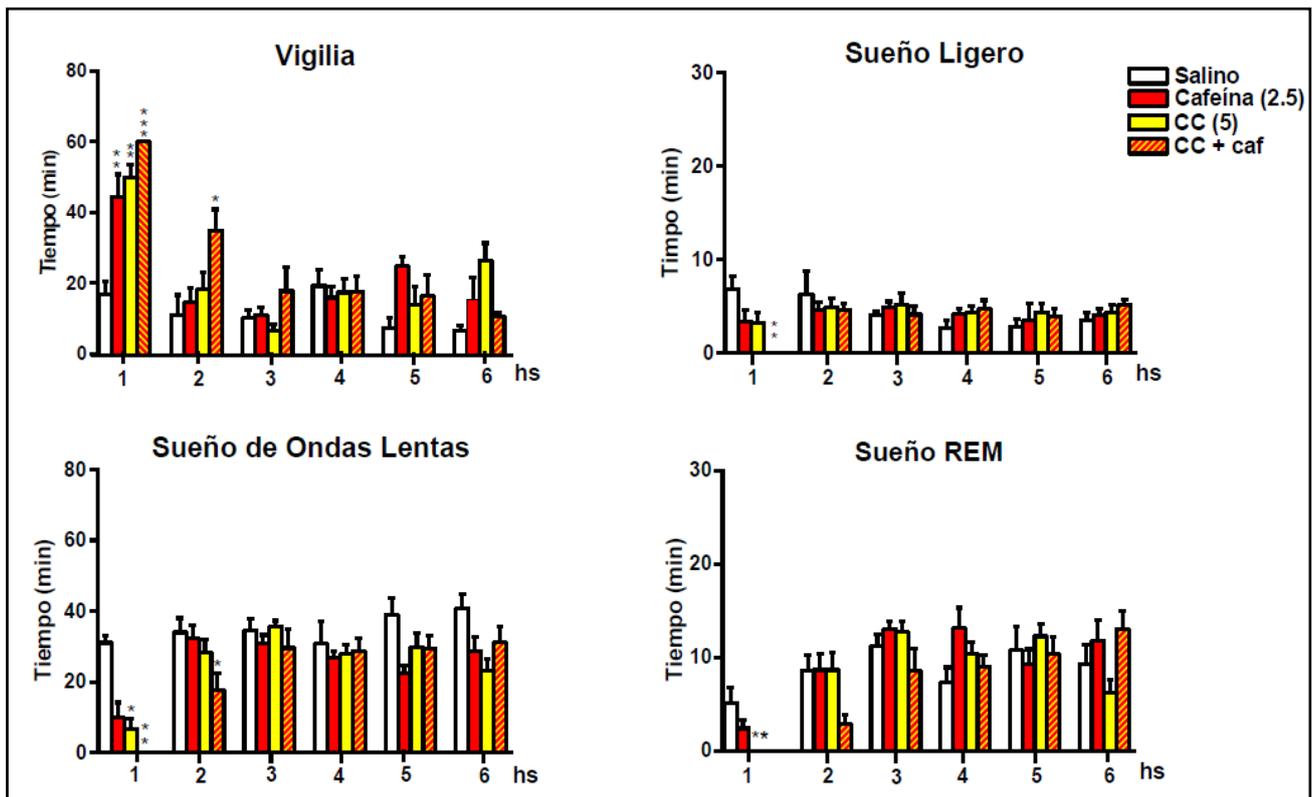


Figura 15. Efecto de caf, CC y CC + caf sobre la vigilia y el sueño. Análisis hora por hora de las 6 hs. de registro luego de inyecciones i.p. Las dosis están en mg/kg. Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs. control. * p < 0.05; **p < 0.01. caf: cafeína, N = 6.

8.3.1 Efectos similares entre PBC₁ y su sucedáneo (CC + cafeína).

En el presente análisis se comparan los efectos de la PBC₁ (Experimento 1A) con los resultados obtenidos con CC + cafeína (Experimento 2).

Como se ilustra en la Figura 16, los animales tratados con PBC₁ no presentaron diferencias significativas en el tiempo total de registro en ninguno de los estados comportamentales en comparación con su sucedáneo. Tampoco observamos diferencias significativas entre las latencias al SL, SWS y sREM.

El análisis estadístico realizado con la prueba de T- test no pareado de dos vías durante las primeras 2 hs de registro tampoco mostró diferencias significativas entre PBC₁ y la combinación CC + cafeína en ninguno de los estados comportamentales. Los valores de W fueron muy similares entre ambos grupos (103 \pm 8.5 vs 95 \pm 6 min). El LS presentó una duración de 5.0 \pm 2.3 con PBC1 vs 4.8 \pm 0.76 min con CC + caf. El tiempo de SWS no presentó diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (12 \pm 6 vs 18 \pm 5 min). No se observó diferencia en la duración del sREM entre ambos tratamientos (1 \pm 1 vs 3 \pm 1 min).

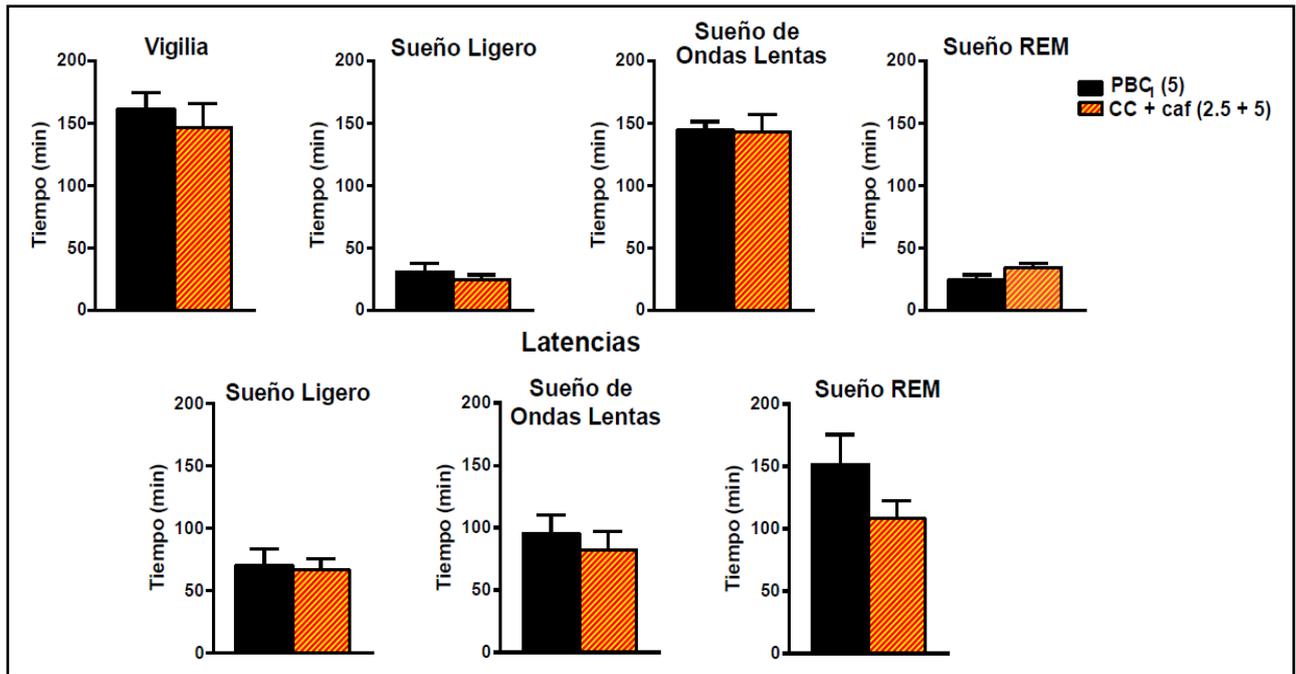


Figura 16. Comparación del efecto entre PBC₁ y CC + caf durante la vigilia y el sueño durante las 6hs de registro. Las dosis están en mg/kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. T-test no-pareado de dos colas. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. caf = cafeína. N = 6 en cada grupo experimental.

8.4 Efecto de la PBC₂ sobre la vigila y el sueño.

Interesados en el aumento significativo de la W provocado por PBC₁ y su sucedáneo (CC + caf), se buscó descartar el efecto de otros posibles compuestos no detectados en la muestras de PBC₁ que pudieran explicar los resultados obtenidos. Con este fin, se estudió el efecto de PBC₂ (con niveles muy bajos de cafeína), y se comparó con la CC a dosis equimolar. La dosis utilizada de PBC₂ equivalente en cocaína base fue de 5 mg/kg.

En la Figura 17, se observan los hipnogramas obtenidos en las 6 hs de registro de un animal tratado con CC y PBC₂. Ambas drogas muestran perfiles muy similares. Los tratamientos con las drogas generan un incremento en la W durante los primeros 90 min en comparación con el salino. Además, CC y PBC₂ en relación al salino disminuyen los episodios del sREM en la primera mitad del registro y aumentan su latencia.

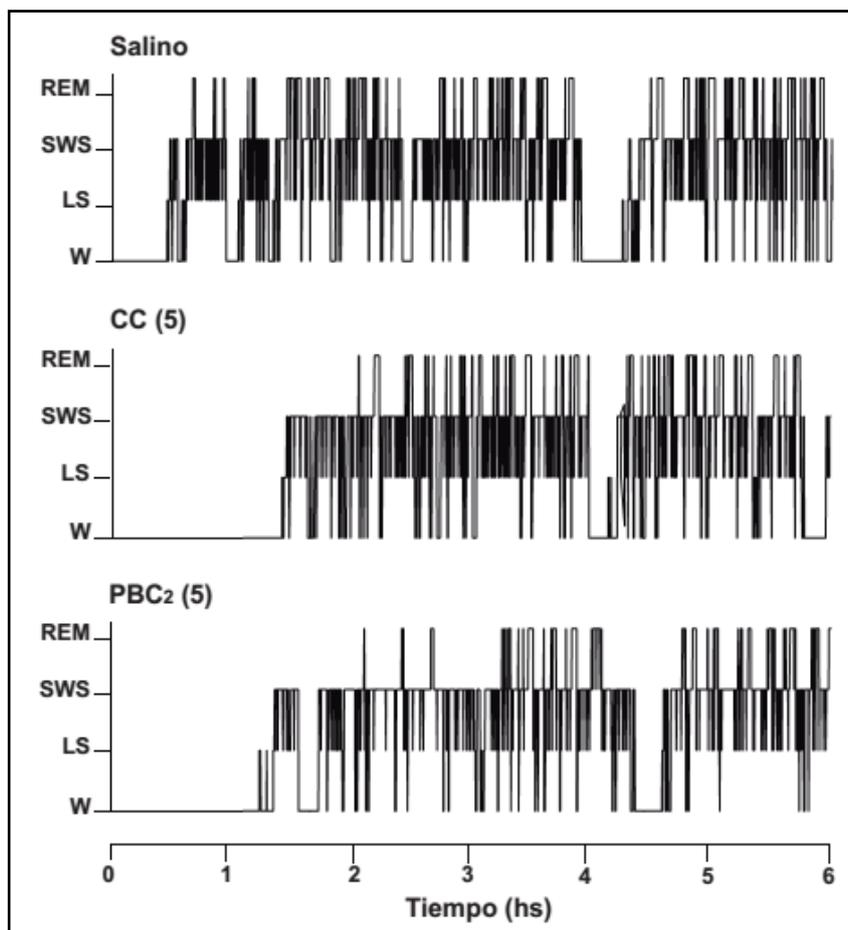


Figura 17. Hipnogramas durante las 6 hs de registro, de un animal representativo tratado con salino, CC y PBC₂ a 5 mg/ kg. CC= cocaína.

En la Tabla 5, se muestran los distintos estados comportamentales y sus respectivas latencias al sueño durante las 6 hr de registro. En relación al tiempo total de W, se observó un aumento significativo con la administración de CC, a expensas de un aumento en la duración de los episodios. También, en relación al salino la duración de los episodios con PBC₂ fue mayor, pero el número de episodios fue significativamente menor. Las latencias al LS y SWS aumentaron con la inyección de CC y PBC₂ en relación al salino. Aunque la latencia al sREM fue superior al salino con ambas drogas, solo con CC el aumento fue significativo. Solamente se encontró diferencia entre ambas drogas en el número de episodios de W en relación al salino.

