



Tesis de Doctorado



Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas
Área Biología, Subárea Neurociencias

CAMBIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ACCIÓN POTENCIADORA DE LA CAFEÍNA SOBRE EL EFECTO REFORZADOR DE LA PASTA BASE DE COCAÍNA. EVALUACIÓN DEL CANNABIDIOL COMO POTENCIAL TRATAMIENTO.

MSc. José Pedro Prieto

Departamento de Neurofarmacología Experimental
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientadora: Dra. Cecilia Scorza, IIBCE

Co-orientadora: Dra. Verónica Bisagno, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Tribunal de Tesis

Dr. Pablo Torterolo (Presidente)

Dra. Laura Quintana

Dr. Daniel Olazábal

Junio 2020

ÍNDICE

ABREVIACIONES	1
RESUMEN.....	3
PRESENTACIÓN DE TESIS.....	5
INTRODUCCIÓN	6
1. ADICCIÓN O DEPENDENCIA DE SUSTANCIAS.....	6
2. PASTA BASE DE COCAÍNA	8
2.1. Definición y forma de consumo	8
2.2. Efectos centrales y periféricos	9
2.3. Problemática asociada al consumo de PBC.....	11
3. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN	13
3.1. Teorías biológicas de la transición a la adicción y reforzamiento. Etapas del ciclo adictivo	13
3.2. Circuito motivacional	16
3.2.1. <i>NAc: composición celular y su rol en la acción de psicoestimulantes</i>	<i>22</i>
3.2.2. <i>mPFC: composición celular y su rol en la acción de psicoestimulantes.....</i>	<i>26</i>
3.3. Sensibilización comportamental	29
3.4. Condicionamiento y aprendizaje asociado a recompensa.....	31
3.5. Mecanismos transcripcionales: genes inmediatos tempranos	33
4. TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A DROGAS: USO DE CANNABINOIDES	35
4.1. Sistema endocannabinoide como nuevo blanco terapéutico.....	35
4.2. Propiedades terapéuticas del Cannabidiol para la dependencia a psicoestimulantes.....	38
5. ANTECEDENTES DE TRABAJO	39
5.1. Composición química de muestras incautadas de PBC.....	39
5.2. Cafeína: mecanismo de acción e interacción con cocaína	41
5.3. Efecto farmacológico agudo y motivacional de PBC.....	43

5.4. Sensibilización locomotora a PBC.....	44
5.5. Interacción entre el sistema adenosinérgico y CBD.....	47
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	49
OBJETIVO GENERAL	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
MATERIALES Y MÉTODOS	51
ANIMALES.....	51
DROGAS.....	52
OBJETIVO ESPECÍFICO 1.1	53
OBJETIVO ESPECÍFICO 1.2	57
OBJETIVO ESPECÍFICO 2.1	60
OBJETIVO ESPECÍFICO 3.1	64
RESULTADOS I	67
RESULTADOS II	75
RESULTADOS III	76
DISCUSIÓN GENERAL	77
CONCLUSIONES GENERALES.....	85
PERSPECTIVAS	86
REFERENCIAS.....	88

ABREVIACIONES

2-AG: 2-araquidonilglicerol

ACC: Corteza cingulada anterior

AEA: Anandamida

AMPA: Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

BNST: Núcleo del lecho de la estría terminal

cAMP: AMP cíclico

CART: Transcripto regulado por cocaína y anfetamina

CBD: Cannabidiol

CPP: Condicionamiento de preferencia de lugar

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP

DA: Dopamina

DAB: Diaminobencidina

Daérgico: Dopaminérgico

DAT: Transportador de dopamina

DS: Estriado dorsal

ECB: Endocannabinoides

Egr-1: Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1

FAAH: Amida hidrolasa de ácidos grasos

Fra: Antígenos relacionados a Fos

IEGs: Genes inmediatos tempranos

IL: Corteza infralímbica

LDTg: Tegmento laterodorsal

LH: Hipotálamo Lateral

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

mPFC: Corteza prefrontal medial

MSNs: Neuronas espinosas medias

NAC: Núcleo accumbens

NMDA: Receptor de N-metil-D-aspartato

Npas4: Proteína neuronal de dominio PAS 4

OF: Open field/campo abierto

PBC: Pasta base de cocaína

PBS: Buffer de fosfatos

PFA: Paraformaldehído

PFC: Corteza prefrontal

PKA: Proteína quinasa dependiente de cAMP

PPTg: Tegmento pedunculopontino

PrL: Corteza prelímbica

sECB: Sistema endocannabinoide

SNC: Sistema nervioso central

SPECT: Tomografía por emisión de fotón simple

THC: delta-9-tetrahidrocannabinol

VTA: Area tegmental ventral

RESUMEN

La pasta base de cocaína (PBC) es una droga de abuso con alto poder adictivo, y pese a su baja prevalencia de consumo en nuestro país, la misma continúa siendo uno de los mayores desafíos regionales en materia de drogas, así como la principal causa de consulta a centros de asistencia a consumidores. La PBC se define como una cocaína fumable, capaz de inducir una rápida y fuerte dependencia, así como severos daños psicofísicos en sus usuarios. Su impacto se agrava, a su vez, por la falta de tratamientos específicos, eficaces y seguros para las personas con dependencia a esta droga, que colaboren a mantener la abstinencia y reducir las recaídas.

Nuestro grupo de trabajo realizó una caracterización de muestras incautadas de PBC en la que demostró que cocaína base es el alcaloide principal de su composición química, y reveló a la cafeína como uno de los adulterantes más frecuentes en esta droga. Estudios subsecuentes mostraron que la cafeína, a dosis determinadas, es capaz de potenciar el efecto reforzador de la PBC, y en particular, facilitar la expresión del fenómeno de sensibilización comportamental. La importancia de este fenómeno radica en que su expresión refleja la consolidación de neuroadaptaciones duraderas sobre el circuito motivacional, análogas a procesos característicos de la dependencia. Basados en estos antecedentes, el trabajo de tesis se centró en estudiar los cambios particulares y mecanismos detrás de la acción potenciadora de la cafeína sobre el efecto reforzador de la PBC, en procesos como la sensibilización comportamental y el aprendizaje asociado a recompensa. Por otro lado, la alta demanda y necesidad de tratamientos efectivos nos impulsó a iniciar la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas, con foco en la potencialidad creciente del uso de compuestos cannabinoides no psicotomiméticos.

Para llevar a cabo estos estudios se utilizó un protocolo de sensibilización comportamental utilizado en trabajos previos del laboratorio. El mismo constó de 3 días de pre-tratamiento con cocaína o la combinación de cocaína y cafeína (Coc+Caf), como sucedáneo de PBC, seguido de 5 días de abstinencia y una re-exposición posterior a la droga. Luego se analizó la expresión de la proteína Fra-2 asociada (factor de transcripción perteneciente a la familia Fos), en dos regiones claves del circuito motivacional, el núcleo accumbens (NAc) y corteza prefrontal medial (mPFC). También se realizó el análisis de la expresión de ARNm en el NAc y mPFC luego del mismo protocolo comportamental, con una muestra de PBC adulterada con cafeína, y otra sin adulterar. Se analizaron genes para subunidades de receptores de sistemas de neurotransmisión involucrados en las acciones reforzadoras de drogas psicoestimulantes, y genes asociados a procesos de plasticidad. Los resultados mostraron que, de acuerdo a lo esperado, únicamente los tratamientos con Coc+Caf o PBC adulterada con cafeína lograron inducir la expresión de la sensibilización con sólo tres días de pre-tratamiento. Este fenómeno se acompañó de un patrón de expresión

de Fra-2 parcialmente diferente al observado en los otros grupos, y cambios específicos en la expresión de ARNm similares a los descritos para tratamientos largos de cocaína. Estos resultados resaltan la relevancia del rol de la cafeína como adulterante, pudiendo acelerar procesos asociados al desarrollo adictivo.

En este sentido, también se evaluó el aprendizaje asociado a recompensa inducido por Coc+Caf en relación a cocaína sola, en el modelo de condicionamiento de preferencia de lugar, y su efecto sobre la expresión de genes seleccionados. Se demostró que Coc+Caf indujo un fuerte condicionamiento, cuya magnitud tendió a ser mayor al inducido por cocaína sola, y dicho efecto se acompañó de cambios específicos en la expresión de genes inmediatos tempranos asociados a procesos de aprendizaje.

Por último, con el fin de iniciar el ensayo de posibles tratamientos, se evaluó la capacidad del compuesto cannabinoide, Cannabidiol (CBD) de atenuar la expresión de la sensibilización locomotora inducida por Coc+Caf, y sus acciones sobre la actividad metabólica regional en el NAc y mPFC. De manera interesante, CBD fue capaz de evitar la expresión de la sensibilización, así como las alteraciones funcionales asociadas.

El conjunto de resultados presentados en esta tesis profundiza en las acciones de Coc+Caf y PBC en el SNC, resalta el rol de la cafeína como adulterante en las alteraciones centrales inducidas por PBC, y apoya la exploración del potencial terapéutico de CBD para la dependencia a esta droga.

PRESENTACIÓN DE TESIS

La PBC es una cocaína fumable altamente adictiva, que induce severos daños psicofísicos en sus consumidores dependientes, y para la cual existe hoy en día una fuerte demanda y necesidad de herramientas terapéuticas específicas. En estudios previos hemos demostrado que la presencia de cafeína como adulterante en muestras de PBC es capaz de potenciar su efecto reforzador, aumentar la motivación por la búsqueda de la droga, y facilitar la sensibilización comportamental, fenómeno que refleja la instauración de cambios plásticos en el circuito motivacional. Sin embargo, hasta el momento no se había profundizado en los cambios funcionales y moleculares subyacentes a dicho efecto facilitador de la cafeína.

Esta Tesis propone abordar los mecanismos detrás de la acción potenciadora del adulterante cafeína sobre el efecto reforzador de la PBC, e iniciar la exploración preclínica del CBD como un potencial tratamiento para las personas con dependencia a esta droga. De esta forma, el trabajo de Tesis busca colaborar a la comprensión profunda de las acciones de la PBC en el sistema nervioso central, a la vez de asentar la información obtenida en la progresión hacia la búsqueda de tratamientos efectivos.

Esta tesis contiene resultados que fueron incluidos en tres trabajos científicos publicados en revistas arbitradas internacionales.

Muñiz J*, **Prieto JP***, González B, Sosa M, Cadet JL, Scorza C, Urbano F, Bisagno V. (2017) Cocaine and Caffeine Effects on the Conditioned Place Preference Test: Concomitant Changes on EarlyGenes within the Mouse PrefrontalCortex and NucleusAccumbens. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11:200. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00200. * Primera autoría compartida

Prieto JP, González B, Muñiz J, Bisagno V, Scorza C. (2020) Molecular changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex associated with the locomotor sensitization induced by coca paste seized samples. *Psychopharmacology (Berl)*, Epub ahead of print. doi: 10.1007/s00213-020-05474-3

Prieto JP, López Hill X, Urbanavicius J, Sanchez V, Nadal X, Scorza C. (2020) Cannabidiol prevents the expression of locomotor sensitization and the metabolic response in the nucleus accumbens and prefrontal cortex elicited by the combined administration of cocaine and caffeine in rats. *Neurotoxicity Research*, doi: 10.1007/s12640-020-00218-9

INTRODUCCIÓN

1. ADICCIÓN O DEPENDENCIA DE SUSTANCIAS

De acuerdo al último Reporte Mundial de Drogas, presentado en el 2019 por la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), se estima que alrededor de 271 millones de personas en el mundo consumieron drogas en el 2017, fecha a la que corresponden los datos más recientes (Figura 1; UNODC 2019). De esos 271 millones de personas, aproximadamente 35 millones, casi un 13 %, mantienen un uso problemático de drogas o presentan algún trastorno de salud asociado a su uso, incluida la adicción o dependencia de sustancias (UNODC 2019). Estas cifras ponen de manifiesto la escala y amplitud de la problemática mundial de dependencia de drogas, la cual representa serias dificultades a nivel sanitario, social y económico, además del padecimiento personal de quien atraviesa estos problemas. Los trastornos por consumo de sustancias tienen un gran impacto negativo en la salud de las personas dependientes, incluida la desintegración familiar, la violencia doméstica, el abandono escolar, la pérdida de empleo, la incidencia de accidentes y delitos. Esto implica además un gran coste para el estado en forma de atención médica hospitalaria y ambulatoria, paliación de consecuencias sanitarias, y pérdida de fuerza laboral activa, entre otros (UNODC 2019). Esta situación se ve agravada, además, por el hecho de que aún no se han alcanzado estrategias terapéuticas seguras y exitosas para la dependencia de sustancias. La búsqueda de tratamientos efectivos que colaboren a la recuperación de la persona y al mantenimiento de la abstinencia, es uno de los mayores retos vigentes en la problemática global de la adicción a drogas.

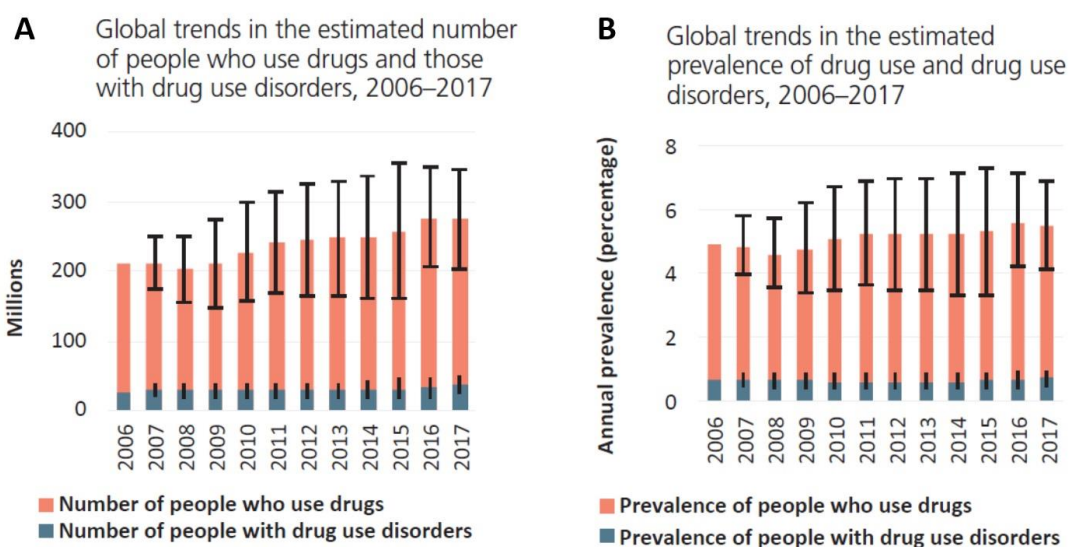


Figura 1. A. Estimado de personas adultas que usaron drogas y de aquellas con trastornos por consumo de sustancias en el último año. B. Prevalencia anual de consumo de drogas y trastornos asociados a su uso en adultos. Tomado de UNODC 2019.

La adicción o dependencia de sustancias, se define como un desorden de recaída crónica, que se caracteriza por un ansia compulsiva por la búsqueda y el consumo de la droga, pérdida progresiva del control del consumo a pesar de intentos de evitarlo, y la emergencia de un estado emocional negativo (disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando el acceso a la droga es impedido (APA 2013, Koob y Simon 2009, Volkow y cols. 2019). Clínicamente, el uso ocasional y limitado de una sustancia psicoactiva se diferencia del consumo crónico y el desarrollo de una dependencia (Koob y Simon 2009). Desde una perspectiva neurobiológica, la adicción se conceptualiza como un trastorno del cerebro que emerge por la exposición repetida a una droga, en el contexto de interacciones biopsicosociales entre varios elementos. Entre ellos se incluyen los efectos farmacológicos de la droga, vulnerabilidades individuales (factores genéticos y epigenéticos, etapa del desarrollo, patologías previas), conectividad social inadecuada, y otros factores socioculturales, como el estatus legal, asequibilidad y disponibilidad de la droga, entre otros (Berridge 2017, Volkow y cols. 2019).

La noción de adicción dentro de la política internacional, así como el abordaje a la problemática del abuso de drogas, ha sido reconceptualizada en la pasada Sesión Especial de la Asamblea General de las Naciones Unidas (UNGASS) sobre Drogas, celebrada en el 2016. En dicha reunión, con la asesoría de expertos mundiales en la temática y en base a la evidencia científica disponible, los 193 Estados miembros reconocieron de forma unánime a la adicción como “un trastorno de salud multifactorial complejo, caracterizado por una naturaleza crónica con recaídas” (Volkow y cols. 2017). La definición realizada en la UNGASS 2016 resulta de gran importancia, porque desplaza la problemática de drogas del ámbito de la justicia criminal y la ubica como un problema de Salud Pública, y a la adicción como un trastorno de salud “prevenible y tratable” (Volkow y cols. 2017).

En este contexto, los expertos de la UNGASS 2016 y la Comisión Lancet (un grupo de expertos en la temática de drogas que trabajó de forma paralela a la UNGASS) realizaron una serie de recomendaciones para el abordaje integral de la problemática de drogas. Dentro de estas recomendaciones, se destaca el apoyar la investigación científica en el tema drogas, incluyendo el estudio de los efectos de las drogas en el cerebro y el comportamiento, así como la exploración del potencial terapéutico de sustancias controladas, como los cannabinoides (Csete y cols. 2016, Volkow y cols. 2017). Estas recomendaciones son fundamentales para identificar nuevos blancos y oportunidades terapéuticas, y avanzar hacia la implementación de tratamientos para la dependencia de sustancias basados en evidencia. Al día de hoy, sólo existen tratamientos farmacológicos aprobados para la dependencia a opioides, nicotina y alcohol, aunque su eficacia es limitada y cuentan con altas tasas de recaída (Uhl y cols. 2019, Volkow y cols. 2019). La dependencia a otras drogas, como cannabis y psicoestimulantes, aún no cuenta con ninguna medicación aprobada.

2. PASTA BASE DE COCAÍNA

2.1. Definición y forma de consumo

La pasta base de cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso que se define como una cocaína fumable, y pertenece a la categoría de los psicoestimulantes (Hynes y cols. 2016). La misma se obtiene en las primeras etapas del proceso de extracción del alcaloide cocaína hasta la producción de clorhidrato de cocaína, a partir de las hojas de coca del arbusto *Erythroxylum coca* (Figura 2; Castaño 2000, Pascale y cols. 2014). Dicho proceso implica la maceración de las hojas de coca en una solución con amoníaco u otra sustancia alcalina, solventes orgánicos como Kerosene o gasoil, y ácido sulfúrico. La mezcla resultante contiene un porcentaje variable de cocaína en su forma de base, e impurezas que surgen del proceso químico de extracción, como restos de solventes y metabolitos de la planta (Casale y Klein1993, ElSohly y cols. 1991, UNODC 2013). Finalizado este proceso, la PBC obtenida tiene la apariencia de un polvo de consistencia pastosa, de color blanco amarillento o amarronado.

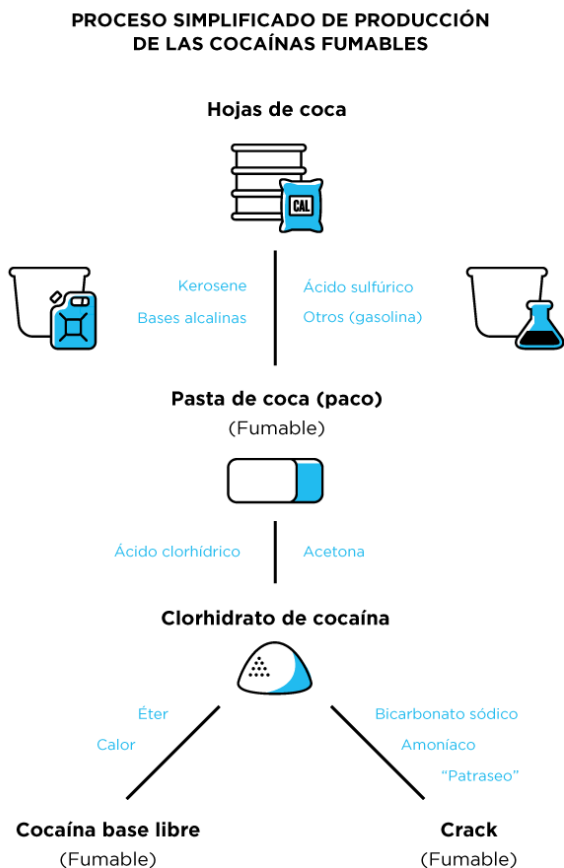


Figura 2. Esquema simplificado del proceso de producción de cocaínas fumables, incluido pasta base de cocaína. Puede apreciarse que pasta base de cocaína constituye un paso previo a la obtención de clorhidrato de cocaína, mientras que otras formas fumables de cocaína, como cocaína base libre o crack, constituyen un paso posterior.

La PBC suele venderse con el agregado de adulterantes y diluyentes (Chicahual y cols. 2019, Hynes y cols. 2016, Sabogal y Urrego 2012). La adición de estas sustancias es una práctica común en el mercado ilícito de drogas, usualmente con el fin de aumentar el volumen, facilitar la administración (al disminuir la temperatura de volatilización o vaporización, por ejemplo), e imitar o potenciar el efecto de la droga (Cole y cols. 2011, Pascale y cols. 2019). El término “adulterante” suele referirse a sustancias agregadas que son farmacológicamente activas, mientras que “diluyentes” se refiere a sustancias inertes (Cole y cols. 2010). Los adulterantes pueden tener un efecto psicoactivo *per se*, interactuar con el componente activo de la droga, o ambas, por lo que pueden alterar significativamente el efecto de la droga (Pascale y cols. 2019). Los adulterantes constituyen, por lo tanto, un factor relevante que debe ser considerado a la hora de estudiar los efectos neurobiológicos de drogas de abuso ilegales.

La comercialización de la PBC ocurre principalmente bajo dos formas: la “tiza” para el tráfico internacional y local, y “chasqui”, que es la forma que se vende dosificada al consumidor (Figura 3). Cada “chasqui” o “dosis” suele poseer entre 0,1-0,5 gramos de PBC, mientras que las tizas pesan entre 10-15 gramos (Moraes y cols. 2010, Pascale y cols. 2010). Los “chasquis” se consumen mediante pipas u otros dispositivos similares de fabricación casera, y es común la mezcla de PBC con otras drogas como tabaco y marihuana (Pascale y cols. 2010, Pascale y cols. 2014).

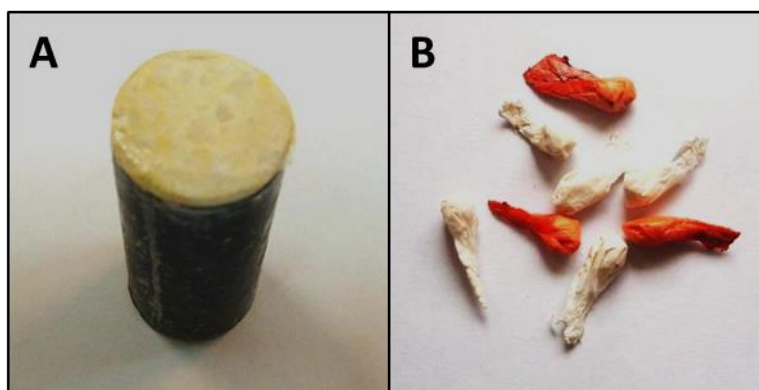


Figura 3. Muestras representativas de PBC en sus dos formas de comercialización. (A) “Tiza” para el tráfico internacional y local. (B) Forma dosificada o “chasqui”.

2.2. Efectos centrales y periféricos

El consumo de PBC genera un potente y veloz efecto estimulante y euforizante (Pérez 2003), facilitado por la vía de administración. La inhalación del humo de PBC permite que sus componentes sean absorbidos a gran velocidad y en alta cantidad, dada la gran irrigación que existe a nivel pulmonar. A su vez, su naturaleza liposoluble

le permite atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica, lo que en conjunto determina que la PBC alcance el Sistema Nervioso Central (SNC) en pocos segundos (Lizasoain y cols. 2002) y se experimente una rápida sensación de placer. Sumado a esto, durante esta etapa inicial de euforia los consumidores de PBC suelen experimentar alteraciones psicomotrices como hiperactividad motora, estereotipias, hiperexcitabilidad y aceleración de los procesos del pensamiento. También se observan acciones fisiológicas, como aumentos en la presión arterial, temperatura, frecuencia respiratoria y cardíaca. Al cesar estos efectos a los pocos minutos del consumo, sobreviene una etapa disfórica, en la que los consumidores pueden experimentar sensaciones de angustia, ansiedad, depresión, miedo, apatía, indiferencia sexual, y un deseo incontrolable de volver a consumir (*craving*). La intensidad de esta etapa disfórica puede propiciar un nuevo episodio de consumo con el fin de evitar dicho estado emocional negativo, y en ocasiones resultar en episodios de consumo intenso e ininterrumpido en períodos de tiempo reducidos (*binges*) (Jeri 1984, Pérez 2003, Triaca y cols. 2009).

Al consumirse de forma crónica, los reportes describen un perfil clínico característico de los consumidores de PBC, marcado por un fuerte deterioro biopsicosocial. El mismo incluye la aparición de alteraciones en el sueño, reducción acentuada del peso corporal, envejecimiento arterial prematuro y debilitamiento cardiovascular, alteraciones de memoria y concentración, pérdida de flexibilidad cognitiva, conductas antisociales, desinhibición, irritabilidad e impulsividad. En algunos casos, dependiendo de la cantidad consumida, también puede observarse la aparición de conductas agresivas, depresión mayor con ideaciones suicidas, y episodios de psicosis paranoide y alucinaciones (Galéra y cols. 2013, Kapitán y cols. 2014, Pérez 2003, Triaca y cols. 2009, Vallejo-Reyes 2019).

A nivel neurobiológico, un estudio del flujo sanguíneo cerebral en consumidores activos de PBC utilizando tomografía por emisión de fotón simple (SPECT), demostró la presencia de hipofuncionalidad en la corteza prefrontal (PFC) en relación a sujetos no consumidores (Ferrando y cols. 2009). Estos resultados son coherentes con el trabajo de Vallejo-Reyes (2019), el cual reporta una mayor desinhibición y disfunción ejecutiva en la Escala de Comportamiento del Sistema Frontal¹ en personas con dependencia a PBC, en relación a personas no consumidoras. Es importante mencionar, sin embargo, que la abstinencia prolongada fue capaz de revertir la hipofuncionalidad frontal observada en los consumidores de PBC (Ferrando y cols. 2009), lo que sugiere fuertemente la ausencia de efectos neurotóxicos permanentes en esta región.

En conjunto, algunos de los efectos subjetivos y fisiológicos producidos por PBC, como el aumento de alerta, euforia o placer, y desinhibición, son similares a los observados por otros psicoestimulantes no fumables, como la cocaína en su forma de clorhidrato.