Tabla 5. Efecto de CC y PBC₂ sobre la vigilia y el sueño durante las 6 hs de registro

	Salino	CC (5)	PBC ₂ (5)	F (2, 10)
Vigilia				
Tiempo (min)	89.8 ± 6.0	113.3 ± 7.0*	100.8 ± 6.0	5.4
Nº de episodios	59 ± 6.0	54 ± 4.0 ⁺	44 ± 4.0*	4.2
Duración de los episodios (min)	1.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1*	2.4 ± 0.2*	9.8
Sueño Ligerero (LS)				
Tiempo (min)	45.3 ± 6.0	49.1 ± 7.0	38.1 ± 1.8	1.1
Nº de episodios	163 ± 15	175 ± 15	156 ± 7.0	2.2
Duración de los episodios (min)	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.01	1.9
Latencia (min)	10.3 ± 3.8	41.3 ± 12*	38.7 ± 10*	5.9
Sueño de Ondas Lentas (SWS)				
Tiempo (min)	183.6 ± 11	162.6 ± 7.8	182.6 ± 3.7	3.5
Nº de episodios	179 ± 13	158 ± 7.0	144 ± 6.0	1.8
Duración de los episodios (min)	1.1 ± 0.01	0.96 ± 0.09	1.2 ± 0.06	2.7
Latencia (min)	18 ± 4.0	61 ± 9.7**	46.3 ± 10*	15.8
Sueño NREM (LS+ SWS)				
Tiempo (min)	225 ± 7.0	211 ± 7.0	221 ± 4.0	3.2
Sueño REM				
Tiempo (min)	41.2 ± 5.0	38.4 ± 4.0	34.9 ± 4.6	1.1
Nº de episodios	36,7 ± 6.0	28.5 ± 6.0	34 ± 5.0	19
Duración de los episodios (min)	1.2 ± 0.01	1.4 ± 0.01	1.1 ± 0.01	1.6
Latencia (min)	49.5 ± 6.6	107 ± 8.9**	84.8 ± 10*	16.3

Los grados de libertad son 2 (entre grupo) y 10 (en cada grupo) de todos los datos analizados. Los tratamientos son salino, CC y PBC₂ a 5 mg/kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs. salino, ⁺ = vs. droga. *, ⁺ p < 0,05; **, p < 0.01; p < 0.001 N = 6.

En la Figura 18, se muestra el análisis del tiempo total del registro en intervalos de hora por hora. Comparado con el salino, el tiempo de W aumentó durante la primera y segunda hora con la administración de CC y en la primera hora con PBC₂. El SWS y el sREM disminuyeron durante la primera hora con la administración de CC y PBC₂. Cabe destacar que, en el análisis hora por hora no se encontraron diferencias significativas entre las drogas en ninguno de los estados comportamentales.

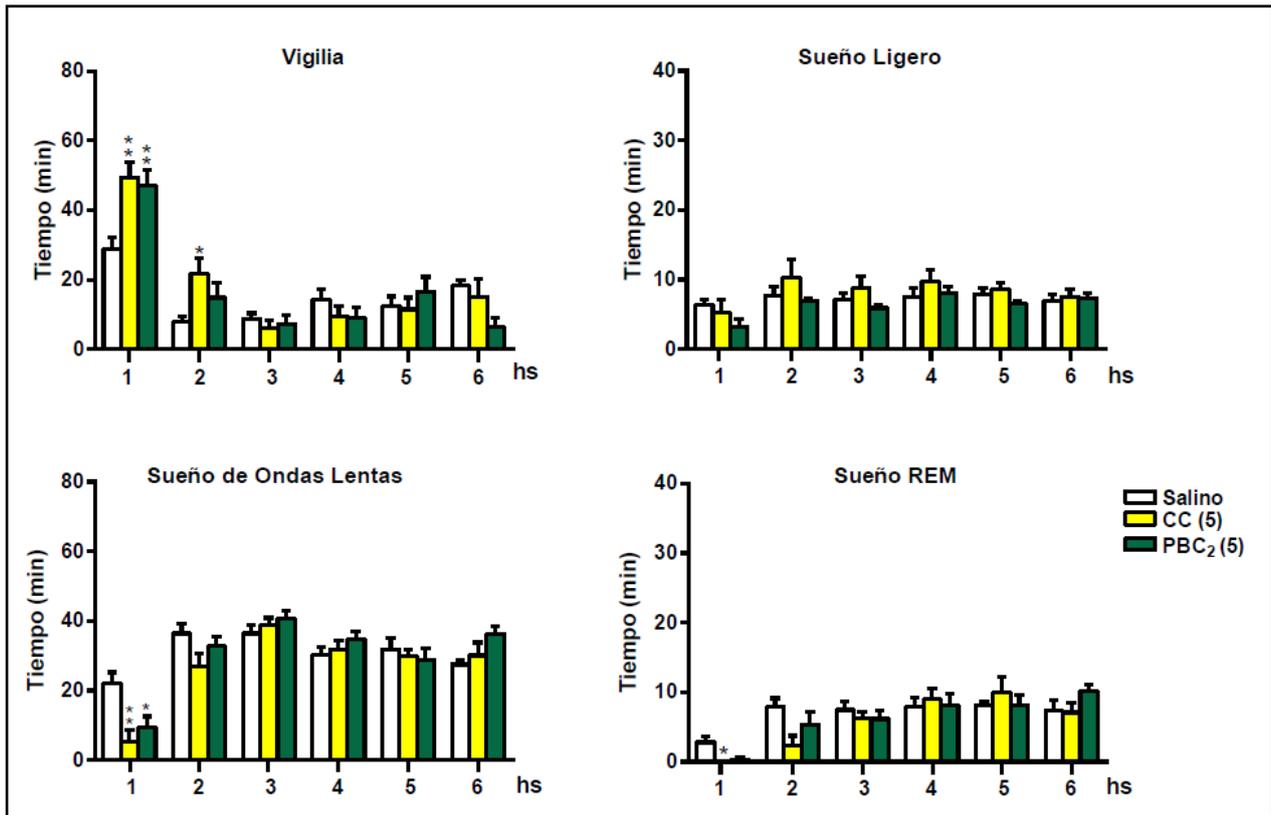


Figura 18. Efecto de CC y PBC₂ sobre los diferentes estados del ciclo sueño- vigilia. Análisis hora por hora de las 6 hs de registro luego de la inyección i.p. Las dosis están en mg/kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. *= vs control. *p < 0.05; **p < 0.01; N = 6.

8.5 Comparación del efecto de la PBC₁ con sus dos controles: PBC₂ y CC.

Con el objetivo de demostrar los distintos perfiles de acción de las muestras de PBC utilizadas, hicimos la comparación entre PBC₁ (con cafeína), PBC₂ (con niveles bajos de cafeína) y CC a la dosis equivalente en cocaína base de 5 mg/ kg.

En la Figura 20, se muestra el análisis hora por hora de los tres grupos experimentales tratados con PBC₁, PBC₂ y CC. En los animales tratados con PBC₁ se observó un aumento en la W que se mantuvo durante la segunda y la tercera hora en relación a la PBC₂ y a la CC. La PBC₁ también disminuyó el SWS en la segunda hora en comparación con PBC₂ y CC. Asimismo, se observó un aumento significativo del SWS en la quinta hora en el grupo tratado con PBC₁ en comparación con los animales tratados con PBC₂ y CC. Por último, no se observaron cambios significativos a nivel del sREM.

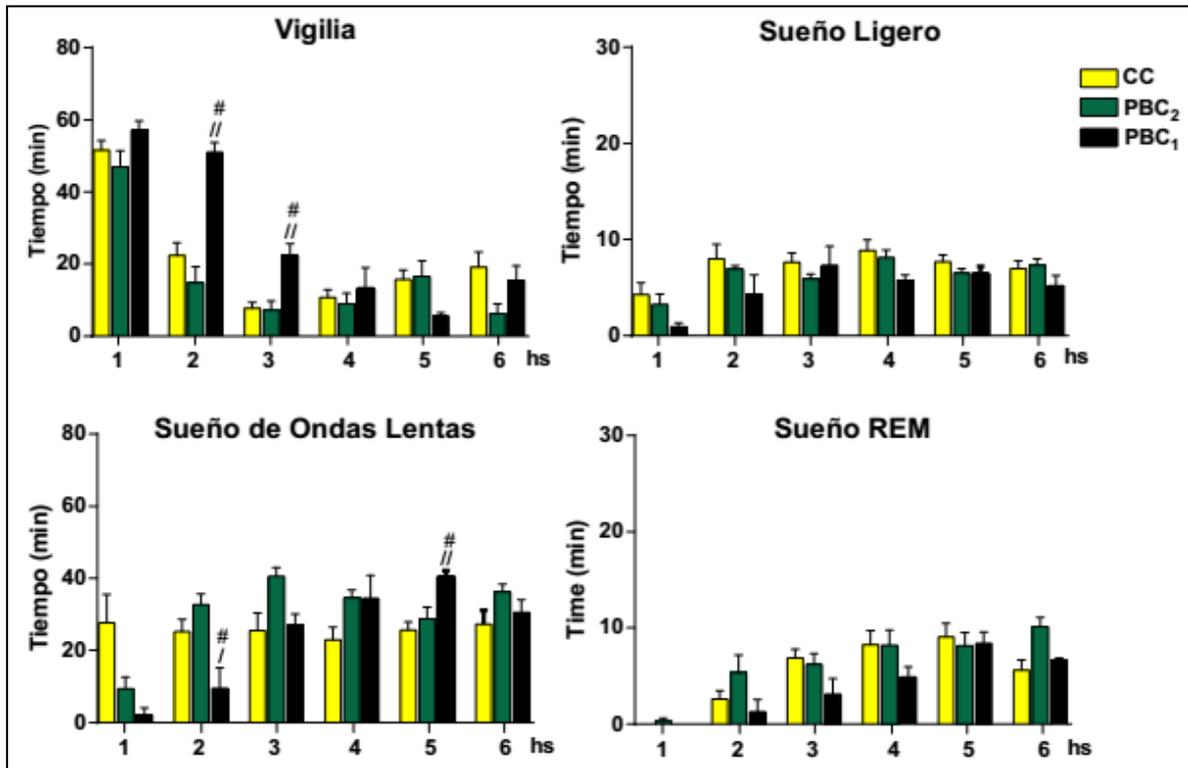


Figura 20. Comparación del efecto entre CC, PBC₂ y PBC₁ sobre los diferentes estados del ciclo sueño- vigilia. Análisis hora por hora de las 6 hs de registro luego de la inyección i.p. Las dosis están en mg/kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. # = PBC₁ vs CC, p < 0.01; / = PBC₁ vs PBC₂ p < 0.05, // p < 0.01; N = 6 por cada grupo experimental de PBC y N = 12 para el grupo de CC.

En relación a las latencias al sueño en la Figura 21 se muestran los resultados. El test de ANOVA (de una vía) no muestra diferencias significativas en la latencia al SL entre las drogas ensayadas. La latencia al SWS fue mayor en los animales tratados con PBC₁ en relación a la PBC₂. Por último la latencia al sREM aumentó significativamente con la administración de PBC₁ en comparación con la PBC₂, y se observó una tendencia entre la PBC₁ y la CC.