¹ Instrumento psicométrico para evaluar cambios no cognitivos en la conducta, de origen frontal (Grace y Malloy 2001).

Sin embargo, la velocidad del establecimiento de la dependencia, así como otras características como el deterioro físico y cognitivo, rotura de códigos sociales y conductas vinculadas con violencia, delinean un perfil clínico diferencial para los consumidores de PBC, que se asemeja al de otras cocaínas fumables (Gálera y cols. 2013, OUD 2014, Pascale y cols. 2014).

2.3. Problemática asociada al consumo de PBC

El consumo de PBC constituye uno de los principales desafíos en materia de drogas a nivel regional (Pascale y cols. 2014, UNODC 2013). El mismo se encuentra reportado desde las décadas del 70 y 80, en principio delimitado a los países productores de clorhidrato de cocaína como Colombia, Bolivia y Perú, siendo este último donde se describió el primer caso clínico de adicción a PBC (Jeri y cols. 1978; UNODC 2013). En Uruguay, el consumo de PBC se encuentra registrado desde el año 2000, aunque el mismo se expandió e instauró definitivamente en el mercado de drogas a partir del año 2002 (OUD 2007, Moraes 2014). De acuerdo a los datos recabados en la 6ta Encuesta Nacional en Hogares sobre Consumo de Drogas (OUD 2016), el consumo de PBC en nuestro país presenta una prevalencia de vida de 0.7 %; una prevalencia baja en comparación con otras drogas como la cocaína (6.8 %) y marihuana (23.3 %). Es importante tener en consideración que el consumo de PBC se caracteriza por presentar una marcada segmentación territorial y socioeconómica, de forma que en zonas más vulnerables se han registrado prevalencias de consumo más altas, llegando a alcanzar un 4 % (OUD 2013, Suárez y cols. 2014). Aun así, debido a su alta vulnerabilidad social, los usuarios problemáticos de PBC conforman lo que se conoce como “población oculta”, pudiendo no reflejarse en las estadísticas debido a que el método de estimación empleado (encuesta en hogares) no resulta adecuado para esta población específica (OUD 2016). Es altamente probable, por lo tanto, que los valores de prevalencia de consumo, aunque bajos, se encuentren subestimados. Sin embargo, y a pesar de que la PBC es una de las drogas comparativamente menos consumidas, el daño en la salud que ocasiona en sus consumidores y el impacto que genera en su entorno a nivel social y sanitario, hacen que la droga posea una alta visibilidad y que al día de hoy continúe siendo una de las mayores preocupaciones nacionales en materia de drogas (Pascale y cols. 2010, OUD 2016).

Uno de los desafíos cruciales de la problemática del consumo de PBC es su gran poder adictivo, pudiendo inducir un alto y rápido grado de dependencia en sus consumidores. Los reportes indican que el 53 % de quienes consumieron PBC en el último año presenta signos de dependencia. Dicha relación es extremadamente alta en comparación con otras drogas de abuso (34% para cocaína; 16,6 % para marihuana;

5,5% para el alcohol) y posiciona a la PBC como la droga con el mayor potencial adictivo de nuestro país (OUD 2012, Suarez y cols. 2014).

La alta dependencia inducida por PBC podría explicarse por la conjunción de factores biopsicosociales y las características del consumo. Según los datos epidemiológicos (OUD 2013, Suarez y cols. 2014, Triaca y cols. 2009), los consumidores de PBC suelen estar expuestos a factores asociados a un alto riesgo de iniciar un consumo problemático de drogas y dependencia, como los son habitar ambientes con carencias económicas y vinculares que generan estrés y falta de apoyo social (Swendsen y LeMoal 2011), fácil accesibilidad a las drogas (Freisthler y cols. 2005), y falta de factores reforzadores alternativos (Khoddam y cols. 2018).

A su vez, existen evidencias que demuestran que la velocidad con la cual la droga alcanza el cerebro es uno de los factores fundamentales en la determinación de la intensidad del efecto subjetivo (*high*) y del potencial adictivo (Gossop y cols. 1992, Samaha y Robinson 2005). La PBC se consume por la vía de inhalación pulmonar, una de las vías de administración más rápidas junto con la vía intravenosa (Lizasoain y cols. 2002). Se ha argumentado que ésta puede ser la razón por la que el crack, otra cocaína fumable, es más adictiva que la cocaína por vía intranasal (clorhidrato) (Gossop y cols. 1992, Hatsukami y Fischman 1996). En este sentido, se piensa que la rápida vía de administración de la PBC constituye uno de los factores que explicarían el perfil clínico diferencial observado en sus consumidores. Sin embargo, la PBC no es una droga pura, y sus componentes son capaces de promover distintos niveles de estimulación en el SNC e incidir en el poder adictivo de la droga (López-Hill y cols. 2011, Prieto y cols. 2016). La composición química de la PBC, incluyendo la presencia y efecto de sus adulterantes, también debe ser considerada en el estudio de la alta dependencia asociada a su consumo.

Debido a los fuertes efectos fisiológicos y comportamentales, y su alto nivel de dependencia, las cocaínas fumables son consideradas como una de las drogas más dañinas, tanto para los consumidores como para su ambiente social (Nutt y cols. 2010, Van Amsterdam y cols. 2015). Específicamente, Van Amsterdam y colaboradores (2015) realizaron un análisis de múltiples criterios con datos provenientes de toda Europa, considerando varios tipos de daño físico, psicológico y social de numerosas drogas, tanto para la persona consumidora como para terceros. El resultado de dicho análisis ubica al crack (cocaína fumable de mayor presencia en Europa) en tercer lugar de las drogas más dañinas, luego del alcohol y la heroína (Van Amsterdam y cols. 2015).

La alta nocividad de las cocaínas fumables es constatada por los propios consumidores de PBC, quienes mantienen una elevada percepción de riesgo sobre su consumo. Esto queda de manifiesto en el informe del Observatorio Uruguayo de Drogas sobre el consumo de cocaínas fumables, presentado en noviembre del 2017. En él se presentan los datos obtenidos a partir de la red Tratamiento Registra, un sistema de registro

continuo de personas en atención y tratamiento por uso problemático de drogas (OUD 2017). Los datos muestran que el 53,1 % de las personas que demandaron atención por uso problemático de drogas, lo hicieron debido al consumo de cocaínas fumables (principalmente PBC, aunque también crack). La segunda droga por la cual se realizaron consultas fue la cocaína, constituyendo un 23 % de los casos, un valor mucho menor al registrado para PBC. A su vez, de los consumidores de PBC, un 62,8 % reportó una frecuencia de consumo diaria. Para cocaína ese valor fue de 18.1 %, reforzando la diferencia en el potencial adictivo con PBC (OUD 2017).

Frente a este escenario, una dificultad en la atención a los consumidores reside en que, si bien hay consenso en utilizar un protocolo terapéutico para la dependencia a PBC, éste no es específico, sino sintomático, puede acarrear efectos secundarios y depende de las fases en las que se encuentre la persona (Barrenechea y cols. 2007). Esta dificultad, sumado a la alta demanda de asistencia, deja en evidencia la necesidad de contar con nuevos apoyos terapéuticos eficaces que faciliten los tratamientos y la abstinencia prolongada en los consumidores de PBC.

3. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

3.1. Teorías biológicas de la transición a la adicción y reforzamiento. Etapas del ciclo adictivo

No todas aquellas personas que consumen drogas de manera recreacional desarrollan un incremento progresivo del craving y una adicción (Anthony y cols. 1994, Deroche-Gamonety cols. 2004). A su vez, aquellas que sí lo hacen, pueden mantenerse en un estado de vulnerabilidad a las recaídas incluso luego de meses o años de abandonado el consumo, y a pesar de tener una motivación consciente de mantenerse en abstinencia (Volkow y cols. 2019). Comprender las bases neurales y psicológicas detrás de la transición del uso inicial de drogas al uso compulsivo y la dependencia, ha sido y continúa siendo el foco de gran cantidad de investigación. Esto ha llevado a la formulación de diferentes teorías sobre el desarrollo de la dependencia, y las causas de la dificultad para cesar el consumo y evitar las recaídas (Bechara y cols. 2019, Bickel y cols. 2018). Cada una de las teorías vigentes se focaliza fuertemente en diferentes aspectos del proceso adictivo, como la recompensa, la formación de hábitos, el estrés y la abstinencia, la sensibilización y craving, y la desregulación cognitiva y pérdida del autocontrol (Bechara y cols. 2019). Estas teorías, en su mayor parte no son excluyentes entre sí, y todas pueden aplicar en distinto grado dependiendo la etapa del ciclo adictivo. Brevemente, a continuación se reportan dos teorías que juntas se refieren a procesos complementarios que serán evaluados en esta tesis, con el fin de poner en perspectiva la temática de estudio dentro de un marco más amplio, el cual ejemplifica el ciclo adictivo.

Una de las teorías, propuesta por Robinson y Berridge (1993), es generalmente conocida como teoría de sensibilización de incentivo. Esta teoría se basa en la afirmación de que el consumo repetido de drogas puede inducir neuroadaptaciones persistentes en regiones del SNC, que sensibilizan progresivamente al organismo y los circuitos neurales involucrados a los efectos de la droga y las claves contextuales asociadas a su consumo (Berridge y Robinson 2016, Robinson y Berridge 1993). La teoría se centra en el concepto de recompensa, la cual de acuerdo a estos autores se compone principalmente de dos elementos disociables psicológica y neurobiológicamente: el “liking” y “wanting” (Berridge y cols. 2009, Olney y cols. 2018). El “liking” se refiere a la carga hedónica de la recompensa, mientras que el “wanting” se refiere a la *saliencia de incentivo*, un tipo de motivación que promueve la búsqueda y consumo de la recompensa (Berridge y cols 2009). La saliencia puede entenderse como el valor o importancia biológica que se le otorga a un estímulo en un momento determinado, y es fundamental para la supervivencia (Kalivas y Volkow 2005). Según esta teoría, la exposición repetida a drogas genera una sensibilización del sustrato neural de la motivación y adjudicación de saliencia en individuos vulnerables, que resulta en la atribución de niveles patológicos de saliencia de incentivo a las drogas y las claves asociadas a la misma. Esto lleva a la instauración progresiva de un “wanting” compulsivo, caracterizado por la búsqueda y consumo de la droga, sin que haya “liking” asociado (Berridge y Robinson 2016, Olney y cols. 2018).

Si bien el concepto crítico de la teoría lo constituye la sensibilización de incentivo, la hipersensibilidad de los circuitos neurales necesaria para su expresión puede acompañarse también de otros fenómenos, como en el caso de los psicoestimulantes, de una sensibilización a los efectos psicomotores de la droga (Robinson y Berridge 2008). Considerando que la activación psicomotora refleja la activación de los mismos sistemas de incentivo en el cerebro, la sensibilización motora se utiliza a menudo como evidencia de hipersensibilidad en la circuitería motivacional relevante para la saliencia de incentivo (Flagel y cols. 2008, Robinson y Berridge 2008, Wise y Bozarth 1987).

El aprendizaje, especialmente el aprendizaje asociado al establecimiento de asociaciones predictivas entre la obtención de recompensa y acciones o claves contextuales, es otro aspecto clave de la recompensa y la sensibilización de incentivo (Berridge y cols. 2009). Este mismo tipo de aprendizaje es también un aspecto crucial de otra de las teorías sobre la dependencia, sostenida por Everitt y Robbins (2005), la cual propone que el comportamiento de búsqueda y consumo de drogas es progresivamente evocado como un hábito rígido (estímulo-respuesta), por estímulos que fueron asociados a la droga mediante mecanismos de aprendizaje y condicionamiento (Everitt y Robbins 2005, Everitt y Robbins 2016). De esta forma, los autores proponen a la dependencia como el punto final de una serie de transiciones, desde el uso de drogas voluntario inicial o recreativo, a través de la pérdida progresiva

del control sobre el consumo. (Everitt 2014). Este proceso se esquematiza en la Figura 4, y comienza con la adquisición del comportamiento de consumo en personas con vulnerabilidad a la dependencia. En estas primeras etapas es relevante el aprendizaje de incentivo, que puede facilitar el establecimiento de un uso sostenido. Aquí, el reforzamiento condicionado y el establecimiento de asociaciones aprendidas puede facilitar la instauración de hábitos de consumo maladaptativos del tipo estímulo-respuesta. De continuar el consumo de forma crónica y consolidándose el hábito de consumo, el mismo puede progresar al uso compulsivo, incluso en presencia de consecuencias negativas, una de las características definitorias de la adicción (Figura 4) (Everitt 2014). El ciclo delineado incluye además una potencial abstinencia y recaída, elementos que también forman parte de la dependencia.

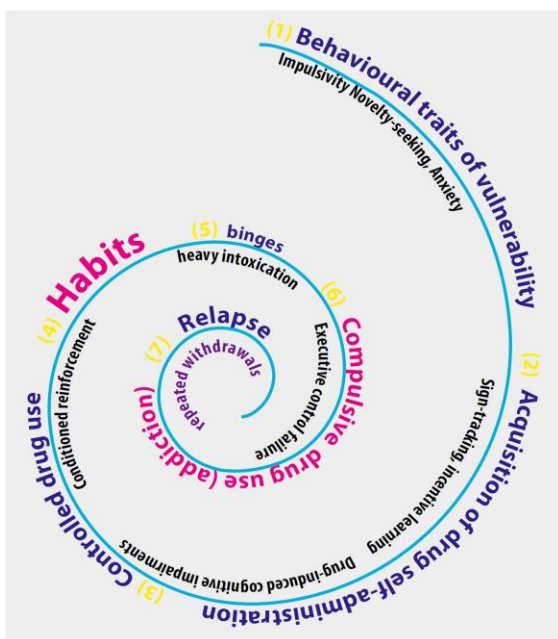


Figura 4. Resumen esquemático del ciclo adictivo propuesto por Everitt y Robbins. Se señalan los procesos psicológicos que pueden ocurrir en la transición de la búsqueda y consumo voluntario de la droga, a la pérdida de control sobre su uso y la emergencia de hábitos compulsivos de búsqueda de droga. Tomado de Everitt 2014.

Presentadas ambas teorías, se puede apreciar entonces que la sensibilización y el condicionamiento son procesos relevantes en el desarrollo adictivo, y participan de la transición del uso controlado de drogas a la dependencia. La intensidad y velocidad de estos procesos se ve fuertemente influenciada por la propiedad reforzadora de la droga. La acción reforzadora se refiere a la tendencia de un estímulo a fortalecer las asociaciones aprendidas de estímulo-respuesta (o de recompensa-comportamiento), y así aumentar la probabilidad que se repita el comportamiento asociado a la recompensa (Everitt y Robbins 2005, White 1989). Una droga con un alto poder reforzador, podría entonces facilitar un desarrollo veloz de la dependencia a través de procesos de sensibilización y condicionamiento.

Cada una de las etapas mencionadas y las transiciones dentro del ciclo adictivo reclutan y son mediadas por diferentes circuitos, que involucran un juego particular de regiones del SNC asociadas a la recompensa, motivación, aprendizaje, funciones

ejecutivas, y motoras (Everitt 2014, Koob y Volkow 2016). Por lo tanto, dilucidar los factores que inciden en el efecto reforzador y la aparición de la dependencia a drogas adictivas como la PBC, exige el estudio de sus efectos y mecanismos de acción a nivel del SNC, asociados a los procesos antes descritos. Comprender los correlatos anatómicos y moleculares de fenómenos vinculados al desarrollo adictivo a la PBC, puede aportar información esencial para desarrollar estrategias farmacológicas más efectivas para el tratamiento de la dependencia a esta droga.

3.2. Circuito motivacional

Las bases neurobiológicas del efecto reforzador y motivacional de las sustancias adictivas incluyen un rol preponderante del circuito motivacional o de recompensa (Koob y Volkow 2010, Volkow y Morales 2015). Este circuito participa en la atribución de saliencia a un estímulo determinado, y en la modulación de la respuesta conductual frente al mismo. Es así que este circuito resulta clave en la mediación del efecto motivacional y reforzador de estímulos recompensantes naturales, como lo son la búsqueda de pareja sexual y la conducta alimentaria, aunque también en el efecto de las drogas adictivas (Kalivas y Volkow 2005). El circuito motivacional compromete varias regiones interconectadas y a diferentes sistemas de neurotransmisión (Figura 5). Entre ellos, se destaca particularmente el sistema dopaminérgico (DAérgico) mesolímbico, el cual posee un papel fundamental en el efecto recompensante y reforzador de las drogas de abuso (Piercey Kumaresan 2006). Este sistema está formado por neuronas DAérgicas cuyos somas están ubicados en el área tegmental ventral (VTA) y sus axones se extienden hasta el núcleo accumbens (NAc), amígdala, pálido ventral e hipocampo. Las neuronas del VTA envían también conexiones recíprocas hacia la PFC, conformando el circuito mesocortical. De esta forma, la actividad del VTA es capaz de regular mediante sus proyecciones DAérgicas, el flujo de información entre los distintos núcleos del circuito motivacional (Carr y Sesack 2000, Piercey Kumaresan 2006, Sesack y Grace 2010).

Las neuronas DAérgicas del VTA presentan una actividad tónica basal, con disparos de baja frecuencia (1-8 Hz), aunque pueden también mostrar una actividad fásica de alta frecuencia (<500ms, >15Hz) frente a estímulos determinados (Volkow y Morales 2015). La actividad fásica de estas neuronas resulta en un aumento de la liberación de dopamina (DA) en el NAc y PFC en relación al modo tónico. Todas las drogas de abuso, a través de diferentes mecanismos farmacológicos, generan un aumento de DA en el NAc (DiChiara e Imperato 1988) que imita en sus consecuencias la activación fásica de las neuronas DAérgicas del VTA. En el caso del psicoestimulante cocaína, por ejemplo, este efecto se alcanza debido a su capacidad para bloquear el transportador de DA (DAT) en las terminales sinápticas. Esta acción inhibe su recaptación, y resulta en la

acumulación de DA a nivel extracelular en la hendidura sináptica, lo que favorece la neurotransmisión DAérgica (Pierce y Kumaresan 2006, Lizasoain y cols. 2002).

El aumento de DA en el NAc ha sido inicialmente considerado como la señal cerebral que codifica la recompensa, aunque teorías y hallazgos más recientes le adjudican un rol más amplio, incluida la codificación de la saliencia de un evento o estímulo determinado (Bromberg-Martin y cols. 2010, Volkow y cols. 2009). La saliencia de un estímulo puede estar dada por su efecto reforzador, su novedad, o el hecho de que sea algo inesperado, ya sea algo positivo o negativo, como la aparición de un estresor (Bromberg-Martin y cols. 2010, Volkow y cols. 2009, Volkow y Morales 2015). En este sentido, la DA funcionaría como un señalador de eventos ambientales nuevos y motivacionalmente relevantes (Bromberg-Martin y cols. 2010).

La liberación fásica de DA también se ha asociado a la expectativa condicionada de la recompensa. Específicamente, se ha demostrado un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas DAérgicas del VTA frente a la presencia de claves contextuales que predicen la recompensa. Si, en cambio, la recompensa esperada no se materializa, el disparo de las células DAérgicas se inhibe (Schultz 2002). Este rol de la DA es fundamental en el reforzamiento condicionado, el desarrollo de hábitos de consumo, comportamiento de búsqueda de droga impulsado por claves contextuales, y recaídas (Everitt 2014, Volkow y cols. 2011).

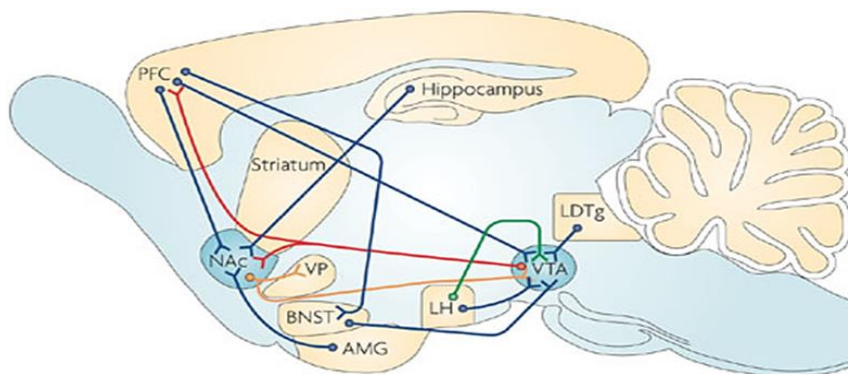


Figura 5. Esquema simplificado del circuito DAérgico mesocorticolímbico en el cerebro de rata. Por claridad, se muestran sólo algunas de las proyecciones involucradas. Se puede apreciar el rol del núcleo accumbens (NAc) como centro integrador de información proveniente de diferentes regiones del circuito. En azul, proyecciones glutamatérgicas; rojo, proyecciones DAérgicas; amarillo, proyecciones GABAérgicas; verde, proyecciones orexinérgicas. VTA, área tegmental ventral; AMG, amígdala; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; LDTg, tegmento laterodorsal; LH, hipotálamo lateral; PFC, corteza prefrontal; VP, pálido ventral. Tomado de Kauer y Malenka 2007.

El nivel de activación de las neuronas DAérgicas del VTA se ve regulado por sus múltiples aferencias (Figura 5) (Sesack y Grace 2010). En ratas, la PFC envía proyecciones glutamatérgicas que contactan directamente a las neuronas DAérgicas del VTA, pudiendo ejercer control excitatorio sobre su nivel de actividad y la subsecuente liberación de DA (Koob y Volkow 2016, Sesack y Grace 2010). Considerando que las células DAérgicas del VTA proyectan fuertemente al NAc, estas proyecciones glutamatérgicas de la corteza pueden contribuir al efecto reforzador y el desarrollo de la saliencia de incentivo (Koob y Volkow 2016).

El VTA también recibe aferencias glutamatérgicas del tegmento pedunculopontino (PPTg), las cuales son un potente inductor de la actividad fásica de las neuronas DAérgicas frente a estímulos comportamentalmente relevantes (Sesack y Grace 2010). El tegmento laterodorsal (LDTg) constituye otra aferencia del VTA, con componentes glutamatérgicos y colinérgicos. La actividad del LDTg es de gran importancia, ya que la misma es requerida para la descarga fásica de las neuronas DAérgicas del VTA mediada por glutamato (proveniente del PPTg). Se ha reportado que la inactivación del LDTg (por la administración local de agonistas GABAérgico, baclofen y muscimol) impide la descarga fásica de las neuronas de DA, incluso luego de la administración exógena de glutamato (Lodge y Grace 2006).

Otras proyecciones que alcanzan al VTA provienen del hipotálamo lateral (LH) y la habénula. Las proyecciones del LH contienen componentes glutamatérgicos, GABAérgicos y orexinérgicos que participan en aspectos apetitivos y motivacionales de la recompensa (Kauer y Malenka 2007, Nieh y cols. 2016). La habénula, en cambio, envía proyecciones glutamatérgicas que hacen sinapsis en las interneuronas GABAérgicas del VTA, y de esa forma inhibe indirectamente las neuronas DAérgicas, facilitando estados aversivos (Meye y cols. 2013). La habénula forma parte del sistema de anti-recompensa², y como tal, promueve estados disfóricos y contribuye al incremento de la sensibilidad y reactividad al estrés; el llamado “lado oscuro de la adicción” (Koob y LeMoal 2008, Volkow y Morales 2015).

El NAc, región crítica del circuito motivacional, actúa como un centro de conectividad o “hub” dentro del circuito (Figura 5). El mismo sirve como interfaz integrativa entre la información motivacional de las regiones límbicas y regiones de control motor, para regular e impulsar los comportamientos dirigidos a una meta, de acuerdo a la saliencia de la misma en cada momento (Volkow y cols. 2019).

Además de su aferencia DAérgica, el NAc recibe inervación excitatoria desde la PFC, amígdala basolateral, tálamo e hipocampo (Kalivas y Volkow 2005, Sesack y Grace 2010). La activación cortical del NAc desde la PFC se ha relacionado con la selección,

²Concepto basado en la hipótesis de que hay sistemas en el cerebro que se activan frente a una actividad excesiva del circuito de recompensa inducida por drogas, con el fin de limitarla. Involucra el reclutamiento de sistemas de estrés/emocionales, aportando una carga hedónica negativa (Koob y LeMoal 2008).

promoción y mantenimiento de un plan motor/comportamental apropiado y dirigido hacia la adquisición de recompensa (Goldstein y Volkow 2011). En este sentido, es fundamental el rol de la PFC en la inhibición de respuesta, entendida como la supresión de acciones que resultan inapropiadas en un contexto determinado y que interfieren con el comportamiento dirigido a una meta (Mostofsky y Simmonds 2008). Este proceso permite la flexibilización comportamental y cognitiva, y participa en el mantenimiento del autocontrol (Volkow y cols. 2019). La PFC también participa en la estimación de la saliencia de un estímulo determinado, y la evaluación del costo/beneficio del comportamiento necesario para su obtención (Goldstein y Volkow 2011).

Las proyecciones desde el hipocampo al NAc, en especial aquellas que se originan en el subículo ventral, proveen información espacial y contextual al sistema, y son fundamentales para el aprendizaje condicionado característico del proceso adictivo, el cual relaciona claves del ambiente con la disponibilidad y los efectos de la droga (Koob y Volkow 2010, Sesack y Grace 2010). Por otro lado, la amígdala basolateral es una estructura importante en el establecimiento de asociaciones condicionadas y la atribución de valor afectivo a un estímulo determinado. Su conexión con el NAc se relaciona con la saliencia otorgada a claves asociadas con la recompensa, y con la respuesta afectiva frente a estímulos salientes (Wassum e Izquierdo 2015). Además de inervar al NAc, la PFC, el hipocampo (subículo ventral) y la amígdala basolateral se encuentran interconectadas entre ellas mediante proyecciones glutamatérgicas, por lo que existe un gran nivel de integración de información entre estas estructuras funcionalmente relacionadas (Sesack y Grace 2010).

La amígdala extendida, particularmente el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), también participa de este sistema a través de sus conexiones con el NAc y VTA. El BNST contribuye al comportamiento de búsqueda de recompensa y en respuestas asociadas al estrés, aportando información de aspectos ambientales e interoceptivos de valencia negativa (Cleck y Blendy 2008, Kauer y Malenka 2007). Respecto a estos últimos, vale la pena mencionar las conexiones recíprocas existentes entre la ínsula y el NAc. La ínsula está involucrada en la conciencia interoceptiva y la experiencia emocional, por lo que contribuye a la percepción consciente del estado interno, las sensaciones y estados afectivos asociados a un evento determinado, como el consumo de un elemento recompensante. De esta forma, la actividad de esta región puede contribuir a la memoria asociada al consumo de drogas, craving y recaídas (Bechara y cols. 2019, Naqvi y Bechara 2010).

Por último, el NAc también recibe aferencias desde el tálamo, probablemente involucradas en el *arousal* y en dirigir la atención hacia eventos comportamentalmente relevantes (Sesack y Grace 2010).

Las eferencias del NAc son GABAérgicas y discurren principalmente hacia el pálido ventral y VTA, aunque también proyectan hacia la sustancia nigra, el hipotálamo y el tronco encefálico. El pálido ventral interconecta con el tálamo, ya sea de forma directa

o indirecta (a través del núcleo subtalámico y la sustancia nigra pars reticulata), y constituye una vía de información desde los ganglios basales hacia la corteza (Koob y Volkow 2010, Sesack y Grace 2010). De esa forma la información de diversas áreas integrada en el NAc vuelve a la corteza, donde puede facilitar o inhibir el plan motor asociado a la obtención de recompensa.

Es importante mencionar que el proceso adictivo posee también un fuerte componente motor asociado a los efectos reforzadores de las drogas de abuso, que involucra la participación del sistema DAérgico nigroestriatal, no considerado dentro del circuito motivacional. Este sistema se origina en las neuronas de la sustancia nigra pars compacta y abarca sus proyecciones hacia el cuerpo estriado dorsal (DS), área fuertemente implicada con el control del movimiento (Koob y Volkow 2010). Se ha demostrado que la sobreactividad de este sistema está asociada al efecto estimulante y comportamientos estereotipados inducidos por drogas psicoestimulantes (Kuczenski y cols. 1991).

Existen evidencias que muestran que la innervación DAérgica en el DS participa a su vez en la formación y aprendizaje de hábitos, con asociaciones del tipo estímulo-respuesta. Tanto en roedores como en humanos, se ha evidenciado un aumento en la liberación de DA en el DS durante el craving y la búsqueda de cocaína, cuando la misma está asociada a un estímulo condicionado (Ito y cols. 2002, Volkow y cols. 2006). En este sentido, se cree que el DS resulta fundamental en la transición de la búsqueda inicial y voluntaria de la droga, a la instauración progresiva de hábitos persistentes y rígidos asociados al consumo, que caracterizan la adicción (Everitt y Robbins 2005, Ito y cols.2002).

Como se puede apreciar en la descripción anterior, las acciones neurobiológicas de estímulos recompensantes como las drogas de abuso, involucran a una compleja trama de regiones y circuitos interconectados. El consumo de drogas de forma repetida y crónica, genera cambios plásticos y duraderos en esta red, los cuales pueden facilitar las sucesivas modificaciones asociadas al desarrollo progresivo del proceso adictivo. En este sentido, una de las teorías neurobiológicas de la adicción propone, en base a estudios pre-clínicos y el uso de técnicas de imagenología en la clínica, que los cambios inducidos por drogas en este circuito generan la alteración de dos importantes funciones neuropsicológicas mencionadas previamente: la atribución de saliencia y la inhibición de respuesta (Goldstein y Volkow 2002, Goldstein y Volkow 2011). De forma más específica, las autoras proponen que la alteración por drogas (crónico) de los componentes límbicos y de aprendizaje asociativo del circuito, generan la atribución de una saliencia exagerada a la droga y a las claves asociadas a la droga, mientras que sus acciones en la corteza prefrontal disminuyen su capacidad de inhibir los comportamientos maladaptativos o desventajosos. Esto puede resultar en una disminución de la saliencia hacia reforzadores naturales, de forma que la búsqueda y consumo de drogas pasa a ser el foco motivacional principal, a expensas de otras

actividades. En personas con dependencia, el progreso de este fenómeno puede culminar con la aparición de comportamientos extremos con el fin de obtener la droga (Anselme 2009, Goldstein y Volkow 2011). Por sus características definitorias, este modelo se lo conoce como trastorno de inhibición de respuesta y atribución de saliencia (iRISA por su sigla en inglés: *impaired Response Inhibition and Saliience Attribution*) (Goldstein y Volkow 2011).

Vale la pena destacar en este contexto una revisión reciente realizada por Zilverstand y colaboradores (2018), en la se realiza una actualización de este modelo. Los autores analizan 105 estudios de imagenología del 2010 en adelante que incluyen personas con dependencia a distintas sustancias. En consumidores crónicos de psicoestimulantes analizados en estado de reposo, hallaron una mayor conectividad y acoplamiento entre regiones involucradas en la recompensa, saliencia, hábitos, interocepción, memoria y aprendizaje; y también entre estas regiones y los circuitos de funciones ejecutivas (ver regiones específicas en Figura 6). Por otro lado, también se halló una disminución en el acoplamiento entre regiones de la corteza involucradas en el control ejecutivo y la inhibición de respuesta (Zilverstand y cols. 2018). Estos resultados coinciden con el estudio de la perfusión cerebral en consumidores activos de PBC mencionado previamente (Ferrando y cols. 2009), el cual reporta una disminución del flujo sanguíneo en la PFC de dichas personas. La menor actividad de la PFC podría reflejar un detrimento en el control inhibitorio, lo que a su vez podría asociarse con la alta impulsividad y dificultad para limitar el consumo que caracteriza a esta droga, particularmente durante la abstinencia precoz (Ferrando y cols. 2009). A su vez, un trabajo reciente demostró una interocepción aumentada en personas dependientes a PBC (de la Fuente y cols. 2019), lo que también está en concordancia con los hallazgos de Zilverstand y cols. (2018), que implican una mayor preponderancia y conectividad de la ínsula con el sistema mesolímbico en personas con adicción (ver Figura 6).

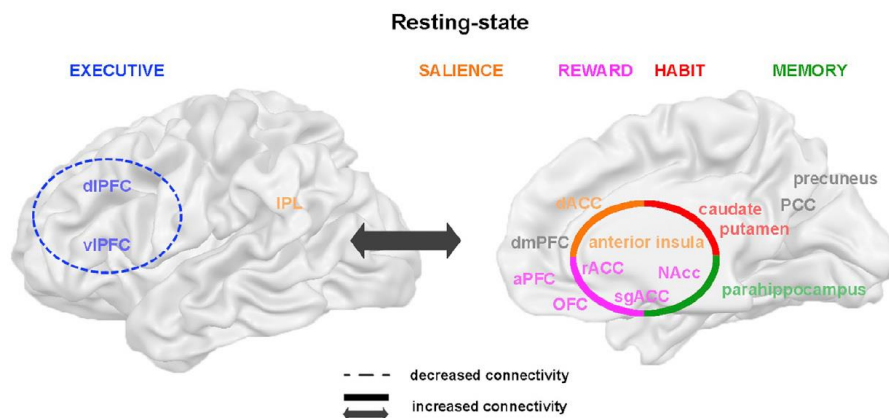


Figura 6. Conectividad funcional alterada durante el estado de reposo en consumidores crónicos de psicoestimulantes. Las redes de saliencia, recompensa, hábitos y memoria tienen un mayor acoplamiento funcional, mientras que se observó una disminución en el acoplamiento funcional en la red de control ejecutivo. aPFC, PFC anterior; OFC, corteza orbitofrontal, dACC/sgACC/rACC, corteza cingulada dorsal/subgenual/rostral; PCC, corteza cingulada posterior. Tomado de Zilverstand y cols. 2018.

En base a lo expuesto, resulta evidente que tanto el NAc como la PFC son regiones protagónicas en la acción de drogas adictivas y la transición hacia la dependencia, y sustratos esenciales en las teorías modernas de las bases biológicas de la adicción. El NAc como centro de conectividad integrador dentro del circuito, y con un rol clave en el efecto recompensante y la percepción de saliencia asociada; y la PFC como sustrato de la inhibición de respuesta, regulador de la saliencia de incentivo y el comportamiento condicionado (Koob y Volkow 2016). Es así que en este trabajo de Tesis se priorizó el análisis de estas regiones sobre los demás integrantes del circuito motivacional. A continuación se resumen algunas características morfológicas del NAc y la PFC, así como datos de su participación en la mediación de los efectos del consumo de psicoestimulantes.

3.2.1. NAc: composición celular y su rol en la acción de psicoestimulantes

El NAc es parte del estriado ventral, junto con el tubérculo olfatorio (Voorn y cols. 2004). Aproximadamente el 90 - 95 % de las células que lo componen son neuronas espinosas medias (MSNs) de proyección GABAérgica. El resto del contenido neuronal lo componen interneuronas de circuitos locales, que incluyen neuronas colinérgicas y tres tipos de interneuronas GABAérgicas definidas por su perfil de expresión proteica: aquellas que expresan parvalbúmina, las que expresan calretinina, y las que coexpresan somatostatina y neuropéptido Y (Scofield y cols. 2016). El NAc también posee células gliales, principalmente astrocitos, los cuales participan en la regulación de la señal glutamatérgica de las aferencias excitatorias (Kalivas 2009). Las MSNs pueden subdividirse en dos subpoblaciones distintas de acuerdo al tipo de receptor DAérgico y neuropéptidos de expresión preferencial. Una población expresa principalmente el receptor DAérgico D1, sustancia P y dinorfina, mientras que la otra población expresa preferencialmente receptores D2 y encefalina (Scofield y cols. 2016). D1 y D2 son receptores metabotrópicos con efectos opuestos en la cascada de señalización intracelular, lo que hace que las MSNs respondan de forma diferente frente a la DA, otorgándole distintas propiedades fisiológicas. Los receptores tipo D1 están acoplados a la familia de proteínas $G_{\alpha s/olf}$ que estimulan la enzima adenilil ciclasa, lo que promueve la formación de AMP cíclico (cAMP). El cAMP activa a su vez la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) y otras proteínas dependientes de cAMP. Estas activarán distintas cascadas de señales que finalmente tendrán un efecto en la regulación de la expresión génica a través de factores de transcripción, como por ejemplo la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). La activación del receptor D1, a su vez, repercute en un aumento de la excitabilidad celular, dada por un incremento de las corrientes mediadas por receptores ionotrópicos glutamatérgicos, la activación de canales de calcio voltaje-dependientes (tipo L), y la inhibición de canales de K^+ (Savica y Benarroch 2014). Los

receptores de tipo D2, en cambio, están acoplados a proteínas $G_{\alpha i/o}$, lo que resulta en la inhibición de la adenilil ciclasa y la subsecuente producción de cAMP, con efectos celulares opuestos en la señalización intracelular y expresión génica respecto a los inducidos por D1 (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Su activación genera una disminución en la excitabilidad celular y la liberación de neurotransmisor, dada por la activación de canales de K^+ e inhibición de los canales de calcio voltaje-dependientes (Savica y Benarroch 2014). A nivel estriatal, esta distribución diferencial de estos receptores en las MSNs define las vías directa (MSNs con D1) e indirecta (MSNs con D2). La activación de la vía directa suele asociarse a efectos recompensantes, mientras que la activación de la vía indirecta con la reducción de dichos efectos (Lobo y Nestler 2011).

Algunas poblaciones de neuronas del NAc también expresan receptores D3 (pertenecientes a la familia de receptores DAérgicos tipo D2), que pueden co-localizar tanto con receptores D1 como D2 en las MSNs (LeMoine& Bloch 1996). Sin embargo, es más frecuente que se localicen en las MSNs con D1, pudiendo generar heterómeros D1-D3 con interacciones sinérgicas a nivel intracelular (Marcellino y cols. 2008). La estimulación de D3 en estos heterómeros, por lo tanto, potencia los efectos comportamentales mediados por los receptores D1. Estas acciones del D3 estarían mediadas por otras vías de señalización intracelular, independientes a PKA (sobre la cual tiene acciones opuestas a D1), como la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Marcellino y cols. 2008).

Las MSNs del NAc expresan además los receptores de adenosina A1 y A2A de manera diferencial. En particular, los receptores A1 se localizan principalmente en las MSNs que contienen D1, mientras que los receptores A2A co-localizan sobre todo con el receptor D2 (Ferré 2008). Estos receptores presentan efectos farmacológicos intracelulares opuestos: A1 está negativamente acoplado a la vía de la adenilil ciclasa, y reduce los niveles de cAMP, mientras que A2A favorece la actividad de la enzima y producción de cAMP, potenciando esta vía de señalización (Ferré 2008). Por lo tanto, la unión de adenosina a sus receptores genera una acción intracelular que se contrapone a las señales iniciadas por la activación de los receptores DAérgicos con los que co-localizan. La adenosina endógena actúa aquí como un regulador importante de la transmisión DAérgica (Cauli y Morelli 2005, Fisone y cols. 2004). A su vez, los receptores A1 y A2A son capaces de formar complejos heterómeros con los receptores D1 y D2 respectivamente. Al unirse la adenosina a estos complejos se ha registrado una reducción en la afinidad y eficacia de la unión de la DA (y otros ligandos DAérgicos) a sus receptores. Esto añade otro nivel de regulación al sistema, e incluso se ha planteado la formación de estos heterómeros como una condición necesaria para mantener las interacciones agonísticas entre los receptores acoplados a proteína Gs (A2A o D1) y a proteínas Gi (D2 o A1) (Ferré y Ciruela 2019, Ferré y cols. 2018b).

Numerosas evidencias han mostrado que la administración aguda o repetida de cocaína y otras drogas psicoestimulantes aumenta los niveles extracelulares de DA en el NAc, lo que refleja la activación del sistema mesolímbico (Carboni y cols. 1989, DiChiara e Imperato 1988, Volkow y cols. 2009). La actividad DAérgica en el NAc es esencial para el procesamiento del efecto recompensante y reforzador de las drogas adictivas, y como se mencionó anteriormente, en favorecer la aparición de comportamientos orientados a la obtención de estímulos motivacionalmente relevantes (Floresco 2014, Volkow y cols. 2019). Es importante señalar, sin embargo, que si bien el NAc posee lo que se conoce como *hotspots* hedónicos y participa en el procesamiento del aspecto hedónico de la recompensa, este fenómeno no está mediado por la DA, sino por otros sistemas de neurotransmisión, siendo el sistema opioide el más significativo (Berridge y Kringelbach 2015, Berridge y Robinson 1998, Castro y Berridge 2014).

Aun así, la estimulación DAérgica repetida por las drogas de abuso genera neuroadaptaciones en este sistema de transmisión, repercutiendo indirectamente en los aspectos hedónicos de la recompensa (Volkow y cols. 2019).

Más allá del componente hedónico, la DA en el NAc es fundamental para la recompensa, y en especial para la saliencia de incentivo, proceso que se encuentra en la base del desarrollo adictivo (ver sección 3.1). Esta señal es de gran relevancia ya que con la administración repetida de psicoestimulantes y otras drogas adictivas, se ha descrito una disminución progresiva del “liking” (hedónico) y un incremento del “wanting” (saliencia de incentivo) (Berridge and Robinson 2016).

Evidencias pre-clínicas resaltan la importancia del incremento de DA en el NAc en el efecto reforzador de los psicoestimulantes. Se ha reportado que el aumento en los niveles de DA en el NAc inducido por cocaína se correlaciona significativamente con su efecto psicomotor estimulante (Sellings y cols. 2006), así como con las primeras etapas del comportamiento de búsqueda y autoadministración de cocaína (D’Souza y Duvauchelle 2006, Ikegami y Davauchelle 2004). Las evidencias indican además que, para ejercer un efecto reforzador, el incremento de DA inducido por la droga debe ser lo suficientemente grande y rápido como para estimular a ambos tipos de receptores DAérgicos. Esto se debe a que la DA tiene una mayor afinidad por los receptores D2 que los D1. Por lo tanto, frente a la actividad tónica basal de las fibras DAérgicas se activan principalmente los receptores D2, y su estimulación no está asociada a recompensa (Caine y cols. 2002). Los receptores D1, en cambio, suelen activarse con la actividad fásica de las fibras DAérgicas, cuando ocurren aumentos rápidos de DA, y su sola estimulación es suficiente para ejercer efectos recompensantes (Caine y cols. 2007). Sin embargo, los receptores D2 no están completamente ocupados con la DA basal, y su activación también incrementa con la DA fásica, de forma tal que la mayor efectividad en el efecto recompensante ocurre cuando se activan los receptores D1 y D2 simultáneamente (Steinberg y cols. 2014).

Estas evidencias coinciden con datos de imagenología cerebral en humanos, que reportan que el incremento rápido de DA (<10 min) en el NAc generado por drogas está asociado a los reportes subjetivos de recompensa (sensación de “high”). Si el incremento de DA se realiza de forma gradual, incluso alcanzando los mismos niveles, no se reporta sensación de recompensa (Volkow y cols. 2000, Volkow y cols. 2009). Esto puede explicar, en parte, por qué vías de administración más rápidas como la inhalación pulmonar o la inyección intravenosa, son consideradas más recompensantes y adictivas que aquellas vías que resultan en una captación más lenta y progresiva, como la administración oral o intranasal.

La DA está definida como un neurotransmisor modulador, por lo que su principal función en el NAc se considera que es la modulación del impacto de las aferencias excitatorias sobre la actividad de las neuronas del NAc, principalmente las MSNs (Floresco 2014). Estudios neuroanatómicos, han mostrado que las aferencias excitatorias convergen en la cabeza de las espinas dendríticas de las MSNs, mientras que las neuronas DAérgicas hacen sinapsis preferencialmente a la altura del cuello de las espinas, una posición clave en la regulación de la relevancia de la señal glutamatérgica (Girault 2012). Las MSNs expresan receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos, tanto receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), como de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Schofield y cols. 2016). Esta sinapsis es un sustrato clave de procesos de plasticidad dentro del circuito motivacional. La exposición repetida a psicoestimulantes induce cambios duraderos en la transmisión y homeostasis glutamatérgica en el NAc (ver sección 3.3. Sensibilización comportamental), que alteran la comunicación cortico-límbica, y se asocian al establecimiento de la dependencia y la vulnerabilidad duradera a la recaída (Kalivas 2004, Kalivas 2009).

Por otra parte, el NAc no es una estructura homogénea, sino que comprende distintas sub-regiones denominadas “shell” y “core”, las cuales se distinguen en sus aferencias y proyecciones, microcircuitaría y rol funcional (Zahm 1999). Estudios anatómicos y funcionales indican que el NAc shell está relacionado con la recompensa y las respuestas no condicionadas a las drogas, mientras que el NAc core está involucrado en la ejecución de las respuestas motoras frente a contextos o estímulos motivacionalmente relevantes (Ito y cols. 2000, Wolf 2010). En este sentido, el aumento de DA en el NAc shell se ha asociado al efecto recompensante agudo de psicoestimulantes, y a la asociación de las propiedades sensoriales de estímulos apetitivos novedosos con sus consecuencias biológicas (Di Chiara y cols. 2004). Esto último es de importancia para el establecimiento de asociaciones predictivas entre dichos estímulos y su valor recompensante, una relación necesaria para el inicio de la búsqueda y el condicionamiento contextual (Berridge y cols. 2009). Por otro lado, la hiperactividad DAérgica en el NAc core se halla implicada principalmente en los aspectos motores de la recompensa, incluidos el aprendizaje entre una acción y su

consecuencia reforzadora (condicionamiento operante o instrumental) y la facilitación de la respuesta comportamental dirigida hacia la obtención de recompensa (Di Chiara y cols. 2004, Ito y cols. 2000).

3.2.2. mPFC: composición celular y su rol en la acción de psicoestimulantes

La mPFC es un elemento clave del sistema mesocorticolímbico, y se ha demostrado que participa en un amplio rango de funciones cognitivas y comportamentales, como la atención, aprendizaje y memoria, planificación, inhibición de respuesta, flexibilización del comportamiento y toma de decisiones (Dalley y cols. 2004). La desregulación de estas funciones altera el balance entre la ejecución e inhibición del comportamiento, respuestas que forman parte integral del desarrollo adictivo (Goldstein y Volkow 2011). Aunque esta región se encuentra expandida en humanos en relación a roedores, existe una correspondencia en las características y vías neuroquímicas y moleculares de las distintas áreas de la PFC. (ver Figura 7). Esto permite el abordaje pre-clínico de los mecanismos corticales que participan en el desarrollo adictivo, como la pérdida de control sobre los comportamientos de consumo (Koob y Volkow 2016, Moorman y cols. 2015).

En ratas, la mPFC se refiere a las estructuras localizadas sobre la región medial de la PFC, e incluye distintas subregiones definidas como corteza cingulada anterior (ACC), corteza prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) (Dalley y cols. 2004). La mPFC ejerce el control ejecutivo sobre la selección e iniciación de comportamientos de búsqueda y consumo de la droga a través de sus proyecciones al NAc, el cual recluta estructuras motoras tales como el DS y el pálido ventral, como se describió anteriormente (Volkow y cols 2019).

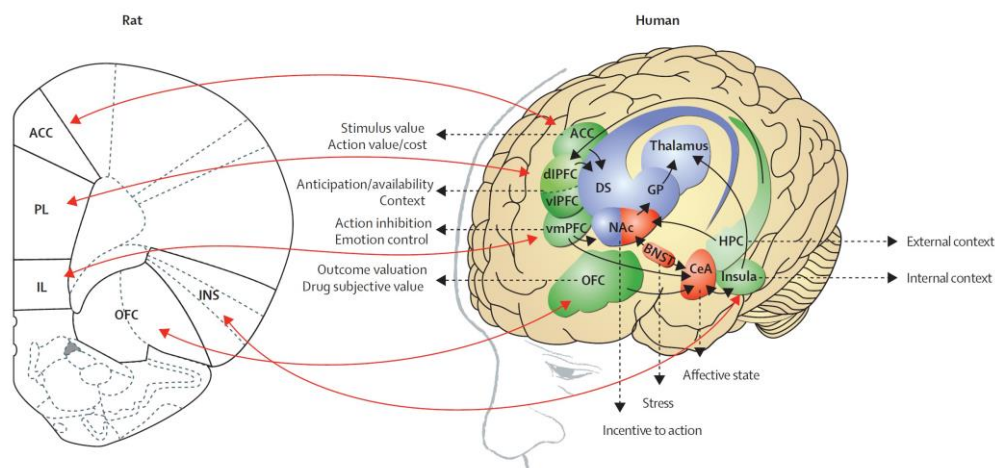


Figura 7. Correspondencia entre zonas de la corteza prefrontal de ratas y humanos, relevantes en la adicción. ACC=corteza cingulada anterior; PL= corteza prelímbica; IL=corteza infralímbica; OFC=corteza orbitofrontal; INS=ínsula; dlPFC=corteza prefrontal dorsolateral; vlPFC=corteza prefrontal ventrolateral; vmPFC=corteza prefrontal ventromedial; DS=estriado dorsal; GP=globo pálido; NAc=núcleo accumbens; BNST= núcleo del lecho de la estría terminal; CeA=núcleo central de la amígdala; HPC=hipocampo. Tomado de Koob y Volkow 2016.

La participación de la mPFC en el efecto reforzador de psicoestimulantes está bien establecida. La administración de cocaína facilita la autoestimulación eléctrica intracraneal de la mPFC en ratas (McGregor y cols. 1992), y a su vez, estos animales son capaces de autoadministrarse cocaína directamente en esta región (Goeders y Smith 1993). La infusión de DA y cocaína en la mPFC también es capaz de facilitar la reinstalación del comportamiento de búsqueda de cocaína (McFarland y Kalivas 2001, Park y cols. 2002).

Sin embargo, se ha descrito que las subregiones de la mPFC poseen distintos roles en los comportamientos motivados, incluidos aquellos relacionados con el consumo de drogas y la dependencia. En este sentido, se ha reportado que existen diferencias en el patrón de proyección de la PrL e IL hacia las regiones del circuito de recompensa (Figura 8). En cuanto al NAc, la PrL inerva preferencialmente el NAc core, mientras que la IL proyecta principalmente al NAc Shell (Moorman y cols. 2015). En base a esta inervación diferencial, se ha propuesto un modelo dicotómico, que propone que la PrL es esencial para el desarrollo de respuestas orientadas a una meta y la expresión de la búsqueda de recompensa, mientras que la IL participaría fundamentalmente en la extinción del condicionamiento a estímulos apetitivos, incluyendo la restricción de la búsqueda de droga (Gourley y Taylor 2016). En este sentido, estudios farmacológicos confirmaron que la inactivación de la PrL con lidocaína (mediante la inhibición de los canales de sodio voltaje-dependientes) disminuyó el condicionamiento y el comportamiento de búsqueda de cocaína (Di Pietro y cols. 2006). Por el contrario, la inactivación de la IL, potenció la respuesta en la extinción tardía a cocaína en un modelo de autoadministración (Peters y cols. 2008).

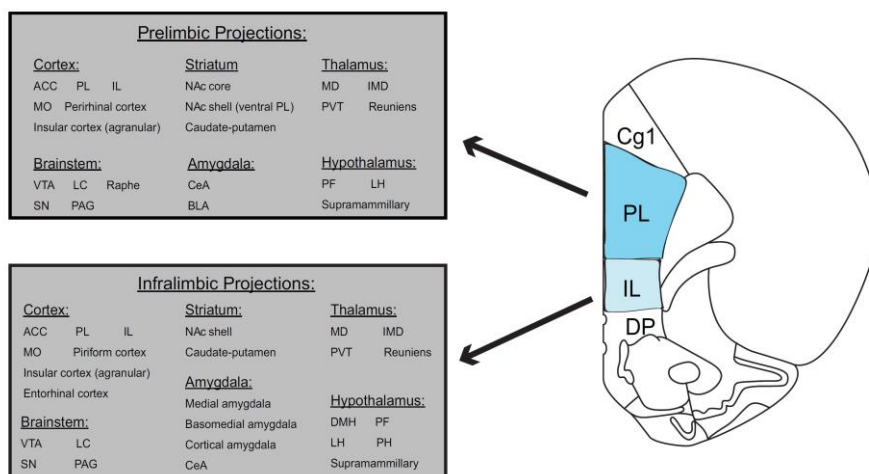


Figura 8. Representación esquemática de las proyecciones de la PL e IL a regiones relacionadas con la recompensa. ACC/Cg1= corteza cingulada anterior; BLA= amígdala basolateral; CeA= amígdala central; IL= corteza infralímbica; IMD= tálamo intermediodorsal; LC= locus coeruleus; LH= hipotálamo lateral; MD= tálamo mediodorsal, MO= corteza orbital medial; NA= núcleo accumbens; PAG= sustancia gris periacueductal; PF= área perifornical del hipotálamo; PH= hipotálamo posterior; PL= corteza prelímbica; PVT= tálamo paraventricular; SN= sustancia nigra; VTA= área tegmental ventral. Tomado de Moorman y cols. 2015.

Por otro lado, hay reportes que sugieren que el rol de la PrL e IL puede variar de acuerdo al modelo utilizado y la etapa del ciclo adictivo (Moorman y cols. 2015). En otros experimentos, la activación optogenética de la PrL en ratas expuestas a cocaína previno la búsqueda compulsiva de la droga, mientras que su inhibición la potenció (Chen y cols. 2013). De hecho, existe evidencia consistente tanto a nivel clínico como pre-clínico, que la exposición repetida a psicoestimulantes induce una disminución en la actividad y conectividad de la PFC, que se asocia al debilitamiento de los mecanismos de autocontrol e inhibición de respuesta, característicos de la adicción (Volkow y cols. 2019, Zilverstand y cols. 2018, Goldstein y Volkow 2011).