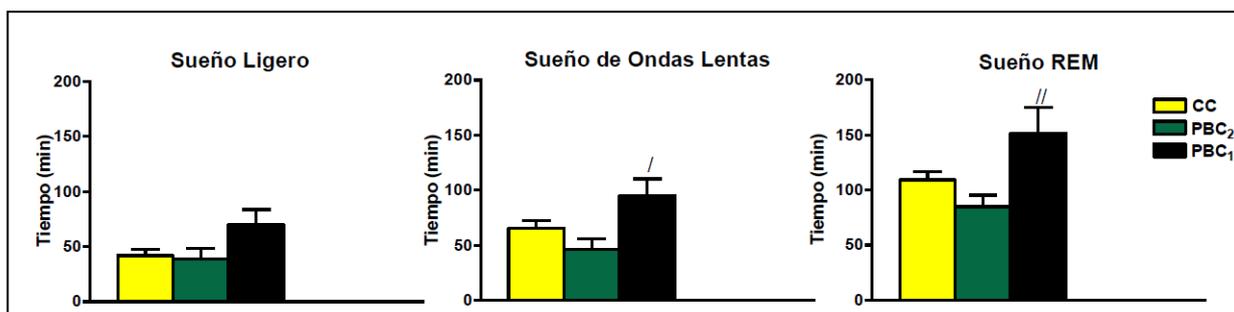


Figura 21. Latencias para cada estado de sueño. Análisis de las latencias al sueño luego de la inyección i.p. Las dosis utilizadas fueron 5 mg/kg. Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. / = PBC₁ vs PBC₂ $p < 0.05$, // $p < 0.01$; N = 6 por cada grupo experimental de PBC y N = 12 para el grupo de CC..

8.6 Efecto PBC₁ y CC sobre la potencia y la coherencia del EEG.

Se realizó un análisis detallado del EEG centrándonos en el estado de W. Debido a que en el análisis hora por hora observamos el mayor efecto sobre la W durante los primeros 90 min del registro post-inyección de las drogas, se analizó el perfil electroencefalográfico durante ese período de tiempo. En los casos que se generaban episodios de sueño previo a los 90 min, se utilizaron ventanas de W anteriores al mismo. Se estudió del efecto de PBC₁ sobre la potencia espectral, de dos áreas corticales distintas, S1I y V1I, y sobre la sincronización cortical (coherencia) entre S1I- V1I durante la W. En la Figura 22, se muestran registros crudos durante la W de un animal tratado con CC, otro con PBC₁ y sus respectivos salinos. Si bien los registros presentan las características electroencefalográficas propias de la W, ondas de baja amplitud y alta frecuencia. En el registro de PBC₁ se hacen manifiestas oscilaciones lentas (aproximadamente 1 Hz), que no se observan en el salino ni en los animales tratados con CC. Al realizar el análisis cualitativo del EEG, se desenmascaran perfiles de potencia y coherencia diferentes entre ambas drogas.

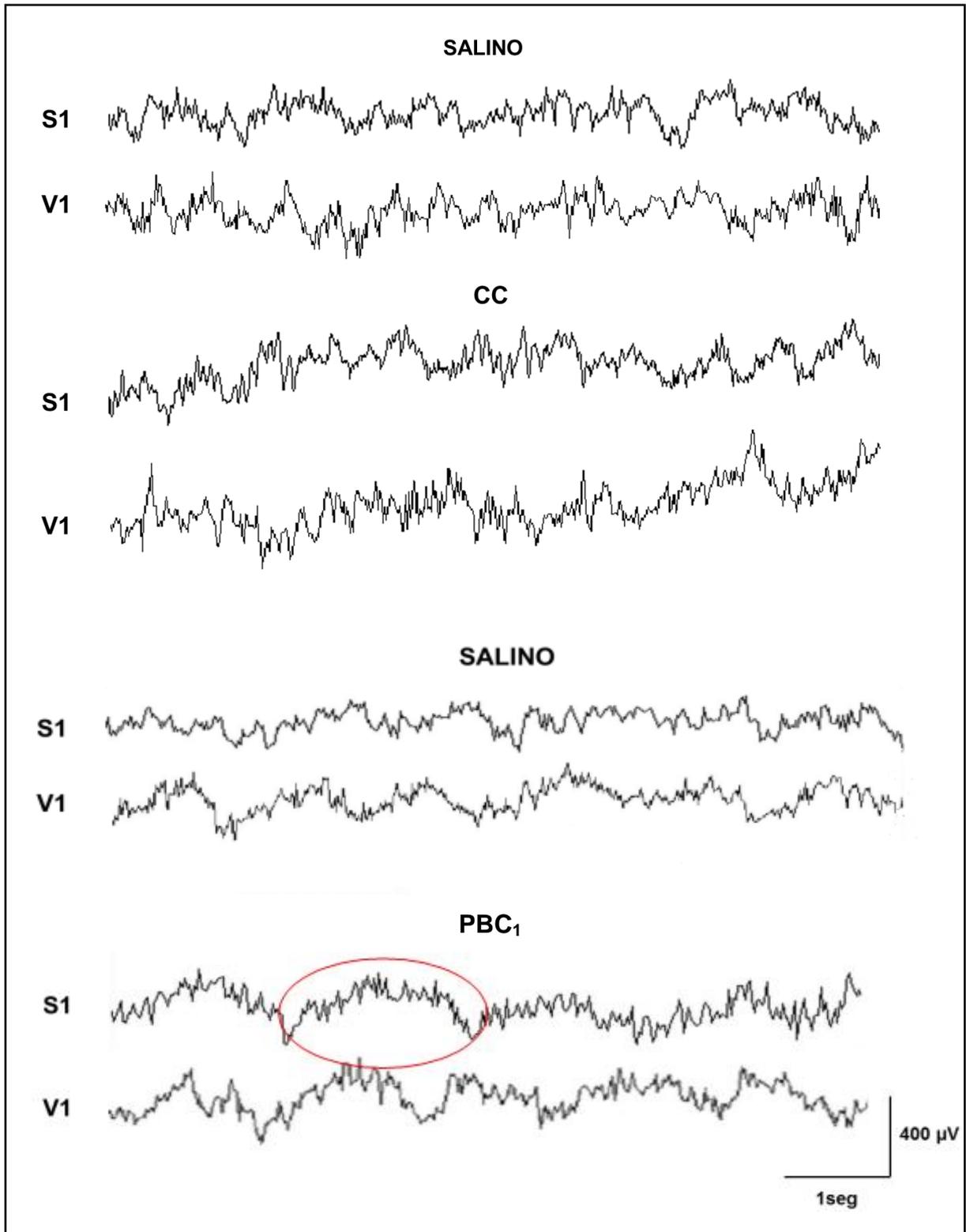


Figura 22. Registros EEG crudos durante la vigilia. Se muestran los registros EEG de las cortezas S1I y V1I del mismo hemisferio obtenidos dentro de los 90 min del comienzo del registro, en 2 animales; uno tratado con salino y CC, otro con salino y PBC₁. El círculo rojo muestra oscilaciones lentas próximas a 1 Hz, bajo la administración de PBC₁. S1I: somatosensorial primaria izquierda, V1I: visual primaria izquierda.

En la Figura 23, se muestra el perfil de la potencia espectral en distintas cortezas para los animales tratados con CC, PBC₁ y salino. En la misma se observan perfiles de actividad distintos entre las cortezas para cada tratamiento farmacológico en relación a su respectivo salino. De manera interesante, los perfiles de potencia entre las drogas para cada corteza analizada difieren uno de otro.

El análisis estadístico por banda de frecuencia se muestra en la Figura 24. Se observa que la CC y la PBC₁ generan efectos diferentes sobre S1 y V1. A nivel S1 la CC aumentó la potencia a nivel de las bandas sigma, beta y IG en relación al salino (Figura 24 A). Únicamente en la banda sigma el aumento fue significativo respecto a la PBC₁. Los animales tratados con PBC₁ mostraron un aumento en la potencia de la banda delta y hG en relación al salino. Sin embargo, la potencia en V1 con CC fue menor en todo el espectro de frecuencias, en relación al salino. En cambio la PBC₁ en V1 comparado con el salino y la CC aumentó la potencia delta y theta (Figura 24 B). Además, con respecto a la CC aumentó la potencia beta, IG, hG y épsilon.

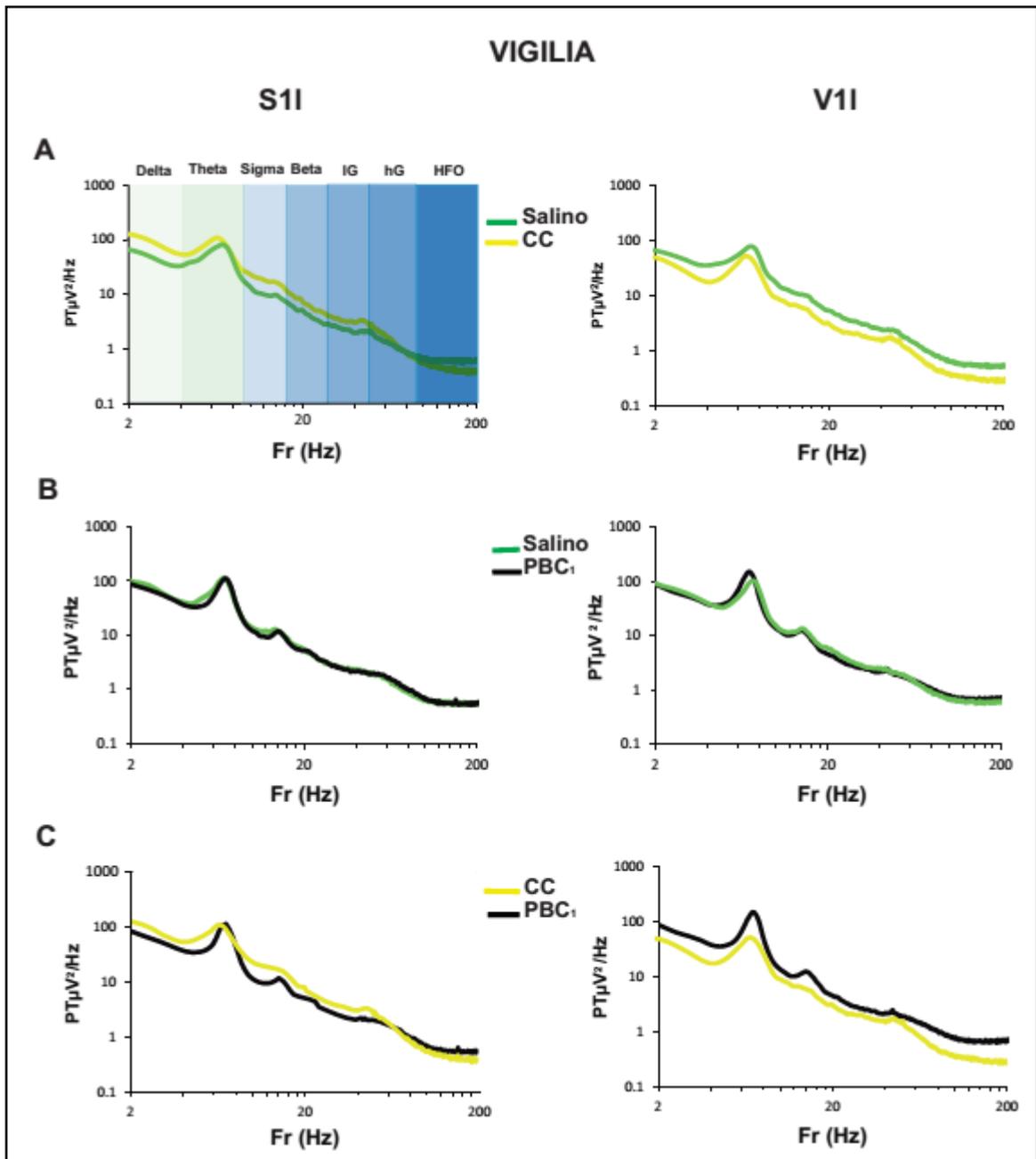


Figura 23. Perfil de la potencia para las diferentes bandas de frecuencia del EEG durante la vigilia. Cortezas: S1I y V1I. Se analizó el EEG de 4 ratas, 2 tratadas con PBC₁ y 2 con CC. En **A** se observa CC y su respectivo salino en ambas cortezas. La CC presenta un aumento de la potencia en S1. En **B** se muestra PBC₁ y su respectivo salino. En **C** se observa el perfil de potencia entre ambas drogas. Nótese que en la figura no se incluyen valores < a 2 Hz, que si se incluyen en la Figura 22. Delta 1- 4 Hz, Theta 4.5- 9.0 Hz, Sigma 9.5- 14.5 Hz, Beta 15- 30 Hz, IG 30.5- 48 Hz, hG 52.- 100 Hz, Epsilon 101- 200 Hz. S1I: somatosensorial primaria izquierda, V1I: visual primaria izquierda.