En roedores, existen reportes que sugieren que el condicionamiento y la recaída inducida por una dosis de la droga involucran las proyecciones glutamatérgicas de la mPFC al NAc, las cuales están moduladas por los receptores tipo D1 y D2 presentes en la mPFC (Koob y Volkow 2016). En particular, los D1 y D2 se localizan tanto en las neuronas piramidales como en las interneuronas distribuidas a lo largo de las capas II a la VI de la mPFC, siendo más abundantes los D1 que D2 (Bisagno y cols. 2016). También se ha descrito la presencia de receptores D2 y D3 a nivel pre-sináptico, donde su activación induce una disminución en la señal DAérgca (DeMei y cols. 2009). En la pre-sinapsis glutamatérgica, de manera interesante, se ha descrito la presencia de D1, cuya activación también induce una disminución de la liberación de neurotransmisor, así como la presencia de receptores D2 (Gao y cols. 2001). La mayor concentración de estos receptores se encuentra en las espinas dendríticas, junto con las terminales glutamatérgicas y DAérgicas, sitio clave en fenómenos de plasticidad sináptica (Yao y cols. 2008). La actividad sostenida de D1 en esta región puede incrementar la expresión de receptores AMPA y NMDA, así como su traslocación a la sinapsis glutamatérgica, y facilitar mecanismos de plasticidad a largo plazo (potenciación a largo plazo, LTP). Concomitantemente, la activación de D2 disminuye la expresión y translocación de receptores AMPA. Los incrementos excesivos de DA inducidos por psicoestimulantes como la cocaína, pueden generar cambios maladaptativos a través de estos mecanismos de plasticidad (Bisagno y cols. 2016, Huang y cols. 2004). Asimismo, los receptores D1 en la mPFC exhiben una curva de dosis-respuesta en forma de "U". Su activación con cantidades óptimas de DA está asociada a una correcta función glutamatérgica y performance cognitivo, mientras que una activación subóptima o excesiva, como la inducida por psicoestimulantes, se asocia a una disminución de la señal y excitabilidad de las neuronas glutamatérgicas (Goldman-Rakic y cols. 2000). Esto coincide con la hipoactividad frontal hallada en consumidores crónicos de cocaína (Volkow y Morales 2015).

3.3. Sensibilización comportamental

La exposición repetida a psicoestimulantes genera un aumento progresivo y duradero de sus efectos comportamentales y reforzadores, lo que se conoce como sensibilización comportamental (Anderson y Pierce 2005). Este es un fenómeno común en el desarrollo adictivo, y si bien es característico de los psicoestimulantes (cocaína, anfetamina), también ha sido demostrado para otras drogas de abuso, como nicotina, D-9-tetrahydrocannabinol (THC), morfina y alcohol (Nona y cols. 2018, Pierce y Kalivas 1997, Robinson y Berridge 2008, Scofield y cols. 2016). La sensibilización comportamental para psicoestimulantes se asocia directamente con la sensibilización locomotora, ya que se caracteriza por la potenciación de la respuesta locomotora frente a una re-exposición a la droga, luego de un tratamiento repetido y un período de abstinencia (Pierce y Kalivas 1997, Vanderschuren y Kalivas 2000). La importancia de este fenómeno radica en que el mismo refleja neuroadaptaciones persistentes similares a aquellas que subyacen a comportamientos característicos de la dependencia, incluida la reinstauración de los comportamientos de búsqueda y consumo de droga (Liu y Steketee 2016, Steketee y Kalivas 2011, Vanderschuren y Kalivas 2000).

La secuencia de neuroadaptaciones que resultan en la sensibilización pueden separarse en dos componentes temporales distintos: el desarrollo y la expresión. El desarrollo de la sensibilización se ve reflejado en el aumento progresivo de la actividad locomotora durante el tratamiento repetido con la droga, en el cual se describe una secuencia transitoria de eventos celulares, que llevará a los cambios en la función neural responsables del aumento locomotor. La expresión, en cambio, se ve reflejada en una hiperactividad persistente frente a la droga luego de un período de abstinencia, y se asocia a alteraciones duraderas en la función neural que surgen del proceso de desarrollo, las cuales median de forma directa la respuesta locomotora potenciada. (Anderson y Pierce 2005, Pierce y Kalivas 1997).

La sensibilización comportamental inducida por cocaína se encuentra ampliamente reportada y establecida en la literatura (Crombag y cols. 2002, Kalivas y Duffy 1993, Kalivas y Stewart 1991, Kalivas y cols. 1988, Seymour y Wagner 2008). Las alteraciones y neuroadaptaciones asociadas a este fenómeno están mediadas por el circuito mesocorticolímbico (Pierce y Kalivas 1997, Steketee y Kalivas 2011). En particular, la potenciación de la locomoción observada en la expresión de la sensibilización en roedores (luego de la dosis desafío de la droga), se acompaña de una actividad DAérgica aumentada en el NAc (Dos Santos y cols. 2018, Kalivas y Duffy 1993, Scofield y cols. 2016). De hecho, se ha sugerido que las neuroadaptaciones en el NAc son las responsables principales de la expresión de la sensibilización a cocaína (Anderson y Pierce 2005), junto con la disminución de la modulación inhibitoria sobre la transmisión excitatoria proveniente de la mPFC (Stketee 2005). Dentro de las

neuroadaptaciones descritas en el NAc se encuentran la presencia de hipersensibilidad de los receptores DAérgicos postsinápticos D1 y D2, e hiposensibilidad de los autoreceptores D2 (Vanderschuren y Kalivas 2000). También se ha descrito una alteración en la expresión de receptores tipo D1 y D2 luego del tratamiento repetido con cocaína, aunque los resultados son contradictorios (Kleven y cols. 1990, Puig y cols 2012, Unterwald y cols. 1994), probablemente debido a diferencias en los protocolos de administración (Puig y cols. 2014).

Los cambios comportamentales persistentes observados en la sensibilización a cocaína también se han asociado a fenómenos de plasticidad estructural. Algunos de los cambios más significativos incluyen alteraciones en la morfología e incremento en la densidad de dendritas y espinas dendríticas de las MSNs (Robinson y Kolb 2004, Russo y cols. 2010). Esto se acompaña de una reorganización de los receptores AMPA en las espinas dendríticas y cambios en la corriente mediada por este receptor, usualmente cuantificada como la relación entre AMPA/NMDA (Russo y cols. 2010, Scofield y cols. 2016, Wolf y Ferrario 2010). El fortalecimiento de estos elementos y una mayor expresión de receptores AMPA en las espinas dendríticas está asociado a la inducción de LTP, mientras que, por el contrario, la retracción de estos elementos se asocia a el establecimiento de una depresión a largo plazo (LTD). Que predomine un proceso sobre el otro dependerá del protocolo utilizado y la etapa en la que se encuentre, pudiendo incluso variar en la abstinencia temprana y tardía (Russo y cols. 2010). Asimismo, el desafío con cocaína en animales sensibilizados a esta droga induce una mayor liberación de glutamato en el NAc (Pierce y cols. 1996, Cornish y Kalivas 2001). De manera interesante, estos efectos en la transmisión glutamatérgica resultan más robustos frente a la presencia de claves ambientales asociadas a la exposición a cocaína (Scofield y cols. 2016). La asociación de contexto es un fenómeno común en los protocolos de sensibilización con psicoestimulantes, y señala el reclutamiento de circuitos relacionados con el aprendizaje asociado a recompensa y el estado de búsqueda/anticipación de la droga (Vanderschuren y Pierce 2010). Si bien la asociación de contexto no es una condición necesaria para el establecimiento de la sensibilización, animales que reciben cocaína en su caja necesitan dosis más altas y tratamientos más intensos que aquellos que reciben la droga en un ambiente novedoso, que permite establecer asociaciones aprendidas de manera más sencilla (Li y cols. 2004).

Existen numerosos protocolos para estudiar la sensibilización comportamental a psicoestimulantes, aunque generalmente se utilizan regímenes de inyecciones diarias no contingentes, de 7 o más días de duración, seguido de un período de abstinencia variable (Crombag y cols. 2002, Pierce y Kalivas 1997, Seymour y Wagner 2008). La abstinencia constituye una etapa crucial en el proceso de sensibilización, en la cual se consolidan varias de las adaptaciones producidas por la droga mencionadas previamente (Kuhar y Pilotte 1996, Pierce y Kalivas 1997). De esta forma, el tiempo de

abstinencia repercute directamente en el resultado de los tratamientos repetidos, habiéndose reportado una mayor respuesta e intensidad de la sensibilización con períodos de abstinencia prolongados, superiores a 14 días (Pierce y Kalivas 1997).

Las evidencias mencionadas arriba confirman a la sensibilización locomotora como un modelo capaz de aportar información relevante sobre los efectos y mecanismos que participan en el efecto reforzador de drogas psicoestimulantes, así como las neuroadaptaciones asociadas al desarrollo adictivo.

3.4. Condicionamiento y aprendizaje asociado a recompensa

Las asociaciones aprendidas entre los efectos de la droga y los estímulos contextuales en el momento del consumo, son un componente central en la adquisición y mantenimiento del comportamiento de búsqueda de droga, así como en la transición del consumo controlado a la dependencia (Volkow y cols. 2019).

A medida que se desarrolla la dependencia, hay un aumento en el número de estímulos que se asocian con la droga a través de la experiencia, pudiendo adquirir algunos de ellos un carácter predictivo sobre la presencia de recompensa. Una vez establecida esta relación (condicionamiento), las claves contextuales asociadas a la recompensa (estímulo condicionado) pueden adquirir saliencia y saliencia de incentivo, y generar reacciones asociadas a recompensa similares a la droga. (Berridge y Robinson 2016, Volkow y cols. 2006). El condicionamiento puede instalarse para muchos tipos de claves, incluidos lugares, personas y objetos asociados al consumo, e incluso el estado mental y anímico predominante al momento en el que se utilizó la droga (Volkow y cols. 2019). Estas asociaciones perduran en el tiempo, y pueden inducir la recaída incluso luego de meses o años de abstinencia (O'Brien 1998). En este sentido, la exposición a claves asociadas a la cocaína (como imágenes de la parafernalia utilizada para su consumo), e incluso el sólo hecho de relatar experiencias pasadas de consumo, es capaz de inducir un fuerte craving en personas consumidoras de cocaína (Volkow y cols. 2008, Wang y cols. 1999). También se ha evidenciado que las personas con dependencia a cocaína poseen un sesgo en la atención hacia aquellos estímulos que tengan que ver con cocaína, sean positivos o negativos (Dunning y cols. 2011). Este sesgo atencional hacia estímulos capaces de inducir craving, fortalece y confirma la importancia de los procesos de condicionamiento en la vulnerabilidad a las recaídas.

El proceso de condicionamiento a los efectos recompensantes de las drogas de abuso está mediado por la actividad del circuito motivacional. Las claves condicionadas pueden desencadenar un incremento de DA en el NAc, lo que participa en el sesgo atencional y la atribución de saliencia al estímulo condicionado. Con el tiempo esto puede generar una transición a conductas de búsqueda y acercamiento no ya al estímulo recompensante, sino hacia la clave condicionada que anticipa la recompensa

(Berridge y Robinson 2016, Volkow cols. 2019). La capacidad de una droga de establecer asociaciones condicionadas es, por lo tanto, un elemento importante a tener en cuenta al estudiar su potencial y riesgo adictivo.

Un modelo ampliamente utilizado para el estudio del efecto reforzador de drogas de abuso y su capacidad de establecer condicionamiento a claves contextuales, es el de Condicionamiento de Preferencia de Lugar (CPP) (Tzschentke 2007). Este modelo se basa en el concepto de aprendizaje asociado a recompensa, e involucra el establecimiento de asociaciones entre el efecto de una droga (ya sea recompensante o aversivo) y un ambiente con claves sensoriales específicas (Bardo y Bevins 2000).

Si bien existen variaciones del modelo y de los protocolos utilizados, en términos generales el procedimiento del CPP usualmente consiste en tres fases: pre-test o habituación, condicionamiento, y test. Durante el pre-test el animal es colocado en el modelo para que lo explore libremente. El mismo consta de dos cámaras con claves contextuales diferentes, y puede o no tener una tercera cámara de conexión entre ellas. En esta fase se cuantifica la preferencia inicial por uno de los compartimentos, mediante el tiempo que pasa el animal en cada cámara. Durante el condicionamiento, una de las cámaras es asociada con el efecto de la droga (generalmente la no preferida), mientras que la otra es asociada con la administración de salino. Este entrenamiento implica varias sesiones durante algunos días, dependiendo del protocolo utilizado. Luego del condicionamiento, la preferencia se pone a prueba en el test, en el que se permite que el animal explore libremente el modelo en un estado libre de droga, y se cuantifica el tiempo en cada cámara. Si el efecto reforzador de la droga es suficiente para establecer asociaciones aprendidas entre el contexto y la recompensa, se espera que incremente el tiempo en el compartimento asociado a la droga, produciendo CPP (Bardo y Bevins 2000, Tzschentke 2007).

El modelo de CPP ha sido ampliamente utilizado para estudiar el efecto reforzador de cocaína, bajo diferentes dosis y días de condicionamiento (Bedingfield y cols. 1998, Mueller y Stewart 2000, Seymour y Wagner 2008, Zavala y cols. 2003). A su vez, se ha utilizado también para evidenciar la importancia de la vía de administración, dado que, la administración de cocaína por una vía de administración rápida como la vía intravenosa, facilita el establecimiento del CPP (Nomikos y Spyraiki 1988).

La expresión del CPP con cocaína se asocia a un incremento de la actividad DAérgica en el NAc (Tzschentke 2007). De hecho, un estudio realizado por Tsai y colaboradores (2009) sugiere que la sola actividad fásica de las células DAérgicas es suficiente para generar el CPP. En dicho estudio, los autores realizan una estimulación optogenética de las células DAérgicas del VTA, sin la participación de ninguna droga. Los resultados indican que los animales generan una preferencia por el compartimento asociado a la actividad fásica, con el correspondiente incremento de DA, en relación al compartimento asociado a la estimulación tónica (Tsai y cols. 2009). Aún así, existen evidencias que indican que la alta reactividad a claves contextuales asociadas con

drogas depende del desbalance entre la señalización de D1 y D2 (Volkow y cols. 2019). El receptor D1 parece tener un rol preponderante en este proceso, ya que la administración sistémica e intra-NAc del antagonista del receptor D1, SCH23390, previene la expresión de CPP inducido por cocaína (Baker y cols. 1998, Cervo y Samanin 1995). Las manipulaciones del receptor D2, en cambio, parecen ser menos efectivas en alterar el CPP a psicoestimulantes (Baik 2013).

Por otro lado, los psicoestimulantes son drogas que, a las dosis apropiadas, pueden actuar como potenciadores cognitivos y potenciar mecanismos de aprendizaje y memoria (Bisagno y cols. 2016), lo que puede facilitar la instauración del CPP. La mPFC está implicada en la evocación de memorias y en el comportamiento de búsqueda de droga (Dalley y cols. 2004), y se ha demostrado que la misma participa en la adquisición y expresión del CPP a cocaína (Shinohara y cols. 2017, Zavala y cols. 2003). Es importante, por lo tanto, considerar también las funciones de la mPFC en el aprendizaje asociado a recompensa a la hora de estudiar el condicionamiento y efecto reforzador de las drogas de abuso.

3.5. Mecanismos transcripcionales: genes inmediatos tempranos

El fenotipo de las distintas etapas y fenómenos incluidos en el ciclo adictivo, dados por la exposición crónica a drogas de abuso, se acompañan de adaptaciones moleculares en las regiones del circuito de recompensa (Robinson y Nestler 2011). Eric Nestler y su grupo, enfocados en los mecanismos transcripcionales de la adicción, propusieron que cambios en el potencial transcripcional de los genes (a través de la acción de factores de transcripción, modificaciones en la cromatina y ARNs regulatorios no codificantes) contribuyen sustancialmente al desarrollo y mantenimiento de la dependencia (Nestler 2001, Nestler 2012). Según este modelo entonces, la exposición repetida a drogas puede cambiar la capacidad de un gen de ser inducido o reprimido en respuesta a otra dosis de la droga o un estímulo ambiental. Esto provee un mecanismo, inducido por la administración repetida de drogas, por el cual se incrementa de forma sostenida la reactividad a una nueva exposición a la droga o a estímulos asociadas a la misma, favoreciendo la aparición de los procesos de sensibilización y recaída (Robinson y Nestler 2011).

En este modelo, los genes inmediatos tempranos (IEGs) tienen un rol protagónico como uno de los pasos iniciales para la inducción de cambios a largo plazo que producen las drogas en la función neural. Según este el mecanismo de regulación, las drogas de abuso, al actuar en sus blancos sinápticos, alteran la cascada de señalización intracelular, lo que lleva a la activación o inactivación de IEGs. Estos IEGs usualmente codifican para factores de transcripción y otros tipos de proteínas regulatorias, que en última instancia favorecerán o suprimirán la expresión de otros genes y procesos

celulares, lo que contribuye a los cambios a largo plazo asociados a la adicción (Nestler 2012).

Dentro de la enorme variedad de IEGs, algunos de los más estudiados en relación a las neuroadaptaciones inducidas por drogas son los genes de la familia Fos, que incluye a c-Fos, FosB, y los antígenos relacionados a Fos (Fra), Fra1 y Fra2. Estas proteínas de la familia Fos heterodimerizan con proteínas de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD) para formar la proteína activadora 1 (AP1), un factor de transcripción que se une al promotor de ciertos genes y regula su transcripción (Folleta 1996). Las proteínas de la familia Fos se inducen rápida y transitoriamente en regiones del circuito motivacional después de la administración aguda de drogas de abuso, siendo su efecto más significativo en el NAc (Nestler 2012).

Se encuentra bien establecido que la administración aguda de cocaína induce la expresión de la proteína Fos en el NAc y la mPFC (Johansson y cols. 1994, Torres y Rivier 1994, Uslaner y cols. 2001). El tratamiento crónico con cocaína y el condicionamiento a claves contextuales, en cambio, se ha asociado principalmente con un incremento de Fos B en estas regiones, y en particular con la acumulación sostenida de Δ FosB, producto del splicing alternativo de FosB, y una forma mucho más estable de la proteína (Nestler y cols. 2001, Nygard y cols. 2015, Miller y Marshall 2005). Por otro lado, la proteína Fra-2 posee la misma capacidad de unirse a proteínas Jun y formar la AP1 que las proteínas Fos, aunque difiere en la capacidad de inducir y reprimir algunos genes (Suzuki y cols. 1991), y su expresión exhibe una dinámica temporal intermedia entre c-Fos y Δ FosB (Nestler y cols. 2001). En este sentido, algunos reportes señalan un incremento en la expresión del gen fra-2 en el estriado (incluyendo el NAc) y PFC, luego de la administración aguda y repetida de cocaína (Franklin y Druhan 2000, Liu y cols. 2005, Nye y cols. 1995). En cuanto a Fra-1, éste muestra esencialmente las mismas propiedades regulatorias que Fra-2 (Suzuki y cols. 1991).

Además de los genes de la familia Fos, las neuroadaptaciones inducidas por cocaína se han asociado también a la expresión alterada de otros IEGs y otras proteínas regulatorias (no IEGs) en el circuito mesocorticolímbico, muchas de las cuales están involucradas en la regulación de los efectos de la cocaína, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria (Nestler 2012). Entre ellos se encuentran, por ejemplo, CREB (cAMP response element-binding), CART (cocaine and amphetamine regulated transcript), sinaptofisina, Egr1 (early growth response gene 1) y Npas4 (neuronal Per-Arnt-Sim domain protein 4) entre otros (Fritz y cols. 2011, Kuhar 2016, Nestler 2012). De manera interesante, un estudio reciente de Bernardino y colaboradores (2019) analiza el efecto de una muestra de PBC en comportamientos relacionados con la ansiedad y la expresión de IEGs, y describe alteraciones significativas en la expresión de algunos de los genes mencionados previamente. Específicamente, los autores reportan un incremento en la expresión de Egr1, FosB y Δ FosB en el NAc, y una menor

expresión de FosB y Δ FosB en la mPFC, asociados a un aumento de la ansiedad experimental en los animales (Bernardino y cols. 2019). Sin embargo, hasta el momento de esta Tesis no había trabajos que abordaran los cambios en la expresión de IEGs inducidos por PBC en procesos de sensibilización y condicionamiento.

4. TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A DROGAS: USO DE CANNABINOIDES

4.1. Sistema endocannabinoide como nuevo blanco terapéutico

Una de las mayores dificultades a las que se enfrentan las personas con dependencia a drogas psicoestimulantes es que aún no se han alcanzado estrategias exitosas para favorecer su tratamiento. Esto ha llevado a que en la mayoría de los casos los tratamientos se centren principalmente en la disminución sintomática de los efectos agudos de la droga y la abstinencia temprana, y también, dada la alta comorbilidad entre trastornos psiquiátricos y dependencia, en atenuar estados asociados que facilitan las recaídas, como la depresión y la ansiedad (Koob y Mason 2016). Tradicionalmente la búsqueda de nuevos tratamientos se basó en sitios de acción sobre los sistemas de neurotransmisión glutamatérgico y DAérgico, debido a su rol central en los efectos reforzadores de las drogas de abuso y procesos de dependencia y recaída (O'Brien y Gardner 2005). Sin embargo, la alteración directa de estos sistemas suele presentar serios efectos secundarios, lo que dificulta la adherencia y permanencia en el tratamiento. Es en este contexto que el sistema endocannabinoide (sECB) surge como un nuevo blanco terapéutico, ya que se ha demostrado que el mismo participa en los mecanismos de recompensa, y que su modulación mediante el cannabis de uso medicinal, ha reportado efectos secundarios muy bajos o nulos (Prud'homme y cols. 2015).

El sECB está compuesto por un grupo de lípidos endógenos llamados endocannabinoides (ECB), los receptores cannabinoides con los cuales interactúan, y las enzimas encargadas de su biosíntesis y degradación (Mechoulam y Parker 2013). Los ECB son moléculas neuromoduladoras, en su mayoría derivadas del ácido araquidónico, las cuales participan en varios de los procesos fisiológicos del organismo, incluyendo apetito, reproducción, sensación de dolor, memoria y motivación, entre otros (Mechoulam y Parker 2013). Los ECB más estudiados y caracterizados hasta el momento fueron también los primeros en describirse, y estos son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam y cols. 1998). Debido a su naturaleza lipídica, los ECB no se almacenan en vesículas, sino que se sintetizan "a demanda" a través de la escisión de los precursores lipídicos de la membrana, y son inmediatamente liberados a la hendidura sináptica, actuando como mensajeros retrógrados. Una vez realizada su acción, los ECB son rápidamente metabolizados por

la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Mechoulam y cols. 1998, Parson y Hurd 2015). Las acciones de los ECB son mediadas por los receptores CB1 y CB2, ambos metabotrópicos acoplados a proteína G (Mechoulam y Parker 2013). Los receptores CB1 están localizados fundamentalmente en el SNC, dónde se distribuyen en áreas asociadas al control motor y funciones cognitivas, emocionales y sensoriales, como corteza, cerebelo, hipocampo y ganglios basales. Los receptores CB2 se expresan principalmente en células del sistema inmune, aunque existe evidencia de que también se expresan en neuronas, glía, y células endoteliales del SNC (Zou y Kumar 2018). Dada su distribución diferencial, la mayoría de los efectos psicotrópicos y comportamentales de los cannabinoides exógenos (fitocannabinoides o cannabinoides sintéticos), incluyendo los comportamientos motivados, están mediados predominantemente por la activación del receptor CB1 (Zou y Kumar 2018).

A nivel celular, CB1 se expresa preferencialmente en la terminal pre-sináptica de neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas. Su activación por parte de los ECB genera una inhibición de la liberación de neurotransmisores, siendo esta una de las acciones principales del sECB (Mechoulam y Parker 2013). Para llevar a cabo este efecto, el receptor CB1 está acoplado a proteínas $G_{i/o}$, por lo que su activación genera una disminución de cAMP y, en consecuencia, una menor fosforilación de los canales de K^+ de tipo A por parte de la PKA. Esto facilita el incremento de corrientes de K^+ , lo que hace el potencial de membrana más electronegativo, dificultando la liberación de neurotransmisor (Zou y Kumar 2018). La activación de CB1 también lleva a la inhibición de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, y a la estimulación de los canales rectificadores de K^+ (Zou y Kumar 2018). Sin embargo, estudios recientes señalan que los receptores CB1 pueden además generar señales a través de $G_{\alpha s/\alpha q}$ bajo ciertas circunstancias (Wouters y cols. 2019).

Las vías de señalización de CB2 son muy similares a las de CB1, aunque difieren en la capacidad de reclutar algunas vías de señalización intracelulares (Wouters y cols. 2019).

De manera interesante, los receptores CB1 se encuentran fuertemente expresados en las regiones que conforman el circuito motivacional, incluido el NAc y la mPFC (Parson y Hurd 2015). En el NAc, los CB1 presentes en las terminales de las aferencias glutamatérgicas son capaces de regular la señal excitatoria proveniente de mPFC, amígdala basolateral e hipocampo (Peters y cols. 2020). La comunicación entre las células de la mPFC también es regulada por los receptores CB1 presentes en las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas (Fitzgerald y cols. 2019), y lo mismo ocurre con las células DAérgicas del VTA. Por lo tanto, el efecto final en la modulación de la actividad celular en regiones del circuito motivacional (neuronas piramidales en la mPFC, DAérgicas en el VTA y MSNs en el NAc), dependerá del balance funcional entre las señales excitatorias e inhibitorias, ambas inhibidas por ECB en distintas condiciones

fisiológicas (Parson y Hurd 2015). Esta capacidad para influir sobre la actividad de distintas regiones del circuito motivacional sugiere al receptor CB1 como posible blanco terapéutico para el consumo abusivo de drogas y las recaídas (Janero y Makriyannis 2007).

Actualmente, el potencial terapéutico del sECB para tratar la adicción a diferentes drogas se encuentra en plena exploración. Una revisión reciente sobre pruebas controladas de medicación con base de cannabis y el sECB como blanco, reporta resultados promisorios para la dependencia a marihuana, opioides, y aunque con menor cantidad de ensayos, tabaco y alcohol (Sloan y cols. 2017). Sin embargo, en el caso particular de drogas psicoestimulantes, el uso del sECB como blanco terapéutico presenta escasos datos e incluso contradictorios, probablemente debido a que los psicoestimulantes actúan directamente en las terminales DAérgicas del NAc y no sobre sitios de regulación directa de ECB (Parson y Hurd 2015). Aun así, existen evidencias de que el sECB puede influir en el efecto reforzador de la cocaína y algunos comportamientos asociados al desarrollo adictivo. El antagonismo del receptor CB1 con rimonabant (SR141716, antagonista selectivo CB1 de alta afinidad), por ejemplo, es capaz de reducir la reinstalación de la búsqueda de droga inducida por cocaína luego de una abstinencia (Fattore y cols. 2007). A altas dosis, el rimonabant también bloqueó la expresión de la sensibilización comportamental a cocaína (Filip y cols. 2006, Gerdeman y cols. 2008, Marinho y cols. 2017) y revirtió las alteraciones en la expresión de c-Fos en el NAc y mPFC asociadas a la sensibilización (Marinho y cols. 2017). Por otro lado, el rimonabant no demostró efectos el proceso de inducción de la sensibilización ni en la adquisición de la autoadministración (Arnold 2005, Filip y cols. 2006). Sus acciones atenuadoras se evidenciaron principalmente luego de tratamientos repetidos y procesos de abstinencia (Filip y cols. 2006). Pero a pesar de estos promisorios datos preclínicos, el potencial uso terapéutico del rimonabant no cuenta con la aprobación de la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos, ya que su uso se ha asociado con fuertes efectos secundarios, incluido depresión y la aparición de pensamientos suicidas (Sam y cols. 2011).

A nivel clínico, existen reportes observacionales en Brasil (Labigalini y cols. 1999), y más recientemente en Canadá (Socías y cols. 2017), del uso exitoso de cannabis como estrategia de reducción de daños en personas con dependencia al crack. En estos estudios el uso de cannabis logró reducir la frecuencia de consumo de crack, disminuir los síntomas del craving, y disminuir las recaídas (Labigalini y cols. 1999, Socías y cols. 2017). Si bien estos resultados son prometedores, dada la variabilidad de compuestos y concentraciones en la planta de cannabis, la eficacia real y las concentraciones apropiadas para la terapéutica son difíciles de determinar, y pueden variar según la región, variedad de la planta utilizada y protocolo de administración. Hace falta más información precisa de las dosis y efectos de sus componentes sobre las acciones de los psicoestimulantes para avanzar hacia una terapéutica integral.

4.2. Propiedades terapéuticas del Cannabidiol para la dependencia a psicoestimulantes

Entre los compuestos que modulan el sECB, el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD), principales componentes del cannabis, son los más conocidos y estudiados. CBD, a diferencia del THC, no posee efectos psicotrópicos ni potencial de abuso, y ha probado tener efectos beneficiosos neuroprotectores, anti-inflamatorios, ansiolíticos, antidepresivos y antipsicóticos (Devinsky y cols. 2014, Pisanti y cols. 2017). Asimismo, el CBD tiene un muy buen perfil de seguridad; la administración de CBD altamente purificado en humanos, a altas dosis, presenta únicamente efectos adversos leves a moderados, como dolor de cabeza, náuseas, somnolencia y diarrea (Taylor y cols. 2018). Esto es muy importante, porque hace que el CBD posea viabilidad de uso clínico, a diferencia del rimonabant.

En este contexto y frente al alto grado de problemas sociales y de salud que ocasiona el consumo de cocaínas fumables como PBC o crack, vale la pena mencionar que se realizó una convocatoria a nivel internacional, para estudiar los posibles beneficios del CBD en el tratamiento específico a este tipo de drogas (Fischer y cols. 2015).

El CBD presenta una farmacología compleja, con una gran variedad de efectos y sitios de acción dentro del SNC. En el sECB, el CBD posee una baja afinidad por el sitio activo los receptores CB1 y CB2, actuando principalmente como un modulador alostérico negativo del CB1, y un agonista parcial del CB2 (Calpe-López y cols. 2019). CBD también tiene un efecto inhibitorio en la recaptación de AEA y en la acción de la FAAH, promoviendo un aumento del tono ECB (Pisanti y cols. 2017). CBD actúa además como un antagonista de agonistas CB1/CB2 (como THC, por ejemplo) (Pertwee 2008). La habilidad del CBD para modular la señalización ECB sin unirse al sitio activo del receptor CB1, podría explicar su capacidad de disminuir la actividad este receptor sin inducir los efectos secundarios descritos para su antagonista rimonabant (Calpe-López y cols. 2019).

Además del sECB, el CBD actúa sobre receptores de otros sistemas de neurotransmisión. CBD tiene propiedades agonistas sobre los receptores de serotonina 5-HT_{1A} (Russo y cols. 2005), actúa como un inhibidor no competitivo de los receptores nicotínicos $\alpha 7$, y como modulador alostérico de los receptores mu- y delta-opioides (Zlebnik y Cheer 2016). También se ha reportado un rol como agonista parcial de receptores DAérgicos D2 (Seeman 2016). Finalmente, el CBD actúa además como agonista de los receptores de potencial transitorio A1 (TRPA1), V1 (TRPV1) y V2 (TRPV2), y es capaz de activar los receptores de glicina (Pisanti y cols. 2017, Zlebnik y Cheer 2016).

Si bien existen pocos estudios de la acción de CBD sobre los comportamientos adictivos inducidos por drogas psicoestimulantes, algunas evidencias colocan al CBD como un candidato terapéutico interesante a explorar (Calpe-López y cols. 2019). CBD

es capaz de atenuar el condicionamiento de lugar inducido por cocaína (Luján y cols. 2018, Parker y cols. 2004) y disminuir la ansiedad durante la abstinencia, aunque su administración aguda no disminuye su efecto motivacional, evaluado durante la autoadministración de cocaína con un régimen de reforzamiento progresivo (Mahmud y cols. 2016). Otros estudios recientes, en cambio, demostraron que la administración de CBD de manera repetida sí fue capaz de disminuir la acción motivacional de la cocaína, a la vez que redujo la ansiedad e impulsividad experimental (Gonzalez-Cuevas y cols. 2018, Luján y cols. 2018). En conjunto, los datos mostraron una reducción de la vulnerabilidad a la recaída en animales tratados con cocaína y CBD (Gonzalez-Cuevas y cols. 2018). Por otro lado, las acciones del CBD sobre las propiedades motoras de los psicoestimulantes han sido escasamente estudiadas. Dos estudios señalan que el CBD no es capaz de prevenir el desarrollo y expresión de la sensibilización comportamental a cocaína (Gerdeman y cols. 2008, Luján y cols. 2018), aunque su administración directamente en el NAc es capaz de revertir la sensibilización al psicoestimulante anfetamina (Renard y cols. 2016). Son necesarios más estudios para clarificar el efecto del CBD sobre las acciones motoras de este tipo de drogas.

Los antecedentes presentados dejan de manifiesto la necesidad de contar con nuevos apoyos terapéuticos para atenuar los efectos del consumo repetido de psicoestimulantes. El potencial terapéutico de los cannabinoides conlleva un gran interés internacional, y en particular, el CBD está siendo evaluado actualmente como agente terapéutico para la dependencia a varias drogas, incluyendo la cocaína clorhidrato. Sin embargo, dada la regionalidad de la problemática del consumo de PBC, aún no se ha estudiado su potencial terapéutico sobre las acciones de esta cocaína fumable.

5. ANTECEDENTES DE TRABAJO

5.1. Composición química de muestras incautadas de PBC

Interesados en la composición química como factor que incide en el poder adictivo de la PBC, hemos realizado la caracterización química de muestras de PBC por un periodo de 10 años (Abín-Carriquiry y cols. 2018, López-Hill y cols. 2011, Meikle y cols. 2009). Las mismas provinieron de incautaciones policiales de todo el país, y fueron proporcionadas por el Instituto Técnico Forense, con la autorización de la Junta Nacional de Drogas y el Ministerio de Salud Pública. Es importante destacar que éstas fueron muestras que potencialmente iban a ser consumidas por usuarios de PBC, lo que otorga un grado de originalidad a los estudios realizados y busca facilitar el abordaje traslacional de los resultados.

El análisis más reciente constó de la caracterización de 306 muestras de PBC, mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MC) para la identificación cualitativa de las sustancias, y posterior cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para el análisis cuantitativo de las mismas (Abín-Carriquiry y cols. 2018, Hynes y cols. 2016). De acuerdo a lo esperado, la cocaína fue el alcaloide principal detectado, presente en la totalidad de las muestras. La misma está presente en un rango variable, aunque la mayoría de las muestras contienen entre 30 y 60 % de cocaína (Figura 9). En algunas de las muestras se encontraron también otros alcaloides relacionados con el metabolismo de la cocaína, tales como trans- y cis-cinamoilcocaína, aunque los mismos están presentes en muy baja proporción (0.1-4 %) en relación a cocaína.

En la caracterización química surgió la aparición de otra serie de compuestos, definidos como adulterantes. La inclusión de compuestos de este tipo está de acuerdo a lo reportado en la literatura forense sobre drogas de abuso de mercados ilícitos (Cole y cols. 2010, Evrard y cols. 2010, Fukushima y cols. 2014, Pascale y cols. 2019). En estos estudios, demostramos que la cafeína es uno de los adulterantes más comunes y abundantes en las muestras de PBC analizadas a lo largo de todo el período (Meikle y cols. 2009, Hynes y cols. 2016). En particular, en el último análisis aquí descrito, el 71 % de las muestras analizadas estaban adulteradas con cafeína, y de éstas, la mayoría contenía entre 20 y 40 % de esta sustancia (Figura 9, Abín-Carriquiry y cols. 2018).

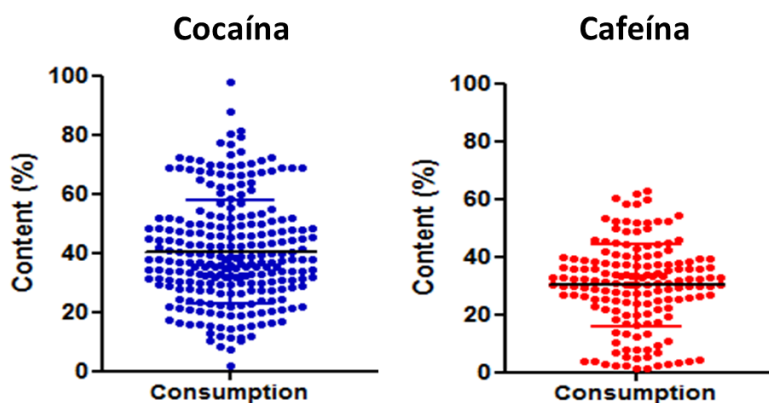


Figura 9. Contenido de cocaína y cafeína en muestras de PBC incautadas destinadas al consumo (chasquis). Tomado y modificado de Hynes y cols. 2016

La presencia de cafeína en las muestras de PBC coincide con lo reportado en la literatura forense, en la cual la cafeína se señala como uno de los adulterantes más comunes agregados a drogas de abuso ilegales, principalmente por su bajo costo, facilidad de obtención (tiene carácter legal), y acción psicoestimulante (Cole y cols. 2010, Fukushima y cols. 2014, Pascale y cols. 2019). A su vez, la cafeína puede ser

volatilizada (Galvalisi y cols. 2017, Klous y cols. 2006), lo que amplía su potencialidad como adulterante en drogas cuyo consumo puede darse bajo distintas vías de administración.

Estas características posicionan a la cafeína como un adulterante de especial interés para el caso de la PBC, por lo que es importante considerar sus características y potencial impacto en las acciones centrales de esta droga.

5.2. Cafeína: mecanismo de acción e interacción con cocaína

La cafeína es un alcaloide xantínico que es considerado por algunos autores como una “droga de abuso atípica” (Daly and Fredholm 1998), ya que estrictamente cumple algunos, aunque no todos los criterios de dependencia del DSM-V. De hecho, la cafeína posee propiedades reforzadoras débiles, y existe poca evidencia de dependencia clínica (Nehlig and Boyet 2000, Strain and Griffiths 1995).

La cafeína actúa en el organismo como un antagonista competitivo no selectivo de los receptores de adenosina (Fredholm y cols. 1999). La adenosina endógena actúa como neuromodulador en varias funciones del organismo, incluido el sueño, la motivación y el comportamiento alimentario, entre otros, y es un regulador importante de la transmisión DAérgica (Fredholm 1995). La misma es sintetizada principalmente a partir de AMP por la acción de la enzima 5'nucleotidasa, tanto intra como extracelularmente, y su concentración extracelular está regulada por la actividad del transportador equilibrativo denucléosidos (ENT-1) (Ballesteros-Yáñez y cols. 2018). Sus acciones están mediadas por la unión a tres tipos de receptores metabotrópicos: A1, A2 (A2A y A2B) y A3. Si bien todos ellos se expresan en el cerebro, el nivel extracelular de adenosina en condiciones fisiológicas es suficiente para activar únicamente los receptores A1 y A2A. La adenosina posee baja afinidad por los receptores A2B y A3, y éstos se activan únicamente con niveles altos de adenosina, posiblemente en condiciones patológicas, por lo que su actividad en condiciones fisiológicas se considera despreciable (Ferré 2008, Fredholm 2010).

Como se mencionó anteriormente, los receptores A1 y A2A poseen efectos intracelulares opuestos, y co-localizan con los receptores DAérgicos D1 y D2 en las MSNs del NAc de manera específica (A1 con D1 y A2A con D2) (Ferré 2008). Esta ubicación determina que la unión de adenosina a sus receptores inicie una cascada de señales que se contrapone a las iniciadas por la activación de los receptores DAérgicos (Ver sección 3.2.1). Por lo tanto, la cafeína, al bloquear los receptores de adenosina, es capaz de remover el freno adenosinérgico y potenciar los efectos de la estimulación DAérgica (Ballesteros-Yáñez y cols. 2018, Fisone y cols. 2004). En este contexto, en estudios previos hemos demostrado que la cafeína volatilizada es capaz de inducir un efecto estimulante en ratas, expresado como un aumento significativo de la

locomoción, y el mismo se acompaña de un incremento de la DA en el NAc shell (Galvalisi y cols. 2017).

Tanto la cocaína como la cafeína, si bien por distintos mecanismos, poseen la capacidad de facilitar la transmisión DAérgica. De hecho, la interacción entre cocaína y cafeína se ha reportado en diversos modelos experimentales. A nivel motor, se ha demostrado que la administración de cafeína incrementa la hiperactividad locomotora inducida por cocaína (Misra y cols. 1986), y que lo mismo ocurre cuando los animales son expuestos de forma prolongada a concentraciones bajas de cafeína administrada en forma oral (Gasior y cols. 2000). Asimismo, el tratamiento repetido con cafeína es capaz de potenciar la expresión de la sensibilización a cocaína (Kuribara 1994, Schenk y cols. 1990, Simola y cols. 2006). Este fenómeno de sensibilización cruzada resulta interesante, pues sugiere un sustrato neural común (Robinson y Berridge 1993). En este sentido, un estudio demostró que la pre-exposición a una dosis alta de cafeína no indujo ningún incremento en la locomoción de los animales al ser desafiados con una dosis menor de cafeína, pero sí logró expresar la sensibilización al ser desafiados con los agonistas de los receptores DAérgicos D1 y D2, SKF 77434 y quinpirol, respectivamente (Cauli y Morelli 2002).

Además de la potenciación locomotora, algunos estudios han demostrado una contribución de la cafeína al efecto reforzador de la cocaína. En particular, se ha visto que la pre-exposición a cafeína es capaz de acelerar la adquisición de la autoadministración a cocaína (Horger y cols. 1991), y aumentar su respuesta en protocolos de reforzamiento de proporción fija (Schenk y cols. 1994). También se ha reportado que el consumo de cafeína durante la adolescencia en ratas incrementa la vulnerabilidad a la cocaína, expresado como una facilitación de la autoadministración a esta droga (Larson y cols. 2018). La cafeína también puede actuar como una clave para las drogas psicoactivas, produciendo la reinstalación del comportamiento de búsqueda de cocaína luego de una abstinencia (Green y Schenk 2002, Regier y cols. 2014, Schenk y cols. 1996, Worley y cols. 1994), y fortalecer los efectos de la cocaína como estímulo discriminativo (Collins y cols. 2016). Por último, un estudio utilizando el modelo de CPP demostró que la combinación de cocaína y cafeína, a dosis bajas, es capaz de expresar un efecto aditivo en este modelo, aumentando significativamente el tiempo de permanencia de los animales en el compartimento condicionado en comparación con los animales tratados con cocaína sola (Bedingfield y cols. 1998). Estos antecedentes de interacciones en el proceso de sensibilización, aprendizaje asociado a recompensa (condicionamiento) y efecto reforzador, resultan de gran importancia al considerar que cocaína y cafeína son los principales componentes de la PBC.

5.3. Efecto farmacológico agudo y motivacional de PBC

Debido al reiterado hallazgo de cafeína como principal adulterante de PBC, y a las evidencias mencionadas sobre la interacción entre cocaína y cafeína, comenzamos a estudiar las acciones de la PBC en el SNC, y la influencia de la cafeína en dichos efectos.

En primer lugar, se procedió a estudiar el efecto estimulante agudo inducido por una serie de muestras de PBC con diferente composición en cocaína y cafeína. Esto se realizó a través del análisis de la actividad locomotora luego de la administración sistémica de las diferentes muestras de PBC, en comparación con cocaína sola o su combinación con cafeína. Estos estudios demostraron por primera vez que la PBC induce un efecto estimulante en roedores, y que la cafeína, cuando está presente en aquellas muestras adulteradas, es capaz de colaborar en el efecto farmacológico de la PBC, potenciando su efecto hiperlocomotor (López-Hill y cols. 2011, Prieto y cols. 2012). El análisis de curvas dosis-respuesta, confirmó que la co-administración de cocaína y cafeína, a las proporciones que aparecen en la serie estudiada de muestras de PBC (2:1 de cocaína y cafeína), eran capaces de actuar en forma aditiva generando un efecto estimulante mayor al de cocaína sola. En su conjunto, estos datos demostraron que el efecto estimulante agudo inducido por PBC depende de su contenido químico y específicamente, en las muestras analizadas, de la proporción de cocaína y cafeína, descartando la participación de las impurezas u otros posibles alcaloides en dicha acción (López-Hill y cols. 2011, Prieto y cols. 2012). Adicionalmente, estos resultados permitieron evidenciar que la co-administración de cocaína y cafeína a las dosis equivalentes a su contenido en las muestras de PBC analizadas, es un sustituto válido (símil o sucedáneo) para estudiar otros aspectos comportamentales inducidos por PBC.

Posteriormente, se estudió el efecto de la combinación de cocaína y cafeína (en proporciones presentes en la PBC), en el modelo de autoadministración intravenosa en ratas. Este modelo permite evaluar el efecto reforzador y la motivación del animal por la obtención de la droga de una manera contingente. Dicho experimento demostró que los animales expuestos a la combinación de cocaína y cafeína estaban dispuestos a realizar un mayor esfuerzo por la obtención de la droga que aquellos expuestos a cocaína sola, efecto que se visualizó a través de un mayor punto de quiebre bajo un protocolo de régimen progresivo (Prieto y cols. 2016). Este efecto demostró un mayor comportamiento de búsqueda por la combinación cocaína-cafeína que por la cocaína sola. A través de este resultado confirmamos que la cafeína presente en las muestras de PBC es capaz de incrementar la motivación por la búsqueda de droga, probablemente mediada por una acción aditiva con la cocaína. Este resultado es muy relevante ya que podría ayudar a la comprensión de la intensa búsqueda de droga o craving experimentado por los consumidores de PBC.

Estos datos destacan a la composición química como un factor relevante en la alta dependencia asociada al consumo de PBC, y dejan en evidencia la importancia de considerar los efectos proporcionados por los adulterantes sobre el impacto final de la droga en el consumidor. Sin embargo, el efecto facilitador de la cafeína presente en la PBC se ha comprobado hasta el momento en modelos animales que se asocian a las primeras etapas del ciclo adictivo, tales como los efectos reforzadores iniciales y la atribución de una saliencia de incentivo, que se traducen en la motivación por la búsqueda y consumo de la droga. Estudiar la interacción de estos dos componentes en otras etapas del ciclo, como el establecimiento del aprendizaje condicionado asociado a recompensa, puede contribuir en la comprensión del papel de la cafeína como facilitador de etapas claves del ciclo adictivo, y a comprender mejor el impacto de la adulteración con cafeína en la dependencia a PBC.

5.4. Sensibilización locomotora a PBC

Dada la relevancia del fenómeno de sensibilización en el proceso adictivo, también se evaluó la capacidad de PBC de generar el fenómeno de sensibilización comportamental. En primera instancia, se evaluó la capacidad de una muestra de PBC adulterada con cafeína de inducir la sensibilización (PBC1; Figura 10) en comparación con cocaína sola (inyectadas a dosis equivalentes en cocaína base). Se utilizó un protocolo estándar que consistió de 5 días de tratamiento, seguido por 5 días de abstinencia y la re-exposición a la droga. Los resultados mostraron que PBC1 fue capaz de expresar el fenómeno de sensibilización locomotora, y no sólo eso, sino que la expresión de la sensibilización (manifestada en un incremento de la respuesta locomotora) fue mayor que la inducida por cocaína sola (Figura 10). Este resultado sugería que la cafeína como adulterante podría estar potenciando la sensibilización inducida por cocaína, hipótesis que confirmamos en sucesivos experimentos (Prieto y cols. 2015).

Adicionalmente, en esta serie de experimentos se evidenció un pico máximo de actividad en el día 3 del pre-tratamiento con PBC1. Esto llevo a un siguiente experimento con el fin de testear el alcance de la influencia de la cafeína en la expresión de la sensibilización a PBC1. En dicho experimento evaluamos la capacidad de la combinación de cocaína 10 mg/kg y cafeína 2.5 mg/kg (como sucedáneo de PBC1), de inducir la sensibilización utilizando un protocolo de administración de únicamente 3 días de pretratamiento, manteniendo los mismos días de abstinencia. Los resultados confirmaron la participación de ambos psicoestimulantes en la inducción rápida de la sensibilización comportamental de PBC (Prieto y cols. 2015).

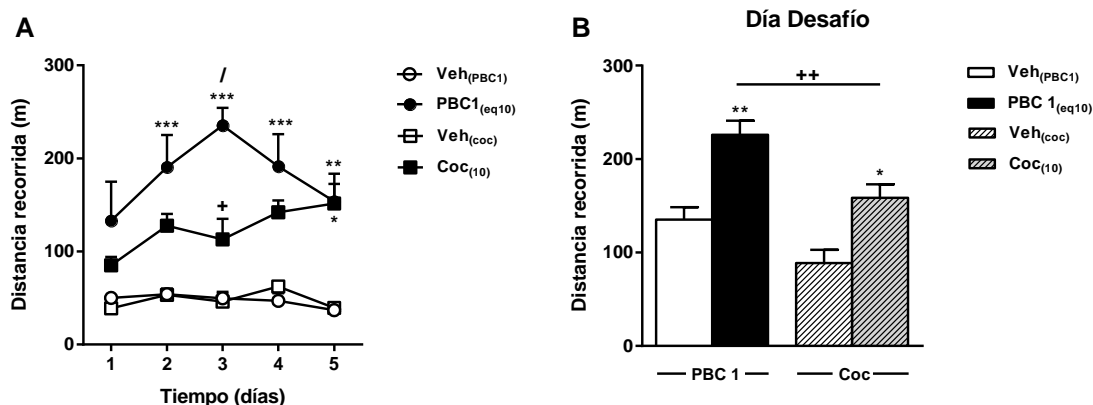


Figura 10. Desarrollo (A) y expresión (B) de la sensibilización comportamental inducida por una muestra de PBC (PBC 1: 65 % de cocaína y 15 % de cafeína) y cocaína. Las dosis están expresadas en mg/kg y los respectivos vehículos son mostrados entre paréntesis [PBC 1(eq10); Coc(10); Veh(PBC1); Veh(coc)]. Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una y dos vías seguidos de Newman-Keuls post hoc test. * = vs. cada grupo control; + = vs PBC1(eq10) ; / = vs. Día 1. ***= $P < 0.001$; **, ++ = $P < 0.01$; *, +, / = $P < 0.05$. Prieto y cols. 2015.

A su vez, estos resultados llevaron a la evaluación del fenómeno de sensibilización bajo éste mismo protocolo, ensayando una dosis menor en la combinación de cocaína y cafeína, y con una proporción 2:1. Como se observa en la Figura 11, la combinación de cocaína 5 mg/kg y cafeína (2.5 mg/kg) fue capaz de inducir y expresar la sensibilización comportamental. Los animales tratados con cocaína sola, en cambio, fueron incapaces de expresar este fenómeno con sólo 3 días de tratamiento. De hecho, cocaína sola a esa dosis no se diferencia del grupo control durante la inducción de la sensibilización, y al recibir una nueva dosis en el Día Desafío, su actividad locomotora es igual a aquellos animales que reciben la droga por primera vez (Figura 11). Es importante destacar que cafeína a la dosis mencionada no genera efectos locomotores apreciables (Prieto y cols. 2015).

En su conjunto, estos resultados demostraron que la cafeína presente en la PBC es capaz de potenciar, y además facilitar la aparición de la sensibilización comportamental inducida por cocaína (Prieto y cols. 2015).

Este resultado es muy importante, pues dadas las evidencias existentes sobre el fenómeno de sensibilización, sugiere que la adulteración con cafeína puede tener repercusiones en la inducción de neuroadaptaciones a largo plazo asociadas al desarrollo adictivo. La aceleración de los cambios plásticos que subyacen a la sensibilización, dada por la cafeína, puede ayudar a comprender otro aspecto del alto potencial adictivo de la PBC.

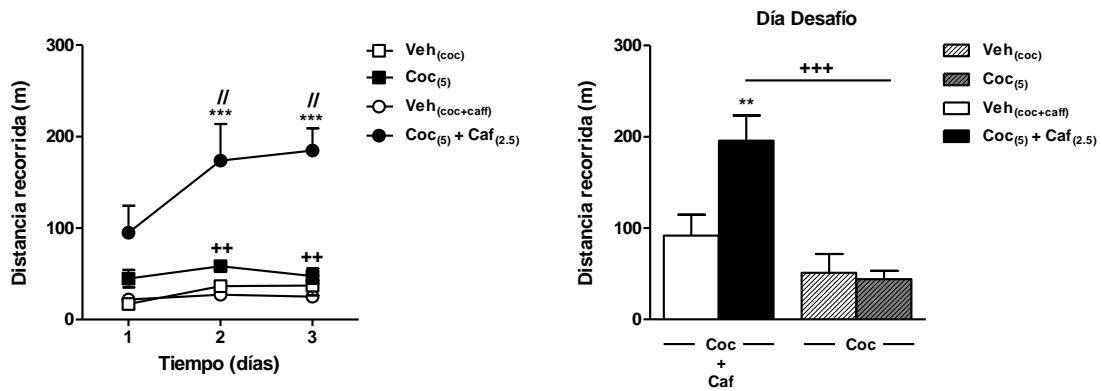


Figura 11. Desarrollo (A) y expresión (B) de la sensibilización comportamental inducida por cocaína y la combinación de cocaína + cafeína (sucedáneo de PBC). Las dosis están expresadas en mg/kg y los respectivos vehículos son mostrados entre paréntesis [Coc(5) + Caff(2.5); Coc(5); Veh(coc+caff); Veh(coc)]. Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una y dos vías seguidos de Newman-Keuls post hoc test. * = vs. cada grupo control; + = vs Coc(5) + Caff(2.5); / = vs. Día 1. ***, +++ = $P < 0.001$; **, ++, // = $P < 0.01$. Prieto y cols. 2015.