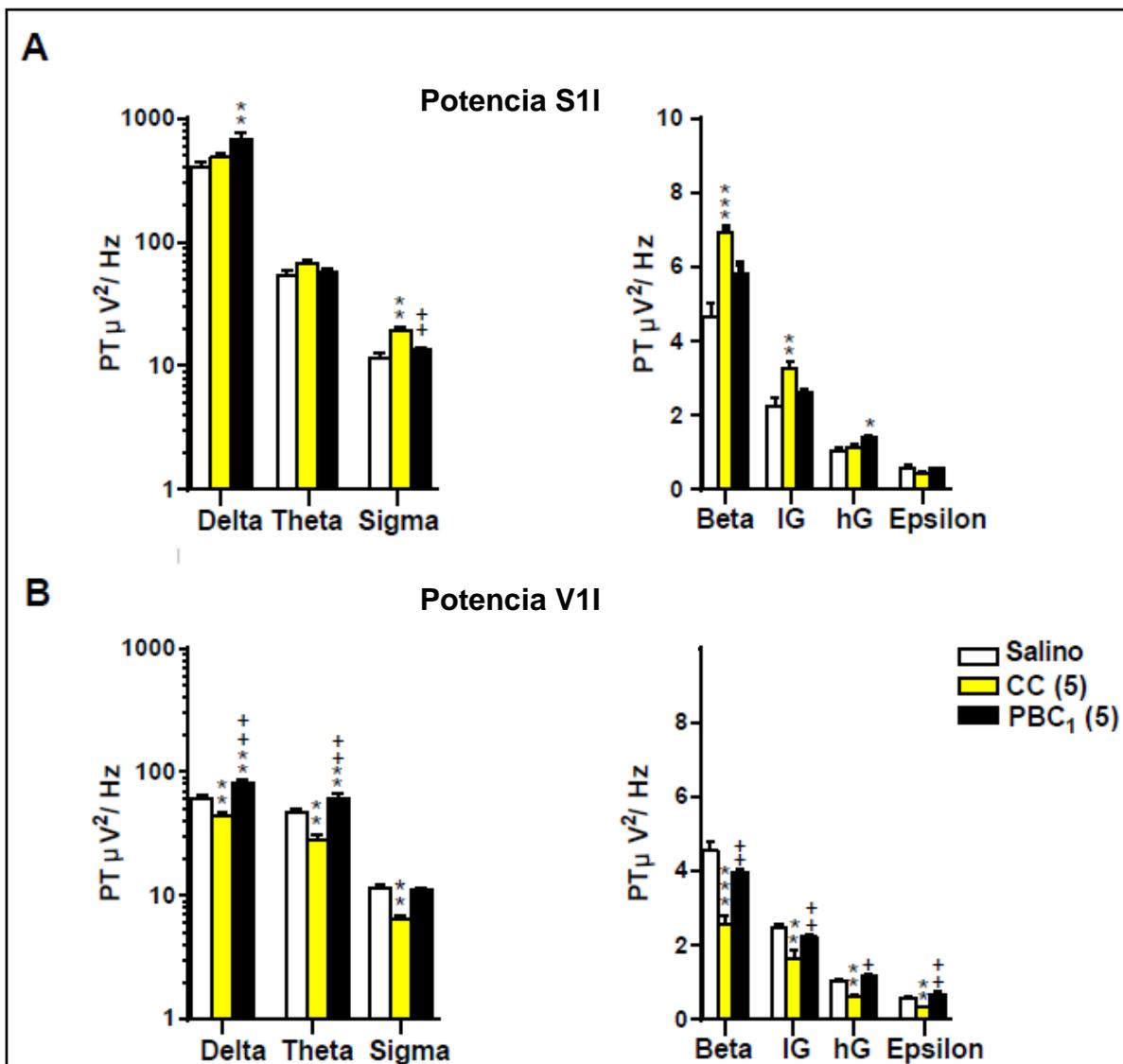


Figura 24. Efecto de PBC₁ y CC sobre la potencia de las distintas bandas de frecuencia durante la vigilia. Cortezas: S1I y V1I. Se analizó el EEG de 4 ratas, 2 tratadas con PBC₁ y 2 con CC. Delta 1- 4 Hz, Theta 4.5- 9.0 Hz, Sigma 9.5- 14.5 Hz, Beta 15- 30 Hz, IGamma 30.5- 48 Hz, hGamma 52.- 100 Hz, Epsilon 101- 200 Hz. Las dosis están en mg/kg. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs control; + = vs CC. *,+ p < 0.05, **,++ p < 0.01, ***p < 0.001. S1I: somatosensorial primaria izquierda, V1I: visual primaria izquierda. N = 2 por grupo experimental.

Por otra parte, también observamos diferencias en los perfiles de la coherencia entre los distintos tratamientos ensayados. En la Figura 25 A, se muestran los perfiles de coherencia entre CC y su salino. Ambos trazos parecen similares, pero al realizar la resta entre CC y el salino se observó valores negativos para las frecuencias más altas. El perfil de la coherencia de los animales tratados con PBC₁ es muy diferente al salino, observándose un aumento en la coherencia a nivel de la banda theta, beta, gamma y epsilon con la administración de PBC₁ (Figura 25 B). Este aumento se observa claramente al realizar la resta entre PBC₁ y el salino; en la cual se evidencian valores positivos en la coherencia a las frecuencias antes mencionadas. Por último, en la Figura

25 C, se muestran los perfiles de coherencia bajo el tratamiento con CC y PBC. La PBC₁ genera mayor sincronización cortical que CC a nivel de las frecuencias theta, beta, gamma y epsilon (Figura 25 C).

En concordancia con lo antes expuesto, en la Figura 26, se observa un aumento en la coherencia de los animales tratados con PBC₁ en las bandas de frecuencias theta, sigma, beta y gamma en relación al salino y en todas las bandas de frecuencias, menos en la banda delta en comparación con la CC. El CC en relación al salino disminuyó significativamente la coherencia en las bandas sigma, beta, gamma, hgamma y epsilon.

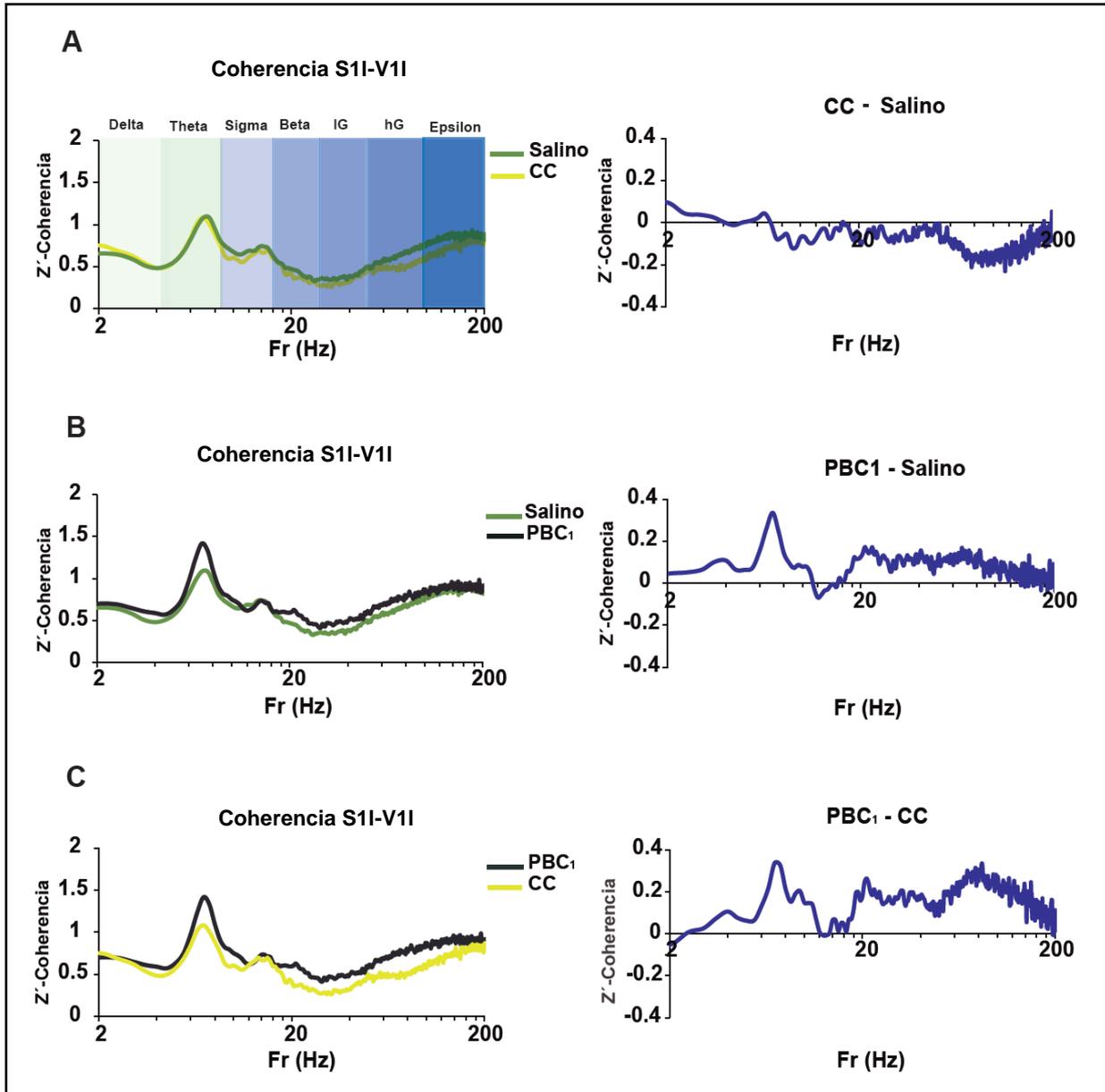


Figura 25. Efecto de CC y PBC₁ sobre el perfil de coherencia en las distintas frecuencias del EEG durante la vigilia. Perfil de coherencia entre S1I- V1I (intrahemisféricas) para cada uno de los tratamientos realizados con sus respectivos salinos y la resta entre cada sub-grupo. En **C** se observa que la diferencia entre PBC y CC, es positiva para PBC. Delta 1- 4 Hz, Theta 4.5- 9.0 Hz, Sigma 9.5- 14.5 Hz, Beta 15- 30 Hz, IG 30.5- 48 Hz, hG 52- 100 Hz, Epsilon 101- 200 Hz. N= 2