Teniendo en cuenta que la expresión de la sensibilización locomotora podría explicarse por una diferencia en la transmisión DAérgica preferencialmente en el NAc core (Ito y cols. 2000), evaluamos los niveles extracelulares de DA en esta región durante la expresión de la sensibilización con la combinación de cocaína y cafeína. Los resultados mostraron que el tratamiento con la combinación de cocaína y cafeína, así como con cocaína sola, indujeron un aumento similar en la liberación de DA en el NAc (Prieto 2015). Este resultado indicó que la potenciación locomotora ejercida por la cafeína parece no explicarse por un incremento en la liberación de DA en el NAc core, sino que otros mecanismos o regiones del circuito motivacional podrían estar involucrados en este fenómeno. En este sentido, restan por identificarse los cambios celulares y moleculares que subyacen a la influencia potenciadora y facilitadora de la cafeína en la sensibilización locomotora inducida por PBC, así como en el aumento del efecto motivacional de la droga.

Algunas evidencias sugieren que el tratamiento repetido con cocaína o cafeína induce cambios en la expresión de receptores de los sistemas de neurotransmisión involucrados (DA, adenosina y glutamato, entre otros) (Churchill y cols. 1998, Marcellino y cols. 2007, Muñiz y cols. 2016, Toda y cols. 2003). El análisis de la expresión de estos receptores podría ayudar a dilucidar el mecanismo que subyace a la facilitación de la sensibilización comportamental inducida por cafeína.

Por otro lado, se ha hipotetizado que la inducción de IEGs por drogas de abuso, es uno de los pasos iniciales de los cambios a largo plazo que producen las drogas en la función neuronal. En este sentido, hay evidencia que sugiere que el gen fra-2 es relevante en los procesos de plasticidad asociados a la sensibilización locomotora inducida por cocaína (Liu y cols. 2005), por lo que resulta un candidato interesante a

explorar. La evaluación de la expresión de IEGs con cocaína, PBC, o su sucedáneo con cocaína y cafeína puede resultar de utilidad para dilucidar las regiones del circuito motivacional que participan en la acción potenciadora de la cafeína.

La identificación de los mecanismos subyacentes a los cambios inducidos por PBC, puede colaborar en la identificación de potenciales sitios y oportunidades terapéuticas.

5.5. Interacción entre el sistema adenosinérgico y CBD

Tanto la adenosina como los ECB participan en la modulación de la función estriatal (Covey y cols. 2017, Ferré y cols. 2018a). En este sentido, se ha demostrado que el receptor de CB1 se expresa en ambas poblaciones de MSNs del estriado (las MSNs de dinorfina que expresan receptores D1 y A1, y las MSNs de encefalina que expresan D2 y A2A) (Martín y cols. 2008). A su vez, la activación del receptor CB1 en este sistema es necesaria para mediar la acción hiperlocomotora de antagonistas del receptor A2A (como cafeína) (Lerner y cols. 2010) y la acción de éstos en la potenciación de los efectos motores de la cocaína (Tozzi y cols. 2012). De manera opuesta, la administración de antagonistas del receptor CB1 es capaz de atenuar el incremento de actividad locomotora inducido por antagonistas del receptor A2A (Lerner y cols. 2010). Estas evidencias refuerzan la importancia del receptor CB1 en sistemas relacionados con conductas motivadas y adicción, y reafirman la necesidad de explorar su posible uso terapéutico en la acción psicoestimulante de PBC o su sucedáneo.

En este sentido, además de todos los sitios blancos mencionados para el CBD, existe un sitio de acción de alta relevancia para este trabajo de tesis. CBD es capaz de inhibir el transportador equilibrativo de nucleósidos 1 (ENT-1) (Carrier y cols. 2006), el cual constituye el principal mecanismo de remoción de la adenosina extracelular (Eltzschig 2009). La inhibición de este transportador podría incrementar los niveles extracelulares de adenosina y disminuir competitivamente la acción de la cafeína sobre los receptores A1 y A2A, disminuyendo su acción potenciadora/facilitadora.

Es relevante en este contexto, considerar la potencialidad del CBD para atenuar el efecto potenciador/facilitador de la cafeína sobre el fenómeno de sensibilización locomotora inducido por PBC.

En base a los antecedentes mencionados, se hace evidente que la cafeína, siendo uno de los adulterantes más frecuentes en las muestras de PBC, es capaz de potenciar y facilitar algunos procesos asociados al desarrollo adictivo, como la motivación por la búsqueda de la droga y la sensibilización comportamental. La expresión de estos fenómenos se asienta en neuroadaptaciones inducidas por las drogas en el circuito motivacional. El estudio de los cambios funcionales y moleculares que ocurren en distintas escalas temporales, subyacentes a dicho efecto facilitador de la cafeína, así como su participación en otros fenómenos del proceso adictivo (como el condicionamiento y aprendizaje asociado a recompensa), es fundamental para la comprensión de las causas detrás del craving y consumo compulsivo de PBC. En particular, el análisis de la expresión de IEGs, receptores de sistemas de neurotransmisión y moléculas asociadas a procesos de plasticidad, en regiones claves del circuito motivacional, puede aportar información muy relevante sobre las adaptaciones a corto y mediano plazo detrás del efecto facilitador de la cafeína. De forma complementaria, el análisis de la actividad metabólica en estas regiones puede proveer datos sobre posibles cambios regionales en la actividad funcional inducidos por la combinación de cocaína y cafeína a mediano y largo plazo. Por otro lado, se ha explicitado que existe una alta demanda y necesidad de apoyos terapéuticos efectivos y seguros para la dependencia a psicoestimulantes, y en particular para PBC. Sin embargo, a pesar de la investigación creciente sobre el uso de cannabinoides, y las evidencias que sugieren un potencial terapéutico del CBD en el desorden de abuso de sustancias, existe escasa información sobre su potencial para la dependencia a psicoestimulantes, y aún menos para cocaínas fumables. Resulta entonces de gran importancia iniciar la evaluación preclínica del potencial del CBD como herramienta terapéutica, que colabore a evitar las recaídas y a la recuperación de las personas con dependencia a PBC.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En base a las evidencias y antecedentes mencionados, el presente trabajo está enmarcado en la siguiente hipótesis de trabajo:

La administración repetida de PBC o la combinación de sus principales componentes, cocaína y cafeína, genera cambios funcionales y moleculares en regiones del circuito motivacional en roedores que se distinguen de los inducidos por cocaína sola. Además, proponemos que CBD posee potencial terapéutico a través de su capacidad de atenuar la acción potenciadora de cafeína.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo se centró en determinar los cambios funcionales y moleculares inducidos por PBC o la combinación de cocaína y cafeína (como sucedáneo de PBC) en el circuito motivacional, para colaborar en la comprensión del alto poder reforzador de la PBC; y adicionalmente, evaluar el potencial terapéutico del CBD.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los cambios celulares y moleculares de regiones del circuito motivacional que subyacen a la potenciación de la sensibilización comportamental inducida por cafeína.

1.1. Evaluar la expresión de la proteína Fra-2 en el NAc y mPFC luego de un tratamiento de sensibilización locomotora inducido por la administración repetida del sucedáneo de PBC.

1.2. Evaluar los cambios en la expresión de genes asociados a las acciones de drogas psicoestimulantes en el NAc y mPFC, luego de un tratamiento de sensibilización comportamental inducido por una muestra de PBC adulterada con cafeína.

2. Determinar la influencia de la cafeína en el aprendizaje asociado a recompensa inducido por el sucedáneo de PBC.

2.1. Evaluar si la cafeína es capaz de potenciar el aprendizaje condicionado a cocaína en el paradigma de Condicionamiento de Preferencia de Lugar, y si eso conlleva una expresión génica diferencial en el NAc y mPFC.

3. Determinar el potencial terapéutico del CBD sobre un fenómeno asociado al desarrollo adictivo de la PBC

3.1. Evaluar la capacidad del CBD de atenuar el fenómeno de sensibilización comportamental inducido por el sucedáneo de PBC, y sus acciones sobre la actividad metabólica regional asociada, en el NAc y mPFC.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Ratas

En los experimentos asociados a los Objetivos Específicos 1.1 y 3 se utilizaron ratas macho, cepa Wistar, de 2-3 meses de edad, pesando entre 270-320 gr. al inicio de los procedimientos experimentales. Los animales fueron criados en las instalaciones del Bioterio del IIBCE, mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y con un ciclo luz-oscuridad constante (luces prendidas de 7:00 AM - 7:00 PM). Fueron alojados en grupos de 6 animales, en cajas de plástico transparentes, con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos que se llevaron a cabo se encuentran bajo las normas éticas establecidas y aprobadas por el Comité de Ética en el Uso de Animales del IIBCE (CEUA-IIBCE), y de acuerdo con la Ley Nacional N° 18.611 de experimentación animal.

Ratones

En los experimentos asociados a los Objetivos Específicos 1.2 y 2 se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6, de 2-3 meses de edad. Aquellos asociados al objetivo específico 1.2, fueron obtenidos de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo; mientras que los ratones utilizados en el objetivo específico 2, fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. En ambos casos los animales fueron alojados en un cuarto con el ciclo de luz-oscuridad y temperatura controladas (ciclo de luz-oscuridad de 12hs, 22°C) y con acceso a comida y agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos con animals fueron efectuados de acuerdo con el “*Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*” (National Research Council (US) Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, 2003). Los procedimientos asociados al Objetivo Específico 1.2, realizados en Uruguay, fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales del IIBCE (CEUA-IIBCE), de acuerdo con la Ley Nacional N° 18.611 de experimentación animal. Los procedimientos asociados al Objetivo Específico 2, realizados en Argentina, fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

DROGAS

Las muestras de PBC utilizadas, CP-1 y CP-2 (del inglés Coca-Paste, denominadas así en los artículos publicados), provienen de incautaciones policiales, y fueron suministradas por el Instituto Técnico Forense, con la autorización de la Junta Nacional de Drogas y el Ministerio de Salud Pública. El análisis químico de estas muestras indicó que CP-1 contiene 60 % de cocaína base y no está adulterada con cafeína, mientras que CP-2 contiene 63,8 % de cocaína base y 36,2 % de cafeína. No se detectó la presencia de otros adulterantes, y la cantidad de impurezas fue despreciable (Tabla 1, Abín-Carriquiry y cols. 2018). Estas muestras forman parte de la pasada caracterización química de muestras de PBC (Abín-Carriquiry y cols. 2018), y fueron seleccionadas en base a nuestros datos previos, de forma de mantener la relación de cocaína/cafeína bajo la cual la cafeína probó tener una acción potenciadora sobre el efecto de cocaína (López-Hill y cols. 2011, Prieto y cols. 2015). Para disolver las muestras de PBC se utilizó una solución vehículo de ácido clorhídrico al 2 % y agua destilada, y suficiente hidróxido de sodio para alcanzar un pH óptimo para su administración sistémica (pH= 6-6,5). Es importante mencionar que resultados previos confirman que no existen diferencias en los efectos comportamentales entre los animales tratados con salino y el vehículo de PBC (López Hill y cols. 2011, Prieto y cols. 2012).

El clorhidrato de cocaína se obtuvo de Sigma-Aldrich (EUA) y a través de una donación de Verardo y Cía (Argentina). La cafeína se obtuvo de Sigma-Aldrich (EUA) y el CBD fue donado por Phytoplant Research (España). El clorhidrato de cocaína y cafeína se disolvieron en salino, mientras que el CBD se disolvió en Tween 80 al 3% en salino. La baja concentración de Tween 80 permite la disolución del compuesto y evitar efectos locomotores por parte del Tween 80.

Tabla 1. Análisis químico de las muestras de PBC utilizadas

Muestras PBC	mg/g de cocaína y adulterantes activos					
	Cocaína	Cafeína	Fenacetina	Lidocaína	Aminopirina	Benzocaína
CP-1	600	n.d.	n.d	n.d	n.d	n.d
CP-2	638	362	n.d	n.d	n.d	n.d

La tabla muestra el análisis químico de las dos muestras de PBC utilizadas en este estudio. Se observa, específicamente, el contenido de cocaína base y de los adulterantes activos más comunes. Los datos se expresan como mg de cada compuesto/ g de PBC. Estas dos muestras fueron seleccionadas de la serie de 306 muestras de PBC analizadas en un estudio previo (Abín-Carriquiry y cols. 2018). Las cuantificaciones se realizaron mediante el uso de soluciones estándar como referencia. N.d.: niveles no detectables.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1.1

Analizar la expresión de la proteína Fra-2 en el NAc y mPFC luego de un tratamiento de sensibilización locomotora inducido por la administración repetida del sucedáneo de PBC.

Para el abordaje de este objetivo se realizó el análisis de la inmunoreactividad de la proteína FRA-2 en regiones del circuito motivacional (NAc y mPFC) inducida por el sucedáneo de PBC en comparación con cocaína, luego de un tratamiento de sensibilización comportamental utilizado en estudios previos del laboratorio.

Sensibilización locomotora – grupos experimentales

Para evaluar el fenómeno de sensibilización locomotora se empleó el modelo de campo abierto u Open Field (OF); modelo ampliamente utilizado para analizar la actividad locomotora horizontal (Razafsha y cols. 2013, Walsh y Cummings 1976).

Se utilizó el mismo protocolo de sensibilización aplicado en estudios previos del laboratorio (Prieto y cols. 2015), el cual se esquematiza en la Figura 12. En el Día 0, previo al inicio del pre-tratamiento, los animales fueron habituados al OF durante 60 min. A continuación, los animales se asignaron aleatoriamente a los distintos grupos experimentales, y fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) una vez por día, durante 3 días, con cocaína (5 mg/kg), la combinación de cocaína y cafeína (5 mg/kg y 2.5 mg/kg respectivamente), o salino. Finalizado el pre-tratamiento, los animales se dejaron en abstinencia por 5 días, y al día siguiente (Día 9), fueron desafiados con una inyección de cocaína (5 mg/kg) o cocaína + cafeína (5 mg/kg + 2.5 mg/kg), según correspondiese de acuerdo al pre-tratamiento recibido. En los Días 1 y 9, previo a la administración de la droga, los animales fueron expuestos al OF para su habituación, por 20 minutos. La habituación previa facilita la asociación de la droga con el contexto, lo que favorece la inducción y expresión de la sensibilización (Li y cols. 2004).

Es importante recalcar que las dosis seleccionadas son las mismas que se utilizaron en estudios anteriores (López-Hill y cols. 2011, Prieto y cols. 2015; ver Antecedentes de Trabajo, secciones 5.3 y 5.4), reproducen el contenido de estas sustancias en muestras de PBC, y esta relación cocaína/cafeína ha demostrado ejercer un efecto facilitador sobre la sensibilización (ver sección 5.4).

Todo el experimento fue filmado y analizado mediante el software de video-seguimiento y análisis automatizado Ethovision XT 12 (Noldus). Específicamente, se cuantificó la actividad locomotora horizontal, definida como la distancia recorrida total en metros, cada día del protocolo durante 60 minutos, iniciando inmediatamente después de la inyección de la droga.

En estos ensayos se utilizó un OF de 60 x 60 x 40 cm, y el mismo se limpió con alcohol al 30% al finalizar cada prueba, antes de colocar el siguiente animal. Todos los

procedimientos experimentales se realizaron durante la fase diurna, entre las 9:00 y 16:00 hs.

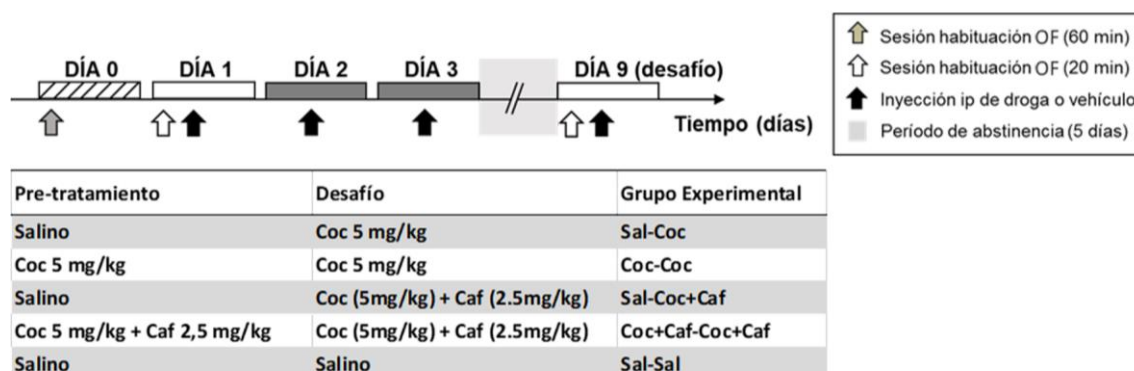


Figura 12. Protocolo experimental utilizado para la sensibilización locomotora. Los animales fueron tratados con las distintas drogas y sus vehículos por 3 días; 5 días después fueron desafiados con los tratamientos correspondientes.

Obtención y procesamiento del tejido para el análisis de la proteína Fra-2

Luego de 120 minutos de la última inyección (dosis desafío de la sensibilización) y ya finalizada la evaluación comportamental en el OF, los animales fueron anestesiados con uretano (1.2 g/kg, i.p.). A continuación, se les realizó una perfusión transcardíaca de 250 mL de salino heparinizado (0.4 mL/L), seguido de 650 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer de fosfatos (PBS, 0.1 M, pH=7.3).

Una vez finalizado el procedimiento, los cerebros fueron disecados y crioprotectados mediante su inmersión en soluciones de PBS con sucrosa (20 % sucrosa por 24 horas, seguido de 30% sucrosa por 48 hs). A continuación, los cerebros fueron congelados con hielo seco en bloques con medio de inclusión (Tissue-Tek), y cortados en secciones coronales de 40 µm de ancho en crióstato (Leica Biosystems, USA). Los cortes obtenidos se transfirieron a una solución crioprotectora y fueron almacenados a -20°C hasta el momento del ensayo inmunohistoquímico.

Las regiones de interés para el análisis inmunohistoquímico de Fra-2 fueron determinadas en base el atlas de Paxinos y Watson (2005). El nivel de corte de las regiones analizadas, de acuerdo a bregma, fueron las siguientes: mPFC, +3.24 mm; y NAc, +1.80 mm.

Inmunohistoquímica para la detección de Fra-2

El día previo al ensayo, se seleccionaron cortes de las regiones de interés (2 cortes adyacentes por región, de cada animal) y se colocaron en pocillos con PBS. Los ensayos de inmunoreactividad a la proteína Fra-2 se realizaron con los cortes en flotación. Los mismos fueron pretratados con peróxido de hidrógeno al 0.3 % (bloqueo de la peroxidasa endógena), y luego con suero normal de cabra al 1.5 % (bloqueo de proteínas tisulares inespecíficas), preparada en PBS con 0.3 % Tritón X-100 (PBST). A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo anti-Fra-2 (conejo; 1:8000, Laboratorios Santa Cruz, USA) en PBST, durante toda la noche, a temperatura ambiente. Al día siguiente los cortes fueron expuestos al anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (cabra; 1:400 Vector Labs, USA), seguido de la incubación en solución ABC estándar (1:300 Vector Labs, USA). Finalmente, los cortes fueron tratados con 3,3'-diaminobenzidina (DAB), y también con níquel, para incrementar la intensidad de la marcación. Específicamente, los cortes se sumergieron en PBS con 0.02 % de DAB, 0.6 % de níquel y 0.03 % de peróxido de hidrógeno, por 4-5 min.

En cada ensayo se incluyó un control negativo, omitiendo el anticuerpo primario. De acuerdo a lo esperado, siempre resultó en la ausencia absoluta de señal, confirmando la especificidad del anticuerpo secundario y la marcación. A su vez, todos los animales fueron analizados con el mismo lote de anticuerpos.

Cuantificación de la inmunoreactividad a la proteína Fra-2

Todas las secciones fueron examinadas utilizando un microscopio de luz transmitida Nikon E800. Las imágenes de las regiones cerebrales de interés se obtuvieron con un objetivo x10, y fueron capturadas y analizadas mediante el software Image-ProPlus (Media Cybernetics, EUA). Para la cuantificación de los núcleos inmunorreactivos a Fra-2, los núcleos positivos para Fra-2 se contabilizaron mediante un procedimiento automatizado seleccionando las partículas del tamaño apropiado. Se consideró que la señal de Fra-2 era positiva cuando estaba al menos tres veces por encima del fondo.

Para el análisis cuantitativo, se definieron áreas de muestreo acordes y representativas para las regiones de interés: NAc shell, NAc core, ACC, PrL e IL. La dimensión del área de muestreo se basó en los trabajos de Hervig y cols. 2016, y Zlebnik y cols 2014. En particular, en el NAc se utilizaron grillas de 300x600 μm para el NAc shell y 300x300 μm para el NAc core, mientras que, en la mPFC, se utilizaron grillas de 500x600 μm para la CCA, 650x650 μm para la PrL, y 500x500 μm para la IL (Figura 13).

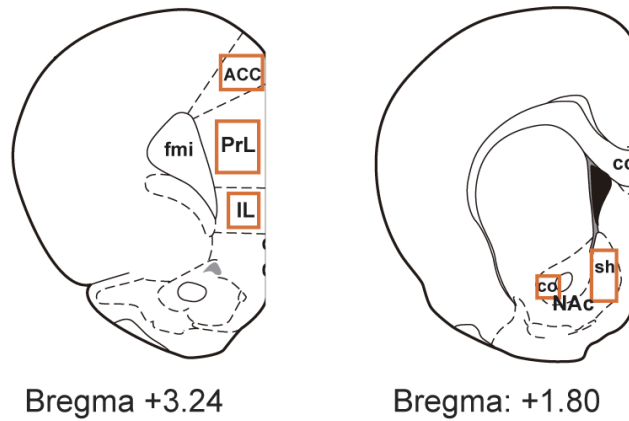


Figura 13. Regiones en las cuales se determinó la inmunoreactividad a Fra-2 por inmunohistoquímica. Los recuadros marcan la ubicación y forma aproximada de las grillas utilizadas. fmi, fórnix menor; CCA, corteza cingulada anterior; PrL, corteza prelímbica; IL, corteza infralimibica; NAc, núcleo accumbens; co, NAc core; sh, NAc shell; cc, cuerpo calloso.

Análisis estadístico

Los datos se muestran como la Media \pm Error Estándar Medio (EEM). Los resultados comportamentales fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (día y tratamiento) para medidas repetidas, seguido del test de comparación múltiple de Tukey. También se utilizó un ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey, para datos comportamentales y para el análisis inmunohistoquímico. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa Statistica 10 y GraphPad Prism 7 respectivamente. La significancia estadística fue fijada en $P < 0.05$.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1.2

Evaluar los cambios en la expresión de genes asociados a las acciones de drogas psicoestimulantes en el NAcc y mPFC, luego de un tratamiento de sensibilización comportamental inducido por una muestra de PBC adulterada con cafeína.

Para la realización de este objetivo se cuantificaron los cambios en la expresión de ARNm en el NAc y mPFC asociados a la sensibilización comportamental inducida por una muestra de PBC adulterada con cafeína, en relación a una muestra sin adulterar. Esta evaluación, en particular, se centró en el análisis de genes de algunas subunidades de receptores de distintos sistemas de neurotransmisión involucrados en el circuito motivacional, así como genes involucrados en mecanismos de plasticidad y en el efecto reforzador de las drogas adictivas.

Sensibilización locomotora – grupos experimentales

Para la inducción del fenómeno de sensibilización locomotora, se utilizó el mismo protocolo de 3 días de tratamiento, descrito previamente en la metodología del Objetivo Específico 1.1 (Figura 14). En este experimento se utilizaron 4 grupos experimentales asignados aleatoriamente, que constaron de ratones inyectados i.p. con CP-1 o CP-2 (a una dosis equivalente a 5 mg/kg de cocaína base), cocaína (5 mg/kg), o salino. Finalizado el pre-tratamiento, los animales se dejaron en abstinencia por 5 días, y al día siguiente (Día 9), fueron desafiados con una nueva inyección de su tratamiento.

Todo el experimento fue filmado y analizado mediante el software de video-seguimiento y análisis automatizado Ethovision XT 12 (Noldus). Específicamente, se cuantificó la actividad locomotora horizontal, definida como la distancia recorrida total en metros, cada día del protocolo durante 60 minutos, iniciando inmediatamente después de la inyección de la droga

Se utilizaron OF de 30 × 40 × 35 cm, y los mismos fueron limpiados con alcohol al 30% antes de colocar el siguiente animal. Todos los procedimientos experimentales se realizaron durante la fase diurna, entre las 9:00 y 16:00 hs.

Extracción y preservación de tejido para el análisis de expresión génica

Una vez finalizado el test conductual en el Día 9, los animales fueron inmediatamente sacrificados por dislocación cervical, y se diseccionaron las regiones de interés: NAc y mPFC. El tejido se guardó en ARN-later (solución utilizada para evitar la degradación del ARN presente en el tejido) y se almacenó a -80°C para su conservación hasta su procesamiento y análisis.

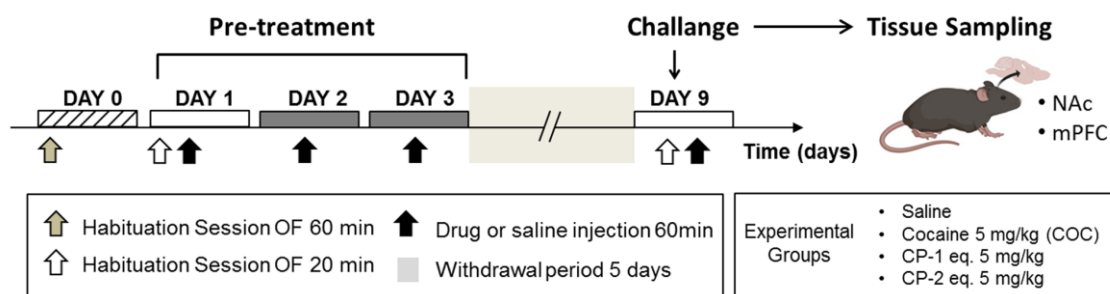


Figura 14. Protocolo experimental y grupos experimentales utilizados. Los animales fueron tratados con las distintas drogas o salino por 3 días; 5 días después fueron desafiados con una nueva dosis de su tratamiento. Inmediatamente después de finalizar la evaluación comportamental, los animales se sacrificaron y se disecaron el NAc y la mPFC para los ensayos moleculares.