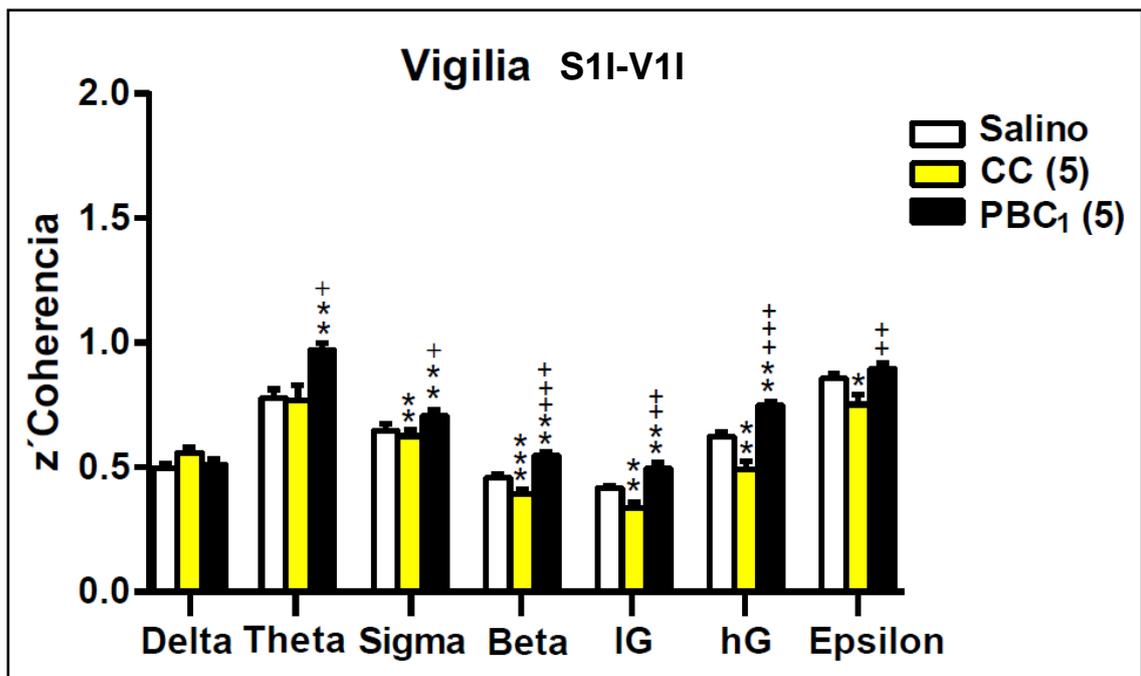


Figura 26. Efecto de la CC y PBC₁ sobre la coherencia entre S1I- V1I durante la vigilia. Se muestra la z' coherencia en función de cada banda de frecuencia. Se analizó el EEG de 4 ratas, 2 tratadas con CC y 2 con PBC₁. Delta 1- 4 Hz, Theta 4.5- 9.0 Hz, Sigma 9.5- 14.5 Hz, Beta 15- 30 Hz, IG 30.5- 48 Hz, hG 52.- 100 Hz, Epsilon 101- 200 Hz. Las dosis están mg/Kg. Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Tukey post hoc test. * = vs control, + = vs CC; *, + p < 0.05, **, ++ p < 0.01; +++, *** p < 0.001. S1: somatosensorial, V1: visual primaria. N= 2

9. DISCUSIÓN

En la presente tesis se estudió el efecto de diferentes muestras de PBC, sobre la W, el sueño y la actividad electroencefalográfica. La administración sistémica (i.p) aguda de PBC aumenta la W y reduce el sueño. Sin embargo la potencia del efecto depende de la proporción de cafeína presente en la PBC. También observamos que la PBC con cafeína genera un perfil electroencefalográfico diferente a la CC. Es importante destacar que estos resultados constituyen el primer trabajo en que se estudió el efecto de la PBC sobre la W, el sueño y la actividad electroencefalográfica.

9.1 Efecto de la PBC₁. Comparación con salina, CC, sucedáneo y PBC₂.

La PBC₁ mostró un mayor efecto sobre la W y el sueño, comparado con la administración de solución salina o de CC.

PBC₁ (Experimento 1A) aumenta la W y reduce el SWS en forma dosis-dependiente. La administración de 5 mg/kg produjo un incremento en la W durante las primeras tres horas de registro, comparado con su salino. Estos resultados se diferencian de los obtenidos a dosis equivalentes de CC (Experimento 1B), en los cuales la W aumentó únicamente en la primer hora de registro. También observamos que a dosis bajas (2.5 mg/kg) la PBC₁ también produce alteraciones significativas sobre el sueño, más robusta que la misma dosis de CC.

Los resultados obtenidos en la serie experimental 2 demostraron que la combinación del CC + cafeína como sucedáneo de la PBC₁ imita el efecto de la PBC₁ sobre el estado de W y de sueño. Tanto en el análisis hora por hora, como en bloques de dos horas no se observó diferencias significativas en la W, en los estados de sueño, ni en sus respectivas latencias entre ambos tratamientos. A su vez, en nuestros experimentos comprobamos que la PBC con baja proporción en cafeína genera un efecto similar a la CC, lo que aleja el efecto de otro posible adulterante no detectado.

Todos estos resultados en conjunto confirman la acción aditiva entre los principales componentes de la PBC₁, CC y cafeína, en el reforzamiento del estado de W.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Scorza, en los cuales observaron la PBC adulterada con cafeína, es capaz de generar una respuesta locomotora mayor a CC y a PBC sin cafeína (López-Hill et al., 2011; Prieto et al., 2012).

9.2 Bases del efecto activador de la cocaína.

En las tres series experimentales, la CC a la dosis de 5 mg/kg generó efectos similares sobre la W y el sueño (Experimentos 1B, 2 y 3). A su vez, los resultados indican que la CC presenta una acción dosis dependiente y que dosis bajas de CC son suficientes para promover la W. Nuestros resultados son concordantes con los descritos por el grupo Knapp et al., (2007). Ellos observaron que, la administración de CC a la dosis de 2.5 y 5.0 mg/kg (i.p) en ratas, aumenta la W durante la primera y la segunda hora del registro respectivamente, siendo el efecto todavía más robusto con una dosis de 10 mg/kg. Hill et al., (1977) también observaron en ratas efectos similares con una dosis de 6.0 mg/kg (i.p y oral). En los seres humanos, la exposición aguda al clorhidrato de cocaína genera un estado de hipervigilancia, reduce el tiempo total, la eficiencia del sueño, y prolonga el inicio del mismo. En particular se ha observado un decremento del sREM, asociado a un aumento en su latencia (Doktorgrades et al., 2007; Schierenbeck et al., 2008; Morgan y Malison, 2007).

A nivel del SNC, la CC actúa bloqueando los recaptadores monoaminérgicos presinápticos (Bennett et al., 1995; Kuhar et al., 1999). Su acción no selectiva aumenta la disponibilidad de monoaminas (DA, serotonina, adrenalina y noradrenalina) a nivel del espacio sináptico (Pitts y Marwah, 1987; Ritz et al., 1990). Estas monoaminas son los neurotransmisores de neuronas que forman parte de los sistemas activadores, que generan y mantienen la W, especialmente mediante sus proyecciones al tálamo y a la corteza (Tortero y Vanini, 2010).

Se ha estudiado intensamente la acción psicoestimulante de la CC producida por la modulación del sistema dopaminérgico (Pulvirenti et al., 1991; Koob, 1996; Weissenborn et al., 1996). Los somas de las neuronas dopaminérgicas que forman parte del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico se encuentran en el VTA. Estas neuronas proyectan hacia el NAcc, tubérculo olfatorio, septum y corteza frontal (Vetulani, 2001). Este sistema está implicado en los procesos motivacionales y en los aspectos motores generados por una “recompensa” o estímulo positivo (Garrett y Griffiths, 1997; Bazyan, 2016). Las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas desde la VTA al NAcc y a la Cx pre-frontal también refuerzan el estado de hipervigilancia que acompaña a los estímulos de recompensa (Jones et al., 2003; Lazarus et al., 2013). Actualmente también se conoce que, la VTA presenta proyecciones recíprocas con el Núcleo Dorsal del Rafe (NDR), núcleos del Tegmento laterodorsal/ pedúnculo pontino (LDT/ PPT), Locus Coeruleus (LC), Hipotálamo Lateral (LH) y Cerebro Basal Anterior (BF por su nombre en inglés Basal Forebrain); áreas involucradas en la generación y mantenimiento de la W (Monti y Monti, 2007). Por otra parte, los somas de las neuronas que forman el sistema dopaminérgico

"nigroestriatal", se encuentran en la SN y proyectan hacia el núcleo estriado dorsal. Dicha proyección dopaminérgica es importante en la elaboración y control del movimiento. Drogas como la CC, y las anfetaminas refuerzan este circuito favoreciendo la actividad locomotora, así como la aparición de movimientos estereotipados (Kuczenski et al., 1991; Bazyan et al., 2011). A su vez, Lu et al. (2006), reconocieron por medio de inmunorreactividad para Fos un grupo de neuronas dopaminérgicas a nivel sustancia gris periaqueductal ventral (vPAG) que se encuentran activas durante el estado de W. También observaron un aumento del estado de sueño cuando se lesiona dicha área. La CC promovería la W, aumentando la liberación de DA por todos estos grupos neuronales.

La DA actúa sobre diferentes receptores, D1- D5. Especialmente los receptores D1 y D2 (RD1 y RD2) se encuentran en los núcleos dopaminérgicos (VTA, SN) mencionados previamente, así como en sus regiones blanco. Monti (2008), demostró un aumento de la W, luego de la administración sistémica de agonistas D1 como de agonistas D2 a dosis alta.

El aumento en la W producido por la CC está relacionado con la reducción del SWS, sREM y aumento de sus latencias. Para ingresar al estado de sNREM es necesaria una reducción progresiva de la actividad de los sistemas activadores, y la completa abolición de los sistemas activadores monoaminérgicos para la generación del sREM (Monti, 2013). En ratas, los niveles séricos de CC aumentan en sangre rápidamente luego de una inyección intraperitoneal, siendo su vida media en suero de aproximadamente 13 min (Ma et al., 1999). La biodisponibilidad de la CC en sangre, y las dosis administradas son factores a considerar en el aumento de la latencia al SWS y al sREM. Además, la reducción del sREM durante la primera hora del registro es posiblemente determinada por la reducción previa del SWS también en la primera hora de registro (ver Figura 11), así como por la acción inhibitoria directa de las monoaminas en la zona de generación del sREM (McCarley, 2007).

9.3 Bases del efecto activador de la cafeína.

Estudios en animales muestran que la administración aguda a bajas dosis de cafeína aumentan la W y la actividad locomotora (Nehig et al., 1999; Beaumont et al., 2001; Roerhs et al., 2008, Paterson et al., 2009). En concordancia, nuestros resultados muestran que los animales tratados con cafeína a la dosis de 2.5 mg/kg, incrementan la W durante la primer hora del registro y disminuyen el sNREM durante el tiempo total del mismo (Experimento 2).

La cafeína es un antagonista competitivo no selectivo de los receptores de adenosina (Fredholm et al., 1999). La adenosina endógena se une a tres tipos de receptores metabotrópicos: A1, A2 (A2a y A2b) y A3, que presentan una extensa distribución a nivel del SNC. La activación de los receptores genera efectos opuestos sobre la síntesis del AMP cíclico. Favorece la activación de la célula blanco cuando se une a los receptores A2a (RA2a) o su inhibición cuando se une a los receptores A1 o A3 (RA1- RA3).

La adenosina es uno de los principales factores homeostáticos descritos en la generación del SWS. Es producida tanto a nivel celular como extracelular (residuo de la alta actividad neuronal) (Sachiko y Hiroyoshi, 2011; Jones, 2009). Porkka-Heiskanen et al., (2000, 2010) demostraron que durante la W prolongada el aumento en la concentración de adenosina en el BF tiene una acción inhibitoria a nivel de las neuronas colinérgicas que están implicadas en el mantenimiento de la W y la activación cortical. Por otra parte, la adenosina aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas GABAérgica del área preóptica (hipotálamo) promotoras del sNREM (Scammell et al., 2001; Kumar et al., 2013). También actúa sobre las neuronas colinérgicas generadoras del sREM a nivel del Núcleo Pontis Oralís (NPO), favoreciendo la generación del mismo. Marks et al. (2003) observaron en ratas que, inyecciones con agonistas adenosinérgicos selectivos para los RA1 y RA2a a nivel del NPO inducían el sREM.

El rol activador de la cafeína se centraría en reforzar el estado de W por mecanismos diferentes a los mencionados por la CC, pero complementarios. Por un lado, estimula las neuronas colinérgicas a nivel del BF y las neuronas histaminérgicas a nivel del núcleo tuberomamilar (NTM) (Szymusiak et al., 1995; Joshi et al., 2014). Por otro, inhibe las neuronas promotoras del sNREM a nivel del área preóptica en el hipotálamo, actuando principalmente sobre neuronas GABAérgicas que expresan RA2a e inervan los diferentes núcleos activadores (Strecker et al., 2000). A modo de ejemplo, Deurveilher et al. (2006), demostraron mediante inmunohistoquímica para c-fos, que la administración sistémica (i.p) de cafeína a diferentes dosis produce la activación de diferentes estructuras del SNC que forman parte de los sistemas activadores; como las neuronas hipocretinérgicas del LH, histaminérgicas del NTM, noradrenérgicas del LC, colinérgicas del BF y serotoninérgicas del NDR (Tortorolo y Vanini, 2010). A su vez, John et al., (2014) utilizaron un sensor para glutamato a nivel del Hipotálamo Posterior (HP) y observaron que la administración de cafeína (i.p) en rata aumenta los niveles locales de glutamato y la actividad c-Fos de las neuronas histaminérgicas. Este hallazgo se correlaciona con un estudio previo realizado por el mismo grupo, en el cual evidenciaron en ratas que en el HP los niveles de glutamato se

encuentran elevados durante la AW, y disminuyen en la QW y el sNREM (John et al., 2008). Asimismo, en varias regiones encefálicas se han detectado concentraciones altas de glutamato durante la W y bajas durante el sueño (Dash et al., 2009). Actualmente se piensa que el aumento de la W y el estado de alerta provocado por la cafeína estaría relacionado con un incremento en los niveles de glutamato en distintas regiones encefálicas (John et al., 2014).

9.4 Bases neurobiológicas de la acción aditiva de cc y cafeína sobre la vigilia.

Aunque, la asociación entre CC y cafeína se ha demostrado en diversos modelos experimentales a nivel motor y su interacción se ha mostrado en fenómenos de sensibilización comportamental (Horger et al., 1991; Schenk et al., 1994; Bedingfield et al., 1998; Prieto et al., 2016), aún no existen estudios de sus efectos sobre el ciclo sueño-W.

En relación a nuestros resultados, pensamos que el marcado incremento en la W observado en los animales tratados con PBC₁ o con la combinación de CC + caf, podría deberse a la acción moduladora de la cafeína sobre los distintos sistemas activadores y somnogénicos, adicionado al efecto de la CC sobre el bloqueo de la recaptación de los sistemas monoaminérgicos. A su vez, es conocido que ambas drogas facilitan la transmisión dopaminérgica a nivel del NAcc (Cauli y Morelli, 2005; Fisone et al., 2004). Este efecto en particular estaría relacionado con la interacción entre los RA2a y los RD2 a nivel a nivel de las neuronas GABAérgicas en el NAcc. Qiu et al. (2008, 2010) mostraron que las neuronas GABAérgicas en el "Shell" del NAcc (NAccSh), las cuales presentan ambos receptores, están involucradas en el mantenimiento de la W. Asimismo, la administración de cafeína en el NAccSh potencia los estados de W desencadenados por estímulos positivos (Acquas et al., 2002; Lazarus et al. 2011,13). En relación a esto, se ha visto mediante inmunohistoquímica que neuronas del NAccSh que expresan RA2a proyectan hacia diferentes centros generadores de W, como NDR, el LHA, TMN, LC; se piensa que dichas proyecciones serían GABAérgicas y favorecerían la generación de sNREM, por lo tanto este podría ser otro mecanismo por el cual la cafeína reforzaría el estado de W (Lazarus et al., 2011; Zhang et al., 2013; Huang, Zhang y Qu, 2014). También, Satoh et al. (1999) observaron en ratas que microinyecciones de agonista de los RA2a en el NAccSh inducían sNREN y sREM.

Es interesante destacar que apoyan la importancia de esta región en los efectos promotores de la W de la PBC₁ en ratas, la administración de cafeína (50 mg) por vía inhalatoria aumenta significativamente la distancia recorrida y la velocidad locomotora en relación al control. Efecto que se correlaciona con un aumento en los

niveles extracelulares de DA a nivel del NAccSh, medidos por microdialisis (Galvalisi, et al., 2016).

9.5 Efecto de la cocaína y la PBC₁ sobre la potencia y la coherencia durante la vigilia.

Hasta la realización de esta Tesis, no se ha investigado el efecto de la PBC sobre las distintas bandas de frecuencia del EEG durante la W en ratas, ni en humanos. En este trabajo se realizó un análisis detallado la actividad electroencefalográfica durante los primeros 90 min de la W. Las cortezas utilizadas en el análisis EEG fueron S1I y V1I. El registro del electrodo S1, es representativo de la actividad cortical, a diferencia del electrodo V1, el cual se encuentra marcadamente influenciado por la actividad generada en el hipocampo (HPO) y registrada en la corteza por conducción de volumen. En roedores el HPO ocupa un extenso volumen, en relación a la corteza (Paxinos G, 2006).

Los resultados obtenidos mostraron que la CC y la PBC₁ presentan distintos perfiles EEG, tanto en relación a sus salinos, como entre ambas. Sin embargo, una limitación de estos resultados ha sido el reducido número de animales utilizado en el análisis cuantitativo del EEG, por lo que se hace pertinente aumentar el mismo en experimentos futuros.

La potencia de las bandas de baja frecuencia, delta y theta, disminuyó con CC, en relación al salino. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chang et al. (1994), en ratas (en condiciones agudas a bajas dosis). A su vez, en diferentes trabajos se ha observado que la administración aguda de CC en humanos y en ratas disminuye la oscilación delta generada durante la W (Knyazev, 2012 ; Alper, 1999). Se piensa que el aumento en los niveles de dopamina provocado por la CC estarían relacionados con la disminución observada en la potencia delta. Además, se ha demostrado que la estimulación eléctrica de la VTA (núcleo dopaminérgico) en ratas, disminuye la banda delta (Ferber et al., 1994; Luo et al., 1994; Leung, 1993.).

La PBC₁ a diferencia de la CC aumenta la potencia delta en ambas cortezas registradas en relación al salino. De manera interesante, estudios recientes han demostrado en ratas la existencia de una oscilación lenta cercana a los 1.5 Hz, denominada Hipocampal Respiratory Rhythm (HRR) a nivel del bulbo olfatorio (BO) y del HPO estas oscilaciones son coincidentes con el ciclo respiratorio (Lockmann y Belchior, 2014; Viczko et al., 2014; Yanovsky et al., 2014 ; Lockmann et al., 2016). Pensamos que el aumento en la potencia delta en los animales tratados con PBC₁ se podría deber a este ritmo hipocámpico, que bajo el efecto de la PBC₁ aumenta su amplitud.

La potencia theta en los animales tratados con PBC₁ aumentó significativamente en relación a la CC y al salino. El ritmo theta en roedores generado a nivel del HPO es característico del estado de W activa, relacionado también con la actividad motora exploratoria. Estos resultados son concordantes con el aumento en la W observado con PBC₁ y también con el aumento en la actividad locomotora demostrado en los experimentos del grupo de Scorza.

En relación a la potencia de las bandas de alta frecuencia, beta, IGamma, hGamma y Epsilon, observamos con CC un aumento en la actividad beta y IGamma en S1 y una disminución en V1. En cambio la PBC₁ aumento únicamente la banda hGamma. La banda beta en animales también se ha relacionado con la actividad locomotora. Pero a diferencia de la actividad theta se la ha vinculado con la capacidad de determinar y estabilizar el plan motor más adecuado frente a otros posibles (Dejean et al., 2011; Pavlides et al., 2012). En consumidores de cocaína es característico observar aumentos en la potencia beta (Herning et al., 1985; Herning et al., 1994). Por otra parte, aumentos en la banda IGamma a nivel de la corteza pre-frontal también se han observados en ratones bajo tratamiento agudo con CC (Dilgen et al., 2013). Actualmente se conoce que las oscilaciones gamma se generan durante diferentes procesos cognitivos (Maloney et al., 1997; Buzsáki G, 2012). Los cambios observados con la administración de CC en las bandas beta y IGamma del EEG podrían estar relacionados con la mejora de la atención y la “performance” comúnmente reportada por los consumidores de clorhidrato de cocaína en condiciones agudas.

Los resultados del análisis EEG sobre la coherencia también mostraron diferencias entre la CC y la PBC₁. Se observó mayor sincronía en casi todas las bandas de frecuencia entre las cortezas analizadas con PBC₁ en comparación con el salino y la CC. Lamentablemente todavía somos incapaces de relacionar el perfil del EEG observado con los cambios cognitivos característicos producidos por esta sustancia. Sin embargo, sabemos que la sincronía de la actividad neuronal es fundamental para permitir una actividad cerebral coordinada. La correlación temporal de estas oscilaciones principalmente en el rango de las frecuencias beta y gamma se relaciona con el nivel de conciencia y diferentes funciones cognitivas (percepción, atención, memoria) (Buzsáki et al., 2013). Por otra parte, en patologías como la esquizofrenia, que se caracteriza por trastornos psicóticos, alucinaciones, delirio y trastornos del pensamiento se ha detectado alteraciones en la amplitud y sincronización de fase en la banda gamma (Uhlhaas y Mishara, 2007). También, en pacientes esquizofrénicos se ha registrado mayor actividad en las frecuencias altas en las áreas somatosensoriales durante episodios de alucinaciones visuales y auditivas (Vierling-Claassen et al., 2008).

Aparte, en relación a nuestros resultados, hipotetizamos que las diferencias observadas a nivel EEG se podrían deber a la presencia de cafeína en la PBC₁. De alguna manera la cafeína combinada con la CC modificaría en forma diferente la actividad tálamo-cortical que la CC por si sola.

10. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente Tesis constituyen las primeras evidencias sobre las acciones de la PBC en el SNC haciendo foco en su efecto sobre la W, el sueño y la actividad electroencefalográfica. De la presente tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

1. Se demostró que la administración sistémica aguda de PBC adulterada con cafeína es capaz de generar un aumento en la W y disminución sNREM y sREM mayor que la cocaína.
2. Se profundizó en el rol de cafeína como adulterante de las muestras de PBC, y se determinó que la cafeína presente en la PBC es la responsable del marcado aumento en la W.
3. Se evidenció que, en comparación con la PBC₁, la administración sistémica aguda del sucedáneo de PBC₁, no presentó diferencias significativas sobre la W y el sueño.
4. Se demostró que la cocaína y la PBC₁ generan un perfil electroencefalográfico diferente durante la W. Pensamos que dicha diferencia podría estar implicada en el perfil clínico observado en los consumidores de PBC.

11. PERSPECTIVAS

Como resultado del trabajo realizado durante esta Tesis surgieron una serie de perspectivas a futuro, las cuales se resumen a continuación:

11.1 Completar el análisis de potencia y coherencia a nivel EEG:

- Aumentar el número de animales, continuando con el análisis realizado hasta el momento.
- Analizar la coherencia interhemisférica en los animales tratados con CC y PBC₁.
- Realizar el análisis EEG bajo los tratamientos de cafeína y la combinación de CC + caf.
- Realizar un análisis más detallado del EEG, que permita estudiar el acoplamiento entre las frecuencias bajas y altas.

11.2 Estudiar los efectos sobre la W y el sueño de la PBC inhalada de modo de contar con una vía de administración similar a la utilizada por los consumidores de PBC.

12. PRESENTACIÓN DE DATOS

Los resultados obtenidos en la presente tesis han sido presentados en los siguientes congresos:

- 2016, Efecto de la Pasta Base de cocaína (PBC) sobre el sueño y la actividad electroencefalográfica: rol de la cafeína. (FALAN)
- 2015, Efecto de la pasta base de cocaína (PBC) sobre el sueño Rol de la Cafeína (SNU).
- 2012, Efectos de Pasta Base de Cocaína (PBC) sobre la vigilia y el sueño (SUB).