Real-Time PCR

El ARN total fue aislado con TRIZOL (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. 500ng de ARN fueron tratados con DNAsa I (Invitrogen) para asegurar la eliminación de ADN molde que pudiera estar presente, y luego retrotranscriptos a ADNc usando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y hexámeros al azar (Biodynamics).

Para el análisis cuantitativo por real-time PCR se diseñaron primers específicos para los siguientes genes murinos: 1) subunidades de los receptores de dopamina D1 (*Drd1a*), D2 (*Drd2*) y D3 (*Drd3*); 2) subunidades de los receptores de adenosina A1 (*Adora1*) y A2A (*Adora2a*); 3) subunidad del receptor cannabinoide CB1 (*Cnr1*); 4) subunidades de los receptores glutamatérgicos AMPA (*Gria1*) y NMDA (*Grin1*); 5) factor de transcripción CREB (*Creb*); 6) neuroproteína *Cocaine and amphetamine regulated transcript*, *CART* (*Cart*); 7) proteína sinaptofisina (*Syn*). Se utilizó la expresión del gen de beta-actina (*Actb*) como gen control de expresión constitutiva (*housekeeping gene*). Las secuencias de los primers utilizados se detallan en la Tabla 2.

Los receptores seleccionados pertenecen a sistemas de neurotransmisión del sistema de recompensa que están involucrados en los efectos de cocaína y cafeína. CREB contribuye a la sensibilización comportamental por psicoestimulantes (Peng y cols. 2014), CART tiene efectos sobre la recompensa inducida por drogas (Jaworski y Jones 2006), y sinaptofisina es considerado un indicador molecular de densidad sináptica y plasticidad (Rodríguez-Espinosa y Fernández-Espejo 2015).

Tabla 2. Secuencias de los primers

Gen	Número de acceso	Primer forward	Primer reverse
<i>Drd1a</i>	NM_010076	TTCTTCCTGGTATGGCTTGG	GCTTAGCCCTCACGTTCTTG
<i>Drd2</i>	NM_010077	TATGCCCTGGGTCGTCTATC	AGGACAGGACCCAGACAATG
<i>Drd3</i>	NM_007877	AGATTCGTGAAGCAGGATAA	CGATGACAATTCTCTGTGTG
<i>Grial</i>	NM_001113325	CTGTGAATCAGAACGCCTCA	TCACTTGTCTCCACTGCTG
<i>Grin1</i>	NM_008169	ACTCCCAACGACCACTTCAC	GTAGACGCGCATCATCTCAA
<i>Adora1</i>	NM_001039510	TAGACAGTTCAGGTGGCCAG	AGTACATTTCCGGGCACAGA
<i>Adora2a</i>	NM_009630	CGCAGAGTCCATCTTCAGC	ACGTCCTCAAACAGACAGGT
<i>Cnr1</i>	NM_007726	CCGTGCTTACTTAGTTTGCT	CTGCAGCGATAGACTTTCTT
<i>Creb1</i>	NM_001037726	CCTGTTACGGTGGAGAATGG	CTTGAGGGCAGAAGTGGAAG
<i>Cart</i>	NM_013732	CGAGAAGAAGTACGGCCAAG	GGAATATGGGAACCGAAGGT
<i>Syn</i>	NM_009305	TGACTTTTTCCCCCTTCCTT	TGGGCTGACTGGTCCTCTCT
<i>Actb</i>	NM_007393	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA

Cada muestra fue analizada por duplicado utilizando 4 pmol de cada primer, 1 x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), y 2-20 ng de DNAc en un volumen total de 13 μ L. Las amplificaciones se llevaron a cabo con un Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Los datos se muestran como la Media \pm Error Estándar Medio (EEM). La actividad locomotora se analizó mediante ANOVA de dos vías (tiempo y tratamiento) para medidas repetidas, seguido del test de Tukey. La expresión de ARN fue analizada por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. Con aquellos datos que no cumplieron con los supuestos de las pruebas paramétricas (homogeneidad de varianza y distribución normal), se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa Statistica 10 y GraphPad Prism 7 respectivamente. La significancia estadística fue fijada en $P < 0.05$.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2.1

Determinar si la cafeína es capaz de potenciar el aprendizaje condicionado a cocaína en el paradigma de Condicionamiento de Preferencia de Lugar, y si eso conlleva una expresión génica diferencial en el NAc y mPFC.

Para el cumplimiento de este objetivo se utilizó el paradigma de CPP en animales expuestos a cocaína o la combinación de cocaína y cafeína, seguido del análisis de la expresión génica en el NAc y mPFC asociada al condicionamiento. Se focalizó en los niveles de expresión de algunos IEGs involucrados en la acción de drogas, aprendizaje y memoria. A su vez, para distinguir los cambios moleculares asociados al condicionamiento de aquellos inducidos por la acción de la droga *per se*, se analizó la expresión génica en animales que recibieron el mismo tratamiento, pero en su caja, sin la exposición a un ambiente diferente que se asocie a los efectos de la droga.

Paradigma comportamental

El paradigma de CPP es un modelo utilizado para el estudio del aprendizaje asociado a recompensa. Se basa en el condicionamiento a claves contextuales previamente pareadas con un estímulo reforzador (Tzschentke 2007). El aparato de CPP utilizado en estos experimentos consistió en dos cámaras de igual tamaño (25 x 20 x 20 cm) conectadas por una cámara más pequeña (25 x 7.5 x 18 cm) (Figura 15). Entre las cámaras había puertas guillotina que se mantuvieron cerradas durante el condicionamiento, y abiertas en el pre-test y el test. El CPP fue del tipo no-sesgado, lo que significa que las características del mismo no facilitaban inicialmente una preferencia clara y predecible por uno de los compartimentos (como ocurre con un compartimento claro y otro oscuro, por ejemplo). En particular, cada cámara contenía tres claves contextuales (visuales, táctiles y olfativas) diferentes entre sí: una cámara tenía el piso rugoso, el patrón de las paredes rayado, y esencia de rosas, mientras que la otra cámara tenía el piso liso, las paredes con puntos, y aroma a canela.

Los experimentos fueron filmados mediante una cámara colocada sobre el CPP, y analizados con el software Ethovision XT (Noldus). Se cuantificó automáticamente la distancia recorrida durante el condicionamiento, y el tiempo que pasó cada animal dentro de los distintos compartimentos del CPP.

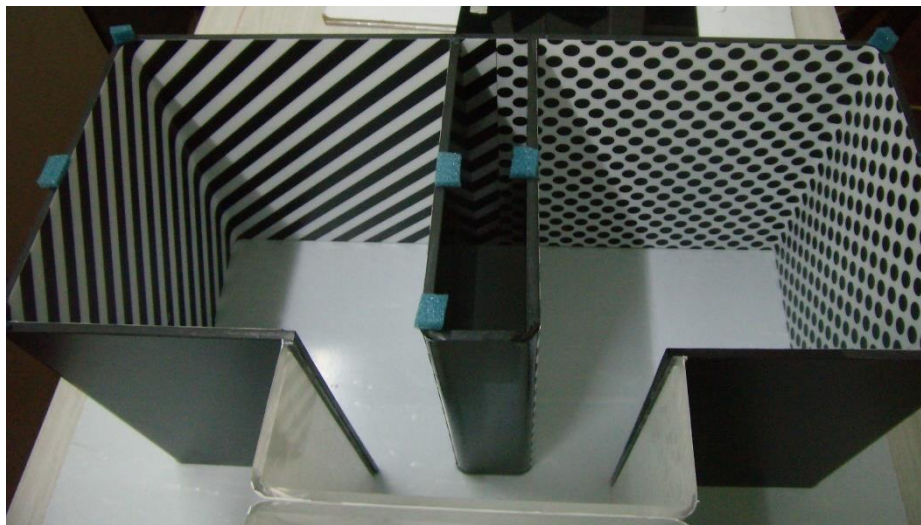


Figura 15. Modelo de CPP utilizado. Se observan las dos cámaras conectadas por una tercera más pequeña. Se aprecia la diferencia en las claves visuales dadas por el patrón de las paredes de las cámaras.

Protocolo experimental – grupos experimentales

El protocolo utilizado para evaluar el CPP, así como los grupos experimentales, se esquematizan en la Figura 16A. En primera instancia, los animales fueron manipulados dos veces por día, durante dos días, previo al inicio del experimento. La manipulación previa de los animales disminuye el estrés de los mismos, reduce el impacto de la manipulación por parte del investigador en el desarrollo del experimento, y disminuye la variabilidad entre los animales (Gouveia y Hurst 2017, Grabus y cols. 2006). En la sesión de pre-test, los animales se colocaron en la cámara central y se les permitió explorar todo el modelo durante 15 minutos, para establecer las preferencias basales. La preferencia de cada animal por cualquiera de los compartimentos se definió en base al tiempo de permanencia en cada uno de ellos.

Al día siguiente inició el condicionamiento, que consistió en dos sesiones de 30 minutos por día, durante 3 días, en los cuales los animales fueron restringidos a cada una de las cámaras de forma alternada. En la cámara inicialmente no-preferida se les administró el tratamiento con la droga: cocaína 10 mg/kg, o cafeína 5 mg/kg, o cocaína 10 mg/kg + cafeína 5 mg/kg (cámara CS+, *conditionedstimulus +*). En la cámara preferida, se les administró salino (cámara CS-). El grupo control recibió salino en ambos compartimentos. Las inyecciones se realizaron de forma i.p., en el momento previo a colocar los animales en las cámaras CS+ o CS-. La sesión (momento del día, mañana y tarde) en que los animales fueron expuestos a la cámara CS+ se dispuso de forma contrabalanceada entre y dentro de los grupos experimentales.

La sesión del test se realizó 48 hs luego del condicionamiento, en un estadio libre de droga. En esta instancia se dejó nuevamente a los animales explorar la caja durante 15

minutos, y se cuantificó el tiempo de permanencia en cada compartimento. El condicionamiento fue evaluado mediante un índice de CPP (*CPP score*), definido como el tiempo de permanencia en el compartimento CS+, menos el tiempo de permanencia en el compartimento CS-, en el día del test.

En cada instancia del protocolo, todo el modelo fue limpiado con alcohol al 30% antes de colocar el siguiente animal.

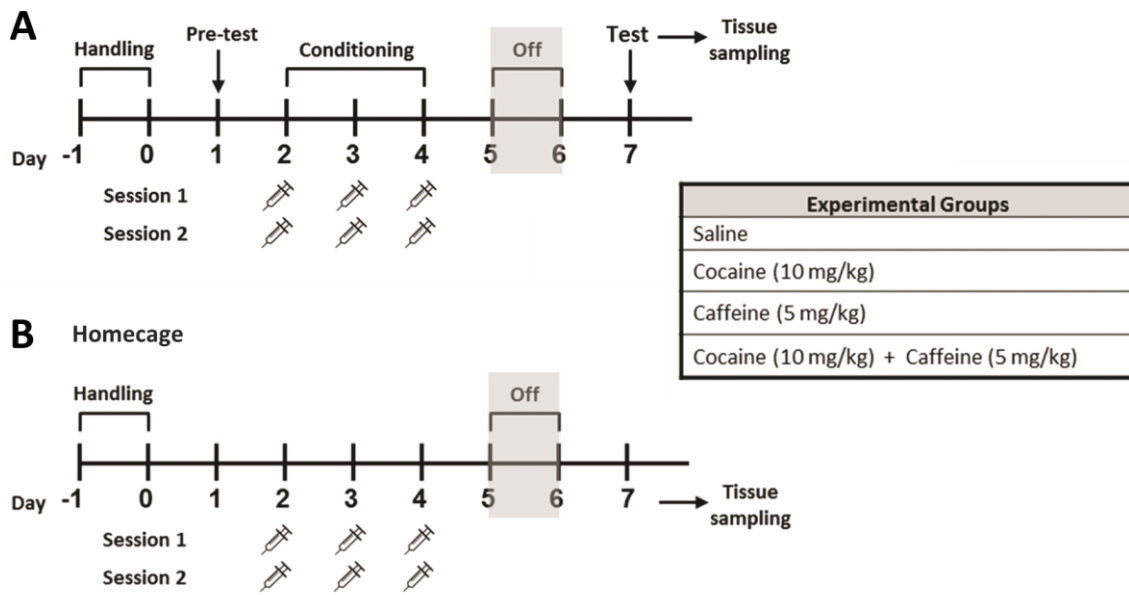


Figura 16. A. Protocolo de CPP utilizado, el cual constó de dos días de manipulación previa, un pre-test, 3 días de condicionamiento, y un test 48 horas después. Las sesiones se realizaron en la mañana y en la tarde. La recolección de tejido se realizó inmediatamente después del test **B.** Protocolo de experimento control para separar los cambios inducidos por el condicionamiento de los efectos de la droga *per se*. Se realizó el mismo protocolo de administración, pero sin fase de condicionamiento; los animales recibieron las drogas en su caja. Se indican los grupos experimentales en el recuadro.

Con el fin de diferenciar aquellos cambios en la expresión génica dados por el proceso de condicionamiento de aquellos inducidos por la sola administración de la droga, se realizó un segundo experimento, esquematizado en la Figura 16B. El mismo consistió en un protocolo de administración de las drogas idéntico al utilizado para el CPP, manteniendo los mismos días y horarios de administración, con la salvedad que los animales no fueron expuestos al aparato del CPP en ningún momento, y todas las inyecciones se realizaron en su caja.

Extracción y preservación de tejido

Una vez finalizado el test conductual, los animales fueron inmediatamente sacrificados por dislocación cervical, y se diseccionaron las regiones de interés: NAc y mPFC. El

tejido se guardó en ARN-later y se almacenó a -80°C para su conservación hasta su procesamiento y análisis.

Real-Time PCR

El análisis cuantitativo por real-time PCR se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito para el Objetivo Específico 1.2.

En este caso se diseñaron primers específicos para los siguientes genes murinos: 1) subunidades de los receptores de dopamina D1 (Drd1a) y D2 (Drd2); 2) subunidades de los receptores de adenosina A1 (Adora1) y A2A (Adora2a); IEGs cFos, FosB, cJun, Erg1, Npas4. Se utilizó la expresión del gen de beta-actina (Actb) como gen control de expresión constitutiva (*housekeeping gene*). Las secuencias de los primers utilizados se detallan en la Tabla 3.

Análisis estadístico

Los datos se muestran como la Media \pm Error Estándar Medio (EEM). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. Con aquellos datos que no cumplieron con los supuestos de las pruebas paramétricas (homogeneidad de varianza y distribución normal), se utilizó el test de Kruskal-Wallis. La actividad locomotora se analizó mediante ANOVA de dos vías (tiempo y tratamiento) para medidas repetidas, seguido del test de Bonferroni. Los datos fueron analizados con los softwares estadísticos Infostat e IBM SPSS Statistics. La significancia estadística fue fijada en $P < 0.05$.

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados

Gen	Número de acceso	Primer forward	Primer reverse
<i>Drd1a</i>	NM_010076	TTCTCCTGGTATGGCTTGG	GCTTAGCCCTCACGTTCTTG
<i>Drd2</i>	NM_010077	TATGCCCTGGGTGCTCTATC	AGGACAGGACCCAGACAATG
<i>Adora1</i>	NM_001039510	TAGACAGTTCAGGTGGCCAG	AGTACATTTCCGGGCACAGA
<i>Adora2a</i>	NM_009630	CGCAGAGTTCATCTTCAGC	ACGTCCTCAAACAGACAGGT
<i>cFos</i>	NM_010234	TCCCCAAACTTCGACCATGA	AGTTGGCACTAGAGACGGAC
<i>FosB</i>	NM_008036	ACAGATCGACTTCAGGCGGA	GTTTGTGGGCCACCAGGAC
<i>cJun</i>	NM_010591	CATAGCCAGAACACGCTTCC	TTGAAGTTGCTGAGGTTGGC
<i>Egr1</i>	NM_007913	GATGGTGGAGACGAGTTAT	GATTGGTCATGCTCACG
<i>Npas4</i>	NM_153553	CATCTGGGCCACTCTATGGT	AGGGGTCTCTTCTCTCCAGT
<i>Actb</i>	NM_007393	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA

OBJETIVO ESPECÍFICO 3.1

Evaluar la capacidad del CBD de atenuar el fenómeno de sensibilización comportamental inducido por el sucedáneo de PBC, y sus acciones sobre la actividad metabólica regional asociada, en el NAc y mPFC.

Para abordar este objetivo se administró CBD durante el desarrollo de la sensibilización locomotora a la combinación de cocaína y cafeína, y se evaluó si el mismo era capaz de impedir el efecto facilitador de la cafeína en la expresión de la sensibilización. A su vez, se evaluó el efecto de este tratamiento en la actividad metabólica regional en el NAc y mPFC mediante histoquímica de la enzima citocromo oxidasa.

Protocolo experimental – grupos experimentales

Para la inducción del fenómeno de sensibilización locomotora, se utilizó el mismo protocolo que en los Objetivos Específicos 1.1 y 1.2, descrito previamente. En este experimento los animales recibieron durante los tres días de pre-tratamiento, una inyección i.p. de CBD o su vehículo respectivo (Veh-CBD, Tween 80 al 3% en salino) 30 minutos antes de ser tratados con la combinación de cocaína 5 mg/kg y cafeína 2.5 mg/kg (Coc+Caf) o su vehículo (salino). Finalizado el pre-tratamiento, los animales quedaron en abstinencia por 5 días, y al día siguiente todos los grupos fueron desafiados con una dosis de Coc+Caf.

Se utilizaron OF de 30 x 45 x 55 cm, y se cuantificó la actividad locomotora cada día durante 60 minutos, luego de la segunda inyección (tratamiento) o luego de la dosis desafío (Día 9).

Todo el experimento fue filmado y analizado mediante el software de video-seguimiento y análisis automatizado Ethovision XT 12 (Noldus). Específicamente, se cuantificó la actividad locomotora horizontal, definida como la distancia recorrida total en metros, cada día del protocolo durante 60 minutos, iniciando inmediatamente luego de la segunda inyección (tratamiento) o luego de la dosis desafío (Día 9).

Se utilizaron OF de 30 x 45 x 55 cm, y los mismos fueron limpiados con alcohol al 30% antes de colocar el siguiente animal. Todos los procedimientos experimentales se realizaron durante la fase diurna, entre las 9:00 y 16:00 hs.

El protocolo utilizado y los grupos experimentales se esquematizan en la Figura 17.

Obtención y procesamiento del tejido para el análisis funcional

Inmediatamente luego del fin de la evaluación comportamental en el día desafío (Día 9), los animales fueron sacrificados y sus cerebros rápidamente disecados. Los cerebros fueron luego cortados en 3 trozos más pequeños mediante dos cortes coronales, realizados antero-posteriormente a nivel del quiasma óptico y el inicio del

cerebelo. Estos trozos fueron expuestos a una fijación débil por inmersión en PFA 4% en PBS (0.1M, pH= 7.4) por 15 hs. Luego, los trozos de cerebro fueron transferidos a una solución de 30 % sucrosa en PBS por 48 hs para su crioprotección. Pasado ese tiempo, los fragmentos fueron congelados y se realizaron cortes coronales de 40 μ m de ancho con crióstato (Leica Biosystems, USA) de las regiones de interés: NAc y mPFC. Los cortes obtenidos se guardaron en una solución crioprotectora y se almacenaron a -20 $^{\circ}$ C hasta la realización de los ensayos histoquímicos.

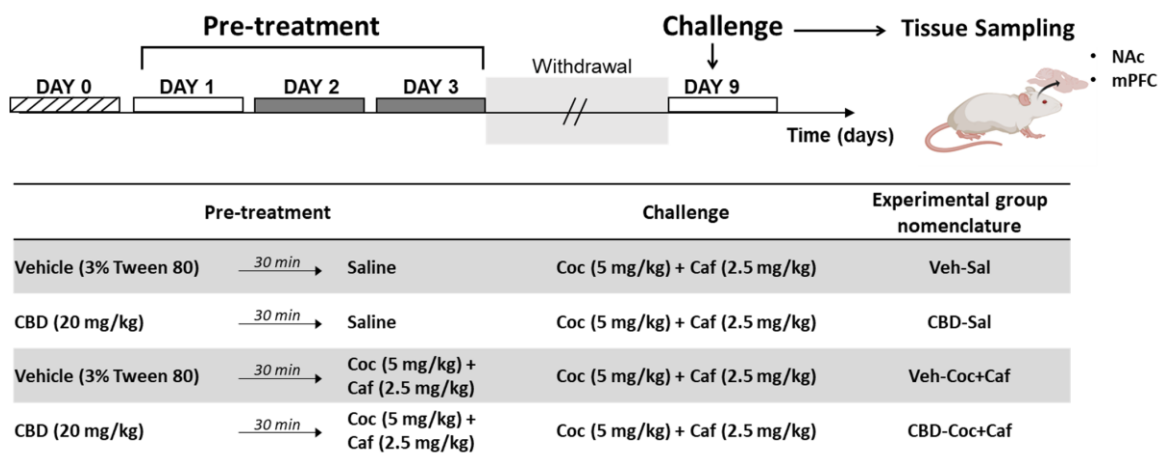


Figura 17. Protocolo de sensibilización utilizado detallando el pre-tratamiento recibido por cada grupo experimental. Cada día del pre-tratamiento los animales recibieron Veh-CBD o CBD, y 30 min después fueron inyectados con salino o Coc+Caf. Fueron dejados en abstinencia por 5 días, y en el día 9 (desafío) todos los animales fueron desafiados con una dosis de Coc+Caf. El tejido se recolectó inmediatamente después de finalizada la prueba comportamental.

Histoquímica de la enzima citocromo oxidasa

La citocromo oxidasa I (CO-I) es la subunidad principal del complejo citocromo c oxidasa, también llamado complejo respiratorio IV. Este se ubica en la membrana interna de las mitocondrias de todos los eucariotas, y constituye la enzima final de la cadena de transporte de electrones mitocondrial acoplada a la fosforilación oxidativa. En particular, la citocromo oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde su sustrato reducido ferrocitocromo c al oxígeno molecular para formar agua (Letts y Sazanov 2017, Wong-Riley 1989)

A nivel del sistema nervioso, las necesidades energéticas de las neuronas se apoyan casi por completo en el metabolismo oxidativo, por lo que la actividad de CO-I neuronal se correlaciona positivamente con su nivel de actividad funcional. De esta forma, la actividad de la CO-I puede utilizarse como un marcador endógeno de actividad metabólica neuronal (Wong-Riley 1989).

Para el ensayo histoquímico de la CO-I nos basamos en el protocolo descrito por Wong-Riley 1979 y Tseng y cols. 2006. Los cortes se montaron en portaobjetos doblemente gelatinizados y se deshidrataron a temperatura ambiente durante 30 min. Los portaobjetos fueron luego incubados por 60 minutos a 37 °C en PBC 0.1M con 0.5g/L de DAB (Sigma-Aldrich), 0.33 g/L de citocromo c de corazón de caballo (Sigma-Aldrich), 44g/L de sucrosa (Carlo Erba), y 0.2g/L de catalasa (Sigma-Aldrich). El tiempo de incubación se determinó en base a la realización previa de una curva de calibración para cada región de interés, considerando diferentes tiempos, de modo de obtener una marcación óptima que permitiera reconocer tanto un incremento como una disminución del marcado.

Luego de la incubación y deshidratación, los cortes fueron digitalizados con un escáner FLA-9000 (FUJIFILM, Japón). Las imágenes se convirtieron a escala de grises y la actividad de CO-I en las regiones de interés fue inferida a través de la cuantificación de la densidad óptica con el software ImageJ (NIH, USA). La densidad óptica relativa (ROD) por pixel se determinó mediante la resta de la densidad óptica de las estructuras de interés y la del fondo. Las estructuras de interés fueron las siguientes: mPFC total, ACC, PrL e IL; NAc total, NAc shell y core. La densidad óptica del fondo se midió en regiones de sustancia blanca, a nivel del fórceps menor del cuerpo calloso en los cortes de mPFC, y a nivel del cuerpo calloso en los cortes del NAc. Para cada animal, se obtuvo un único valor por estructura promediando las medidas de ambos hemisferios en tres cortes consecutivos.

Análisis estadístico

Los datos se muestran como la Media \pm Error Estándar Medio (EEM). La actividad locomotora se analizó mediante ANOVA de dos vías (tiempo y tratamiento) para medidas repetidas seguido del test de Tukey, y ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. La histoquímica de CO-I se analizó mediante ANOVA de una vía y test de Tukey. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa Statistica 10 y GraphPad Prism 7 respectivamente. La significancia estadística fue fijada en $P < 0.05$.

RESULTADOS I

Objetivo 1.1. Analizar la expresión de la proteína Fra-2 en el NAc y mPFC luego de un tratamiento de sensibilización locomotora inducido por la administración repetida del sucedáneo de PBC.

En primer lugar, se evaluó la sensibilización locomotora inducida por 3 días de tratamiento con cocaína (Coc, 5 mg/kg), la combinación de cocaína y cafeína (Coc+Caf, 5 mg/kg y 2.5 mg/kg respectivamente) o salino, seguido de 5 días de abstinencia (Ver Figura 12 en Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 18A, los animales tratados con Coc+Caf exhibieron un incremento marcado de la actividad locomotora durante el desarrollo de la sensibilización, diferenciándose del resto de los grupos a partir del segundo día del pre-tratamiento. Los animales tratados con cocaína, en cambio, no se diferenciaron de los grupos tratados con salino, a estas dosis.