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquas E, Tanda G, Di Chiara G. (2002). Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 27(2), 182–93. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00290-7](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00290-7)
- Alper R. (1999). The EEG and cocaine sensitization: a hypothesis. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 11(2), 209–21. <http://doi.org/10.1176/jnp.11.2.209>
- Angarita G, Canavan V, Forselius E, Bessette A, Morgan P. (2014). Correlates of polysomnographic sleep changes in cocaine dependence: Self-administration and clinical outcomes. *Drug and Alcohol Dependence*, 143, 173–180. <http://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.07.025>
- Bazyan, A. (n.d.). [Motivation and Emotional States: Structural Systemic, Neurochemical, Molecular and Cellular Mechanisms]. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk*, 47(1), 15–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27149821>
- Bedingfield J, King D. (1998). Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity and additivity. *Pharmacol Biochem Behav*, 61(3), 291–296.
- Belluscio M, Mizuseki K, Schmidt R, Kempter R, Buzsaki G. (2012). Cross-Frequency Phase-Phase Coupling between Theta and Gamma Oscillations in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 32(2), 423–435. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4122-11.2012>
- Benedetto L, Rodriguez-Servetti Z, Lagos P, D'Almeida V, Monti JM, Torterolo P. (2013). Microinjection of melanin concentrating hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. - PubMed - NCBI. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=benedetto+2013+uruguay>
- Bennett B, Wichems C, Hollingsworth C, Davies H, Thornley C, Sexton T, Childers R. (1995). Novel 2-substituted cocaine analogs: uptake and ligand binding studies at dopamine, serotonin and norepinephrine transport sites in the rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 272(3), 1176–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7891330>
- Bijjou Y, Stinus L, Le Moal M, Cador M. (1996). Evidence for selective involvement of dopamine D1 receptors of the ventral tegmental area in the behavioral sensitization induced by intra-ventral tegmental area injections of D-amphetamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(2), 1177–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627530>
- Bojórquez E. (1991). Probable daño orgánico cerebral en consumidores de pasta de coca. *Psicoactiva*, 5, 55–107.
- Buzsaki G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*, 33, 325–340.
- Buzsáki G, Wang X (2012). Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:203-25. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150444. Epub 2012 Mar 20.
- Březinová, V. (1974). Effect of caffeine on sleep: EEG study in late middle age people. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1(3), 203–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454948>
- Buzsáki G, Logothetis N, Singer W. (2013). Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron*, 80(3), 751–64. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.002>
- Castaño. (2000). cocaínas fumables. *Adicciones 2000*, 12(4), 541–550.
- Castro S, Cavelli M, Vollono P, Chase M, Falconi A, Torterolo P. (2014). Inter-hemispheric coherence of neocortical gamma oscillations during sleep and wakefulness. *Neuroscience*

Letters, 578, 197–202. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.06.044>

- Castro S, Falconi A, Chase M, Torterolo P. (2013). Coherent neocortical 40-Hz oscillations are not present during REM sleep. *The European Journal of Neuroscience*, 37(8), 1330–9. <http://doi.org/10.1111/ejn.12143>
- Cauli O, Morelli M. (2005). Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology*, 16(2), 63–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15767841>
- Cavelli M, Castro S, Schwarzkopf N, Chase M, Falcon A, Torterolo P. (2015). Coherent neocortical gamma oscillations decrease during REM sleep in the rat. *Behavioural Brain Research*, 281, 318–25. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.050>
- Chang A, Kuo T, Tsai T, Chen F, Chan S. (1995). Power spectral analysis of electroencephalographic desynchronization induced by cocaine in rats: correlation with evaluation of noradrenergic neurotransmission at the medial prefrontal cortex. *Synapse (New York, N.Y.)*, 21(2), 149–57. <http://doi.org/10.1002/syn.890210208>
- Chang A, Kuo,T, Chan. (1994). NEUROSCI ENCE LETTERS Power spectral analysis of electroencephalographic desynchronization induced by cocaine in the rat. *Neuroscience Letters*, 170(175).
- Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q. (2010). Cut: A Guide to Adulterants, Bulking Agents and Other Contaminants Found in Illicit Drugs. *Edición, Centre for Public Health Engagement Liverpool*.
- Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q. (2011). Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Testing and Analysis*, 3:89–96.
- Contreras, D. Mechanisms of generation of fast (20 80 Hz) oscillations in thalamocortical circuits. *Revista de Neurologia*, 35(2), 135–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221625>
- Dash M, Douglas C, VyazovskiyV, Cirelli C, Tononi G. (2009). Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(3), 620–9. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5486-08.2009>
- Dejean C, Arbuthnott G, Wickens J., Le Moine C, Boraud T, Hyland B. (2011). Behavioral/Systems/Cognitive Power Fluctuations in Beta and Gamma Frequencies in Rat Globus Pallidus: Association with Specific Phases of Slow Oscillations and Differential Modulation by Dopamine D 1 and D 2 Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 31(16), 6098–6107. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3311-09.2011>
- Dement W. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 9(4), 673–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13480240>
- Deurveilher S, Lo H, Murphy J, Burns J, Semba K. (2006). Differential c-Fos immunoreactivity in arousal-promoting cell groups following systemic administration of caffeine in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(5), 667–89. <http://doi.org/10.1002/cne.21084>
- Dilgen J, Tompa T, Saggi S, NaselarisT, Lavin A. (2013). Optogenetically evoked gamma oscillations are disturbed by cocaine administration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 213. <http://doi.org/10.3389/fncel.2013.00213>
- Doktorgrades, M. (2007). Illicit Recreational Drugs and Sleep.
- EIsholy M, Brenneisen R. (1991). Coca paste: chemical analysis and smoking experiments. *Journal of Forensic Sciences*, (36), 93–103.
- Evrard I, Legleye S. (2010). Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. - PubMed - NCBI. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20378323>
- Ferger B, Kropf W, Kuschinsky K. (1994). Studies on electroencephalogram (EEG) in rats suggest that moderate doses of cocaine or d-amphetamine activate D1 rather than D2

- receptors. *Psychopharmacology*, 114(2), 297–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7838923>
- Ferger B, Stahl D, Kuschinsky K. (1996). Effects of cocaine on the EEG power spectrum of rats are significantly altered after its repeated administration: do they reflect sensitization phenomena? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 353(5), 545–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8740148>
- Fisone G, Borgkvist A, Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(7-8), 857–72. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3269-3>
- Galvalisi M, Prieto J P, Martínez M, Abin-Carriquiry J, Scorza C. (2016). Caffeine Induces a Stimulant Effect and Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Shell Through the Pulmonary Inhalation Route of Administration in Rats. *Neurotoxicity Research*. <http://doi.org/10.1007/s12640-016-9667-8>
- Garrett B, Griffiths R. (1997). The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 57(3), 533–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218278>
- Gonçalves F, Pires J, Pliassova A, Beleza R, Lemos C, Marque. (2015). Adenosine A_{2b} receptors control A₁ receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 41(7), 878–888. <http://doi.org/10.1111/ejn.12851>
- Gossop M, Griffiths P, Powis B. (1992). Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. *British Journal of Addiction*, 87, 1527–1536.
- Gostic T, Klemenc S. (2009). A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Science International*, 187, 19–28.
- Hatsukami D. (1996). Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *Journal of the American Medical Association*, 276, 1580– 1588.
- Herning R, Glover B, Koepl B, Phillips R., London E. (1994). Cocaine-Induced Increases in EEG Alpha and Beta Activity: Evidence for Reduced Cortical Processing. *Neuropsychopharmacology*, 11(1), 1–9. <http://doi.org/10.1038/npp.1994.30>
- Herning R, Jones R, Hooker WD, Mendelson J, Blackwell L. (1985). Cocaine increases EEG beta: a replication and extension of Hans Berger's historic experiments. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 60(6), 470–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2408845>
- Hill. (1977). Psycho pharmacology Cocaine Effects on Sleep Parameters in the Rat, 127, 125–127.
- Hobson, J. (2009). REM sleep and dreaming: towards a theory of protoconsciousness. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(11), 803–13. <http://doi.org/10.1038/nrn2716>
- Horger B, Wellman P, Morien A, Davies B, Schenk S. (1991). Caffeine exposure sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine. *Neuroreport*, 2(1), 53–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1768850>
- Huang Z., Zhang W, Qu, W. (2014). Roles of adenosine and its receptors in sleep-wake regulation. *International Review of Neurobiology*, 119, 349–71. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-801022-8.00014-3>
- Jeri. (1982). The Coca Paste Epidemic in South America: Epidemiological, clinical, Experimental and therapeutic observations. *Revista de La Sanidad de Las Fuerzas Policiales*, 43(2), 170–179.
- JND. (2007). Pasta Base de Cocaína. Práctica y gestión de riesgos en adolescentes uruguayos. In J. N. de D. P. De & República. (Eds.), *Junta Nacional de Drogas. Presidencia de la República (Junta Naci)*.

- JND. (2008). Drogas más información menos riesgos. In P. de la R. Junta Nacional de Drogas (Ed.), *Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República*. (7ma ed.).
- JND. (2012). 5ta encuesta nacional en hogares sobre consumo de drogas. In *Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República. Observatorio Uruguayo de Drogas*.
- JND. (2013). Ocho diagnósticos locales sobre la problemática del consumo de drogas en Montevideo y zona metropolitana. In P. de la R. O. U. Junta Nacional de Drogas & D. Drogas. (Eds.), *Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República. Observatorio Uruguayo de Drogas*. (Junta Naci).
- John J, Kodama T, Siegel J. (2014). Caffeine promotes glutamate and histamine release in the posterior hypothalamus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(6), R704–10. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00114.2014>
- John,J, Ramanathan L, Siegel J. (2008). Rapid changes in glutamate levels in the posterior hypothalamus across sleep-wake states in freely behaving rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(6), R2041–9. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.90541.2008>
- Jones B. (2003). Arousal systems. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 8, s438–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700104>
- Jones B. (2009). Glia, adenosine, and sleep. *Neuron*, 61(2), 156–7. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.005>
- Knapp C, Datta S, Ciraulo D, Kornetsky C. (2007). Effects of low dose cocaine on REM sleep in the freely moving rat. *Sleep and Biological Rhythms*, 5(1), 55–62. <http://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2006.00247.x>
- Knyazev G. (2012). EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(1), 677–695. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.10.002>
- Koob G.. (1996). Hedonic valence, dopamine and motivation. *Molecular Psychiatry*, 1(3), 186–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118342>
- Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML. (1991). Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(9), 2703–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715389>
- Kuhar M, McGirr K, Hunter G., Lambert G, Garret B, Carroll F. (1999). Studies of selected phenyltropanes at monoamine transporters. *Drug and Alcohol Dependence*, 56(1), 9–15. [http://doi.org/10.1016/S0376-8716\(99\)00005-8](http://doi.org/10.1016/S0376-8716(99)00005-8)
- Kumar S, Rai S, Hsieh C, McGinty D, Alam M, Szymusiak R. (2013). Adenosine A(2A) receptors regulate the activity of sleep regulatory GABAergic neurons in the preoptic hypothalamus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(1), R31–41. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00402.2012>
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH. (2009). Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. - PubMed - NCBI. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230831>
- Landolt H. (2008). Sleep homeostasis: A role for adenosine in humans? *Biochemical Pharmacology*, 75(11), 2070–2079. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.02.024>
- Lazarus M, Shen H, Cherasse Y, Qu W, Huang Z., Chen J (2011). Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(27), 10067–75. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6730-10.2011>
- Leung L, Yim, C. (1993). Rhythmic delta-frequency activities in the nucleus accumbens of anesthetized and freely moving rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*,

71(5-6), 311–320. <http://doi.org/10.1139/y93-049>

- Lieberman H, Wurtman R, Emde G, Roberts C, Coviella L. (1987). The effects of low doses of caffeine on human performance and mood. *Psychopharmacology*, 92(3), 308–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3114783>
- Lizasoain I, Moro M, . (2002). Cocaína, aspectos farmacológicos. *Adicciones*, 14, 57–64.
- Lockmann A, Belchior H. (2014). New insights into the role of respiratory inputs in hippocampal oscillations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(29), 9473–5. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1870-14.2014>
- Lockmann A Laplagne D, Leão R, Tort A.. (2016). A Respiration-Coupled Rhythm in the Rat Hippocampus Independent of Theta and Slow Oscillations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(19), 5338–52. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3452-15.2016>
- López-Hill X, Prieto JP, Meikle MN, Urbanavicius J, Abin-Carriquiry J, Prunell G, Scorza MC. (2011). Coca-paste seized samples characterization: Chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behavioural Brain Research*, 221(1), 134–141. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.005>
- Luoh H, Kuo T, Chan S, Pan W. (1994). Power spectral analysis of electroencephalographic desynchronization induced by cocaine in rats: correlation with microdialysis evaluation of dopaminergic neurotransmission at the medial prefrontal cortex. *Synapse (New York, N.Y.)*, 16(1), 29–35. <http://doi.org/10.1002/syn.890160104>
- Ma, F, Falk JL, Lau C. (1999). Within-subject variability in cocaine pharmacokinetics and pharmacodynamics after intraperitoneal compared with intravenous cocaine administration. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 7(1), 3–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036604>
- Maloney K J, Cape E, Gotman J, Jones B. (1997). High-frequency γ electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience*, 76(2), 541–555. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00298-9](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00298-9)
- Marks G., Shaffery J, Speciale S., Birabil, C. (2003). Enhancement of rapid eye movement sleep in the rat by actions at A1 and A2a adenosine receptor subtypes with a differential sensitivity to atropine. *Neuroscience*, 116(3), 913–920. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00561-4](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00561-4)
- Mccarley R. (2007). Neurobiology of REM and NREM sleep. <http://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.03.005>
- Meikle MN, Urbanavicius J, Umpierrez E, Abin-Carriquiry JA, Prunell G,. (2009). primer estudio pre-clínico de la acción de la Pasta Base de Cocaína en el Sistema Nervioso Central. *Revista de Psiquiatría Del Uruguay*, 73(1), 25–36.
- Mikkelsen, E. (1978). Caffeine and schizophrenia. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 39(9), 732–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/690092>
- Monti JM. (2013). The neurotransmitters of sleep and wake, a physiological reviews series. - PubMed - NCBI. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602125>
- Monti J M, Jantos, H. (2008). The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. *Progress in Brain Research*, 172, 625–46. [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00929-1](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00929-1)
- Monti JM, Monti D. (2007). The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. *Sleep Medicine Reviews*, 11(2), 113–33. <http://doi.org/10.1016/j.smr.2006.08.003>
- Moraes M, Scorza C, Abín-Carriquiry A, Pascale A, González G, U. E. (2010). Consumo de pasta base de cocaína en Uruguay en el embarazo, su incidencia, características y repercusiones. *Archivos de Pediatría Del Uruguay*, 81, 100–104.
- Morgan P I. (2007). Cocaine and sleep: early abstinence. *TheScientificWorldJournal*, 7, 223–30.

<http://doi.org/10.1100/tsw.2007.209>

- Müller-Limmroth, W. (1972). [Effect of caffeine containing and caffeine free coffee on human sleep]. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft. Journal of Nutritional Sciences. Supplementa*, 14, Suppl 14:46–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4345939>
- Nehlig, A. (1999). Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(4), 563–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073894>
- Nguyen Chi, Müller C, Wolfenstetter, T, Yanovsky Y, Draguhn A, Tort A., Brankač J. (2016). Hippocampal Respiration-Driven Rhythm Distinct from Theta Oscillations in Awake Mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(1), 162–77. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2848-15.2016>
- Núñez-Molina A, Amzica F. The mechanisms behind the generation of the slow oscillations found in EEG recordings during sleep. *Revista de Neurologia*, 39(7), 628–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15490348>
- Pascale A et. (2014). Consumo de pasta Base de Cocaína en América del Sur: revisión de los aspectos epidemiológicos y médicos-toxicológicos. *Comisión Interamericana Para El Control Del Abuso de Drogas*.
- Pascale A, Negrin A (2010). Pasta base de cocaína: experiencia del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico. *Adicciones*, 22, 227–232.
- Paxinos G, Watson Ch (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition. Hard Cover Edition.
- Pavlidis A, Hogan SJ, Bogacz R. (2012). Improved conditions for the generation of beta oscillations in the subthalamic nucleus--globus pallidus network. *The European Journal of Neuroscience*, 36(2), 2229–39. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08105.x>
- Pérez J. (2003). Clínica de la adicción a pasta base de cocaína. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 41, 55–63.
- Pitts D., Marwah J. (1987). Neuropharmacology of cocaine: role of monoaminergic systems. *Monographs in Neural Sciences*, 13, 34–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3317013>
- Porkka-Heiskanen T, Strecker R, McCarley, R. (2000). Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience*, 99(3), 507–517. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00220-7](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00220-7)
- Prieto JP, López-Hill, X. , Meikle MN, Abin-Carriquiry J, Scorza C. (2012). Relevancia del adulterante activo cafeína en la acción estimulante de la pasta base de cocaína, 76(1), 35–48.
- Prieto JP, Scorza C, Serra G, Pietro, Perra V, Galvalisi M, Abin-Carriquiry J., Valentini, V. (2016). Caffeine, a common active adulterant of cocaine, enhances the reinforcing effect of cocaine and its motivational value. *Psychopharmacology*, 233(15-16), 2879–2889. <http://doi.org/10.1007/s00213-016-4320-z>
- Pulvirenti L, Swerdlow N, Koob GF. (1991). Nucleus accumbens NMDA antagonist decreases locomotor activity produced by cocaine, heroin or accumbens dopamine, but not caffeine. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 40(4), 841–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1687766>
- Qiu M, Vetrivelan R, Fuller P, Lu J. (2010). Basal ganglia control of sleep-wake behavior and cortical activation. *The European Journal of Neuroscience*, 31(3), 499–507. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07062.x>
- Radulovacki M, Walovitch R, . (1980). Caffeine produces REM sleep rebound in rats. - PubMed - NCBI. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7417859>

- Rieder MK, Rahm B, Williams JD. (2010). human gamma-band activity and behavior. *Psychophysiol*, 79, 39–48.
- Ritz MC, Cone E, Kuharn M. (1990). Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Sciences*, 46(9), 635–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2308472>
- Roehrs T, (2008). Caffeine: sleep and daytime sleepiness. - PubMed - NCBI. *Sleep Med Rev.* , 12(2), 153–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950009>
- Sachiko Chikahisa and Hiroyoshi Séi. (2011). The role of ATP in sleep regulation, 2(87).
- Samaha A,. (2005). Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 26, 82–87.
- Satoh S, Matsumura H, Koike N, Tokunaga Y, Maeda T, Hayaish O. (1999). Region-dependent difference in the sleep-promoting potency of an adenosine A2A receptor agonist. *The European Journal of Neuroscience*, 11(5), 1587–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215911>
- Scammell TE, Gerashchenko D, Mochizuki T, McCarthy MT, Estabrooke I, Hayaish O. (2001). An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*, 107(4), 653–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720788>
- Scheffer-Teixeira R, Belchior H, Caixeta F, Souza B, Ribeiro S, Tort A. (2012). Theta phase modulates multiple layer-specific oscillations in the CA1 region. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 22(10), 2404–14. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhr319>
- Scheffzük C, Kukushka V, Vyssotski A, Draguhn A, Tort A, Brankačk J. (2011). Selective coupling between theta phase and neocortical fast gamma oscillations during REM-sleep in mice. *PLoS One*, 6(12), e28489. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028489>
- Schenk S, Valadez B, Snow S. (1994). Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration, 5(2), 153–158.
- Schierenbeck T, Riemann D, Berger M, Hornyak M. (2008). Effect of illicit recreational drugs upon sleep: cocaine, ecstasy and marijuana. *Sleep Medicine Reviews*, 12(5), 381–9. <http://doi.org/10.1016/j.smrv.2007.12.004>
- Sours J A. (1983). Case reports of anorexia nervosa and caffeinism. *The American Journal of Psychiatry*, 140(2), 235–6. <http://doi.org/10.1176/ajp.140.2.235>
- Stillner, V., Popkin, M. K., & Pierce, C. M. (1978). Caffeine-induced delirium during prolonged competitive stress. *The American Journal of Psychiatry*, 135(7), 855–6. <http://doi.org/10.1176/ajp.135.7.855>
- Strecker RE, Morairty S, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Basheer R, Dauphin, McCarley R. (2000). Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behavioural Brain Research*, 115(2), 183–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11000420>
- Thakkar MM, Winston S, McCarley RW. (2003). A1 receptor and adenosinergic homeostatic regulation of sleep-wakefulness: effects of antisense to the A1 receptor in the cholinergic basal forebrain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(10), 4278–87. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2002519&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tort A, Scheffer-Teixeira R, Souza BC, Draguhn A. (2013). Theta-associated high-frequency oscillations (110-160Hz) in the hippocampus and neocortex. *Prog Neurobiol.* , 100, 1–14.
- Tort A, Fontanini A, Kramer MA, Jones-Lush L., Kopell NJ, Katz DB. (2010). Cortical networks produce three distinct 7-12 Hz rhythms during single sensory responses in the awake rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(12), 4315–24. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6051-09.2010>

- Tort A, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N. (2010). Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. *Journal of Neurophysiology*, 104(2), 1195–210. <http://doi.org/10.1152/jn.00106.2010>
- Tort A, Komorowski RW., Manns JR, Kopell NJ, Eichenbaum H. (2009). Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20942–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0911331106>
- Tort A, Kramer MA, Thorn C, Gibson D, Kubota Y, Graybiel A., Kopell NJ. (2008). Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20517–22. <http://doi.org/10.1073/pnas.0810524105>
- Tort A., Scheffer-Teixeira R, Souza B., Draguhn A., Brankač J. (2013). Theta-associated high-frequency oscillations (110–160Hz) in the hippocampus and neocortex. *Progress in Neurobiology*, 100, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.09.002>
- Tortorolo P, Vanini G. (2010). Nuevos conceptos sobre la generación y el mantenimiento de la vigilia, 50(12), 747–758.
- Tortorolo P, Castro-Zabala S, Cavelli M, Chase MH. (2016). Neocortical 40 Hz oscillations during carbachol-induced rapid eye movement sleep and cataplexy. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 43, pp. 580–589.
- Triaca J, Cardeillac V. (2009). Características de los primeros usuarios que consultaron el centro de referencia Nacional de la Red de Drogas “Portal Amarillo.” *Revista Psiquiatría Del Uruguay*, 7337-48.
- Uhlhaas PJ, Mishara A. (2007). Perceptual anomalies in schizophrenia: integrating phenomenology and cognitive neuroscience. *Schizophrenia Bulletin*, 33(1), 142–56. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbl047>
- UNODC. (2013). *Pasta Básica de Cocaína*. (Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito, Ed.).
- Van der Merji R, Kahana M, Maris E. (2012). Phase-amplitude coupling in human electrocorticography is spatially distributed and phase diverse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(1), 111–23. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4816-11.2012>
- Van Dort C, Baghdoyan H, Lydic R. (2009). Adenosine A(1) and A(2A) receptors in mouse prefrontal cortex modulate acetylcholine release and behavioral arousal. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(3), 871–81. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4111-08.2009>
- Vetulani J. Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Polish Journal of Pharmacology*, 53(4), 303–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990077>
- Vezina P. (1996). D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(7), 2411–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601820>
- Viczko J, Sharma A, Pagliardini S, Wolansky T, Dickson C. (2014). Lack of respiratory coupling with neocortical and hippocampal slow oscillations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(11), 3937–46. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3581-13.2014>
- Vierling-Claassen D, Siekmeier P, Stufflebeam S, Kopell N. (2008). Modeling GABA alterations in schizophrenia: a link between impaired inhibition and altered gamma and beta range auditory entrainment. *Journal of Neurophysiology*, 99(5), 2656–71. <http://doi.org/10.1152/jn.00870.2007>
- Weissenborn R, Deroche V, Koob GF, Weiss, F. (1996). Effects of dopamine agonists and

antagonists on cocaine-induced operant responding for a cocaine-associated stimulus. *Psychopharmacology*, 126(4), 311–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8878347>

Yanovsky Y, Ciatipis M, Draguhn A, Tort A, Brankač J. (2014). Slow oscillations in the mouse hippocampus entrained by nasal respiration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(17), 5949–64. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5287-13.2014>

Zhang JP, Xu Q, Yuan X, Cherasse Y, Schiffmann S, (2013). Projections of nucleus accumbens adenosine A2A receptor neurons in the mouse brain and their implications in mediating sleep-wake regulation. *Frontiers in Neuroanatomy*, 7, 43. <http://doi.org/10.3389/fnana.2013.00043>