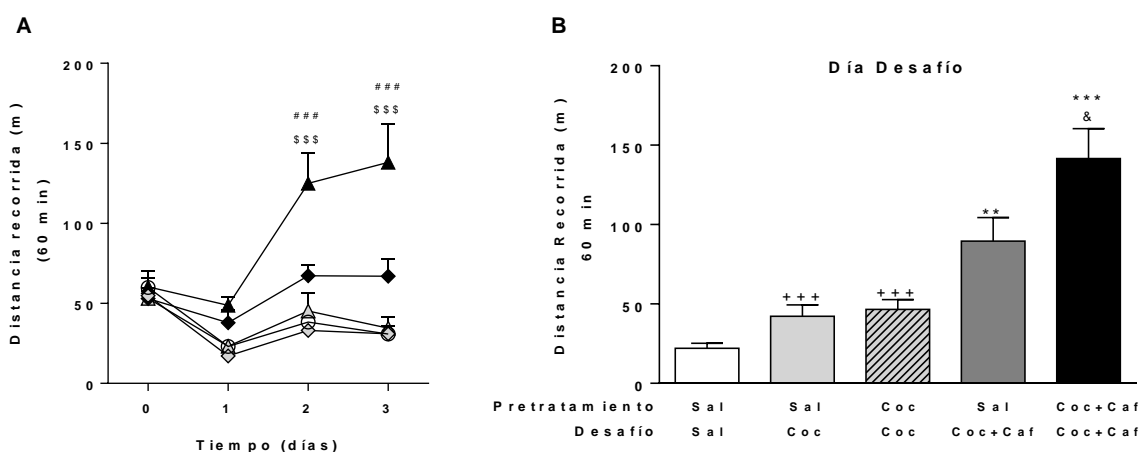


Figura 18. Sensibilización comportamental inducida por la combinación de cocaína y cafeína. **A.** Desarrollo de la sensibilización durante el pre-tratamiento. (○) Salino-Salino; (◇) Salino - Cocaína (5 mg/kg); (◆) Cocaína (5 mg/kg) - Cocaína (5 mg/kg); (△) Salino - Cocaína (5 mg/kg)+Cafeína (2,5 mg/kg); (▲) Cocaína (5 mg/kg)+Cafeína (2,5 mg/kg) - Cocaína (5 mg/kg)+Cafeína (2,5 mg/kg). **B.** Actividad locomotora en el Día Desafío (expresión de la sensibilización). Valores expresados como media \pm EEM. ### p <0.001, diferente al resto de los grupos experimentales; \$\$\$ p <0.001, diferente a Día 0 y Día 1; *** p <0.001, ** p <0.01, diferente a Sal-Sal; +++ p <0.001, diferente a Coc+Caf-Coc+Caf; & p <0.05, diferente a Sal-Coc+Caf. n =5-7.

Al ser desafiados con una dosis de la droga (Día Desafío, Figura 18B), los animales pre-tratados y desafiados con Coc+Caf mostraron una actividad locomotora significativamente mayor que aquellos que recibieron la droga por primera vez (grupo Sal-Coc+Caf), lo que demuestra la expresión de la sensibilización locomotora. Por otro

lado, los animales pre-tratados y desafiados con cocaína tuvieron una actividad locomotora muy similar al grupo Sal-Coc, que recibió cocaína una única vez, en el día desafío. Esto indica que cocaína sola no fue capaz de expresar la sensibilización locomotora a estas dosis y con sólo 3 días de tratamiento. Estos resultados se encuentran según lo esperado y reportado previamente (Prieto y cols. 2015).

Finalizada la evaluación comportamental, se realizó el análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica para la detección de la proteína Fra-2 en el NAc y mPFC (Figura 19).

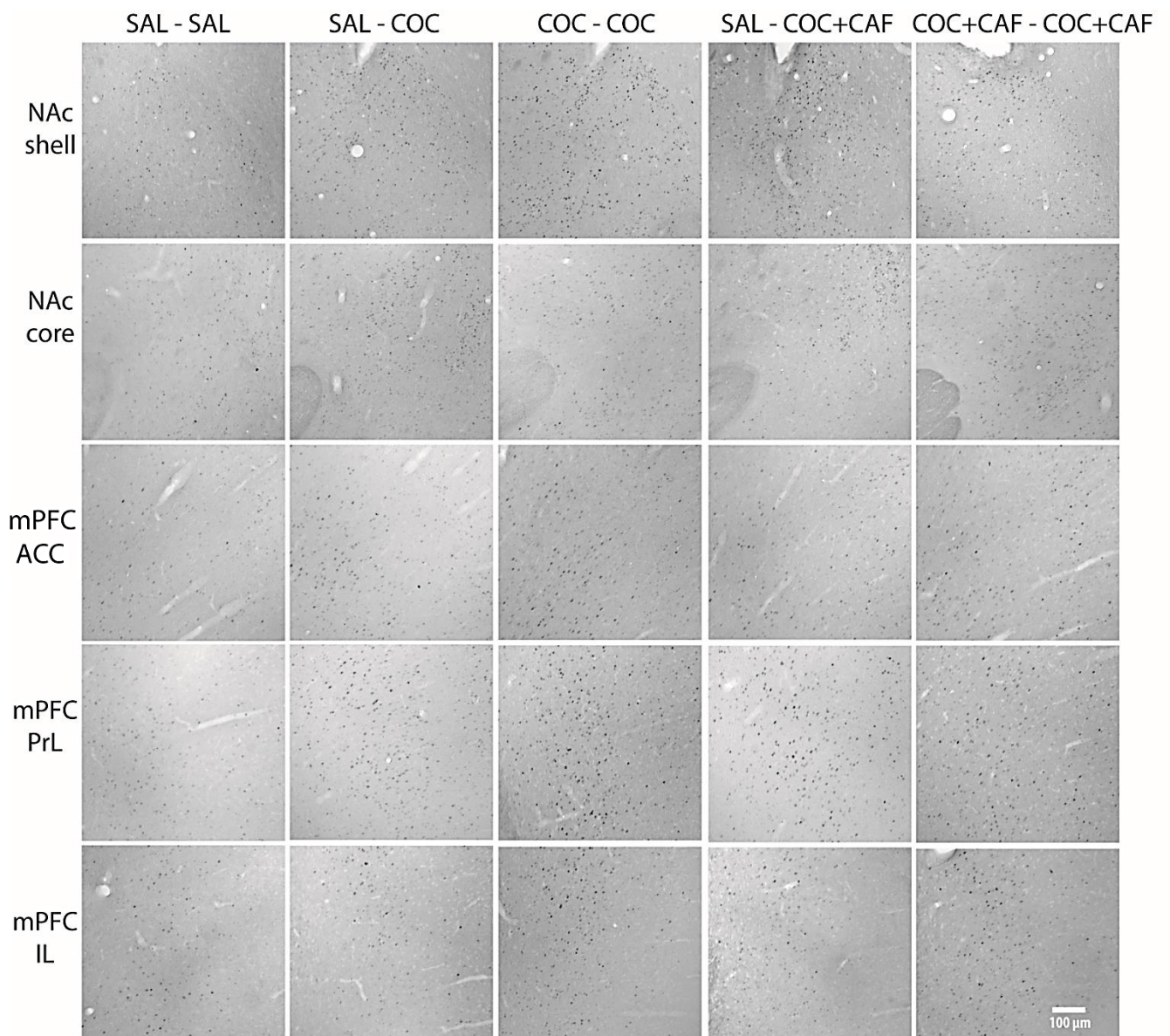


Figura 19. Núcleos neuronales inmunoreactivos a Fra-2 en el núcleo accumbens (NAc) shell y core, y en las subregiones de la corteza prefrontal medial (mPFC, corteza cingulada anterior, ACC; corteza prelímbica, PrL; y corteza infralímbica, IL), de los grupos experimentales luego del protocolo de sensibilización comportamental. Barra de escala= 100μm

como aquellos pre-tratados y desafiados con cocaína (Coc-Coc), exhibieron un incremento en la expresión de Fra-2 en el NAc shell en relación al grupo control, de magnitud similar (Figura 20A). El mismo perfil se observa en el grupo Sal-Coc+Caf, no diferenciándose de Sal-Coc ni Coc-Coc. Por otro lado, los animales tratados y desafiados con Coc+Caf, que expresaron la sensibilización locomotora, presentaron una inmunoreactividad a Fra-2 similar al grupo control Sal-Sal, y la misma fue significativamente menor a la inmunoreactividad de los demás tratamientos. En el NAc core, por el contrario, no se observaron diferencias entre los grupos experimentales (Figura 20B).

Al considerar el NAc de forma íntegra, la inmunoreactividad a Fra-2 muestra un perfil semejante al observado en el NAc shell, en el cual el grupo Coc+Caf-Coc+Caf, siendo el único capaz de expresar la sensibilización, no se diferencia del grupo control. A su vez, en los demás grupos experimentales (Sal-Coc, Coc-Coc y Sal-Coc+Caf), el desafío con la droga indujo un incremento en el número de células Fra-2 positivas en relación al control y a Coc+Caf-Coc+Caf (Figura 20C).

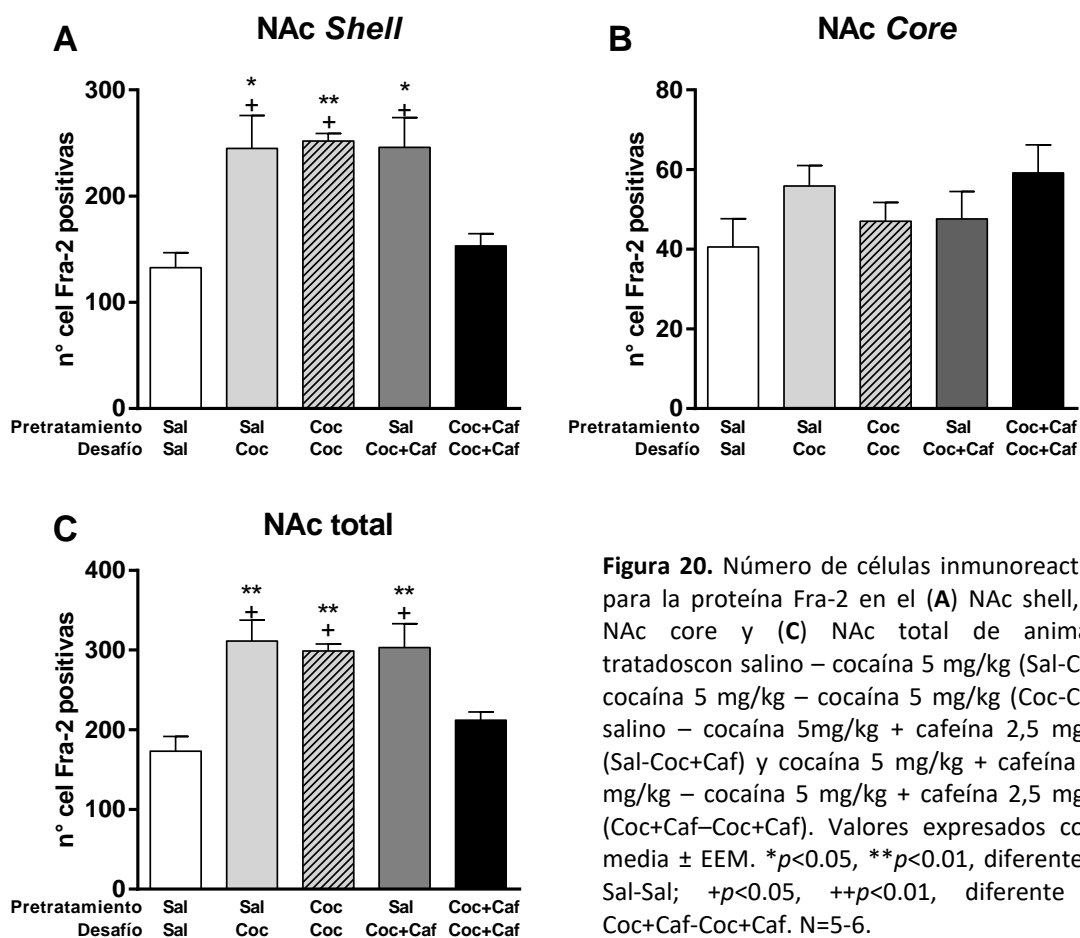


Figura 20. Número de células inmunoreactivas para la proteína Fra-2 en el (A) NAc shell, (B) NAc core y (C) NAc total de animales tratados con salino – cocaína 5 mg/kg (Sal-Coc), cocaína 5 mg/kg – cocaína 5 mg/kg (Coc-Coc), salino – cocaína 5mg/kg + cafeína 2,5 mg/kg (Sal-Coc+Caf) y cocaína 5 mg/kg + cafeína 2,5 mg/kg – cocaína 5 mg/kg + cafeína 2,5 mg/kg (Coc+Caf–Coc+Caf). Valores expresados como media ± EEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, diferente de Sal-Sal; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, diferente de Coc+Caf-Coc+Caf. N=5-6.

El análisis de la mPFC, expuesto en la Figura 21, mostró que los tratamientos indujeron efectos similares sobre la inmunoreactividad a Fra-2 en las distintas subregiones de la corteza prefrontal. El grupo Sal-Coc tendió a un incremento en la expresión de Fra-2, pero sin llegar a diferenciarse estadísticamente del control en ninguna de las subregiones analizadas (Figura 21A-C). Coc-Coc y Sal-Coc+Caf, a su vez, presentaron marcadas tendencias de una mayor inmunoreactividad a Fra-2 en las cortezas PrL e IL en relación al control, y un incremento significativo en la ACC. Por otro lado, el grupo tratado y desafiado con la combinación de cocaína y cafeína (Coc+Caf-Coc+Caf) fue el único que mostró un incremento significativo de marcación de Fra-2 en todas las subregiones de la mPFC.

Al considerar la mPFC en su totalidad, observamos que todos los tratamientos excepto aquel que incluía una única dosis de cocaína (Sal-Coc) indujeron un incremento significativo de la inmunoreactividad a Fra-2 en relación al control, lo que refleja en cierta medida la potencia de la combinación de Coc+Caf.

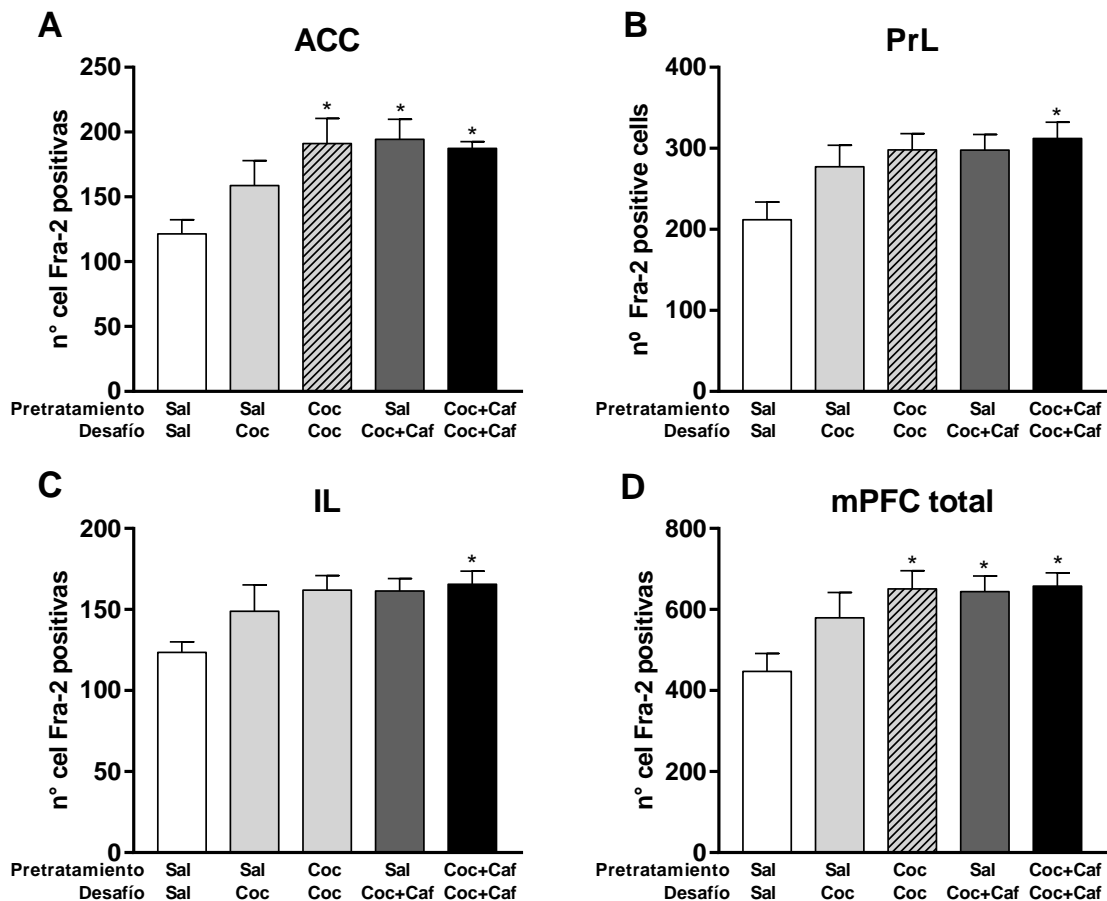


Figura 21. Número de células inmunoreactivas para la proteína Fra-2 en la (A) corteza cingulada anterior, ACC, (B) corteza prelímbica, PrL, (C) corteza infralímbica, IL, y (D) corteza prefrontal medial total, mPFC, de animales tratados con salino – cocaína 5 mg/kg (Sal-Coc), cocaína 5 mg/kg – cocaína 5 mg/kg (Coc-Coc), salino – cocaína 5mg/kg + cafeína 2,5 mg/kg (Sal-Coc+Caf) y cocaína 5 mg/kg + cafeína 2,5 mg/kg – cocaína 5 mg/kg + cafeína 2,5 mg/kg (Coc+Caf – Coc+Caf). Valores expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$, diferente de Sal-Sal. N=5-6.

Discusión

Los resultados mostraron un incremento significativo en la expresión de Fra-2 en el NAc de todos los grupos que recibieron psicoestimulantes, excepto en el único grupo capaz de expresar la sensibilización, el grupo pre-tratado y desafiado con la combinación de cocaína y cafeína (Coc+Caf).

El aumento de la inducción de IEGs luego de la administración aguda de cocaína (especialmente c-fos y también fra-2) se encuentra ampliamente reportado y establecido en la literatura (Johansson y cols. 1994, Liu y cols. 2005, Nye y cols. 1995, Torres y Rivier 1994, Uslaner y cols. 2001). De esta forma, el incremento en la inmunoreactividad a Fra-2 observada en los animales que recibieron una única dosis de cocaína (Sal-Coc) es consistente con dichas evidencias previas. Lo mismo ocurre con los animales tratados y desafiados con cocaína (Coc-Coc); al no desarrollar ni expresar la sensibilización, cuando fueron desafiados con una nueva dosis luego de un período de abstinencia, su respuesta fue indistinguible a aquellos que recibieron la droga por primera vez (Sal-Coc). La cafeína sola, por otro lado, tiene un efecto menor en la inducción de IEGs en el NAc, generando un incremento en su expresión sólo a dosis extremadamente altas, a partir de los 75 mg/kg (Bennet y Semba 1998). Dada la baja dosis de cafeína utilizada en este estudio (2.5 mg/kg), es esperable entonces, un aporte indetectable de la cafeína en la inmunoreactividad a Fra-2, al administrar de forma aguda la combinación de Coc+Caf. Esto explica los niveles similares de expresión de Fra-2 del grupo Sal-Coc+Caf a los grupos tratados con cocaína sola.

Sin embargo, pese a esta falta de acción de la cafeína aguda sobre los IEGs, el tratamiento repetido con Coc+Caf generó un efecto diferencial sobre la expresión de Fra-2. Mientras que su actividad locomotora en el día desafío fue mayor al resto de los grupos, logrando expresar la sensibilización comportamental, la inmunoreactividad a Fra-2 en el NAc no se diferenció del grupo control. De manera interesante, efectos similares sobre IEGs se han descrito para tratamientos crónicos de psicoestimulantes que resultan en la sensibilización locomotora. En particular, un trabajo realizado por Marinho y colaboradores (2017) reporta una atenuación en la expresión de c-Fos en animales desafiados con cocaína, luego de un tratamiento intermitente con dicha droga durante 15 días. A su vez, un régimen de administración más cercano al utilizado en nuestros experimentos, con 5 días de administración y 4 días de abstinencia, pero con una dosis superior (40 mg/kg, 8 veces mayor que los 5 mg/kg utilizados aquí), disminuyó tanto el ARNm de c-fos como la expresión de la proteína c-Fos (Rosen y cols. 1994). En otro estudio, el tratamiento diario con metanfetamina durante 15 días indujo una potente sensibilización locomotora, acompañada de niveles de inmunoreactividad a c-Fos indistinguibles del salino, y significativamente menores a los inducidos por el desafío agudo de la droga (McCoy y cols. 2011). Exactamente el mismo perfil se observa para la expresión de Fra-2 en el NAc luego del tratamiento

crónico con metanfetamina, en relación al control y a la administración aguda (McCoy y cols. 2011, Saint-Preux y cols. 2013).

El tratamiento repetido con cocaína también se ha asociado a niveles de inmunoreactividad a Fra-2 similares al control, particularmente en la región rostral del NAc (Franklin y Druhan 2000) y en otras porciones discretas del mismo (Todtenkopf y cols. 2002). Al respecto, vale la pena destacar que la expresión de IEGs inducida por cocaína puede variar entre las distintas subregiones del NAc dependiendo de las dosis utilizadas, tiempos de abstinencia y el régimen de administración (Larson y cols. 2010, Rosen y cols. 1994, Todtenkopf y cols. 2002); lo que podría explicar la diferencia en la respuesta observada entre el NAc core y shell. Aun así, al considerar el NAc en su totalidad, podemos apreciar que la menor respuesta en la expresión de Fra-2 del grupo sensibilizado con Coc+Caf en relación a los grupos tratados no sensibilizados, está en concordancia con lo reportado para protocolos robustos de sensibilización a psicoestimulantes. Tomando en cuenta estas evidencias, la respuesta en el NAc obtenida en estos experimentos resulta destacable, considerando que la misma se generó con sólo 3 días de pre-tratamiento. Esto sugiere que la adulteración con cafeína es capaz de promover temprana y eficazmente la cascada de adaptaciones moleculares que inicia con la inducción de IEGs.

Respecto a los mecanismos y causas de la menor respuesta de Fra-2 en el NAc de animales que expresan la sensibilización, es importante considerar que las evidencias mencionadas describen este efecto tanto para Fra-2 como para c-Fos, ambos IEGs con picos de expresión relativamente tempranos y una cinética de unión a proteínas Jun similar (Suzuki y cols. 1991). En este sentido, se ha reportado que la atenuación de c-Fos inducida por la administración crónica de anfetamina es mediada por procesos de desensibilización epigenética, debido a la acumulación de Δ FosB (Renthal y cols. 2008). La proteína Δ FosB presenta una gran estabilidad y la misma se acumula de manera gradual con las sucesivas administraciones de la droga (Nestler 2012). Esta acumulación de Δ FosB se ha propuesto como uno de los mecanismos que le otorgan cronicidad a la dependencia, y mediante el cual se mantiene la vulnerabilidad a las recaídas, incluso luego de abstinencias prolongadas (McClung y Nestler 2003, Nestler y cols. 2001, Robinson y Nestler 2011). Podemos hipotetizar, entonces, la posibilidad de que las acciones de c-Fos y Fra-2 en la sensibilización con psicoestimulantes sean requeridas principalmente al inicio o en las fases agudas, pero que, una vez consolidado el fenómeno, la relevancia de las mismas decaiga progresivamente.

Por otro lado, la sensibilización locomotora a cocaína puede acompañarse de una reducción del glutamato basal extracelular y de la fuerza sináptica en el NAc, asociada a procesos de LTD (Pierce y cols. 1996, Thomas y cols. 2001). c-Fos y Fra-2 son considerados marcadores de activación neural, y por lo tanto influenciados por la fuerza sináptica (Kovács 2008), por lo que un proceso de LTD en el NAc podría reducir su expresión. Nuestros resultados concuerdan con estos datos, al observar un menor

nivel de expresión de Fra-2 en los animales sensibilizados en relación a los no sensibilizados, en el NAc.

Sin embargo, en la mPFC se observó un aumento significativo en la inmunoreactividad a Fra-2 inducida por el tratamiento repetido con Coc+Caf, en todas las subregiones analizadas. La administración aguda de Coc+Caf, y el pre-tratamiento y desafío con cocaína, también generaron un incremento de Fra-2 en algunas subregiones de la mPFC, de magnitud similar al grupo sensibilizado. El aumento de la expresión de los IEGs *c-fos* y *fra-2* en la mPFC por el tratamiento repetido con cocaína se encuentra reportado en la literatura (Franklin y Druhan 200, Liu y Matsumoto 2008, Marinho y cols. 2017, McDougall y cols. 2009) y coincide con los resultados obtenidos, por lo que, en principio, parece no haber una reducción de la activación neural asociada a Fra-2 en esta región. Esto puede parecer inconsistente con la hipótesis de una reducción del glutamato basal proveniente de la mPFC en el NAc, esbozada más arriba. No obstante, la actividad de la inervación glutamatérgica cortical sobre el NAc se encuentra regulada por los receptores cannabinoides CB1 presentes en sus terminales sinápticas. La activación de los receptores CB1 en las aferencias glutamatérgicas del NAcc pueden reducir la liberación de glutamato y facilitar la LTD en esta región (Robbe y cols. 2001, Robbe y cols. 2002). Esto podría generar una atenuación de las aferencias GABAérgicas de las MSNs hacia el VTA, y repercutir en una desinhibición de la regulación DAérgica dada por el circuito VTA-NAc (Szabo y cols. 2002).

Si bien observamos que la sensibilización inducida por la Coc+Caf se acompaña de una expresión diferencial de Fra-2, cambios en la expresión génica de receptores de sistemas de neurotransmisión involucrados en la sensibilización, así como en moléculas involucradas en procesos de plasticidad, podrían estar mediando dicho fenómeno.

Objetivo 1.2 Evaluar cambios en la expresión de genes asociados a las acciones de drogas psicoestimulantes en el NAc y mPFC, luego de un tratamiento de sensibilización comportamental inducido por una muestra de PBC adulterada con cafeína

Los resultados obtenidos referentes al Objetivo Específico 1.2 fueron incluidos en la publicación científica 1, adjunta a continuación.

Artículo científico 1: Prieto JP, González B, Muñiz J, Bisagno V, Scorza C. (2020) Molecular changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex associated with the locomotor sensitization induced by coca paste seized samples. *Psychopharmacology (Berl)*, Epub ahead of print. doi: 10.1007/s00213-020-05474-3



Molecular changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex associated with the locomotor sensitization induced by coca paste seized samples

José Pedro Prieto¹ · Betina González² · Javier Muñiz² · Verónica Bisagno² · Cecilia Scorza¹Received: 12 July 2019 / Accepted: 28 January 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Rationale In previous studies, we have demonstrated that seized samples of a smokable form of cocaine, also known as coca paste (CP), induced behavioral sensitization in rats. Interestingly, this effect was accelerated and enhanced when the samples were adulterated with caffeine. While the cocaine phenomenon is associated with persistent functional and structural alterations in the prefrontal cortex (PFC) and nucleus accumbens (NAc), the molecular mechanisms underlying the CP sensitization and the influence of caffeine remains still unknown.

Objective We examined the gene expression in NAc and mPFC after the expression caffeine-adulterated and non-adulterated CP locomotor sensitization.

Methods The locomotor sensitization was established in C57BL/6 mice, repeatedly treated with a CP-seized sample adulterated with caffeine (CP-2) and a non-adulterated one (CP-1). We then assessed the mRNA expression of receptor subunits of the dopaminergic and glutamatergic systems in the medial PFC (mPFC) and NAc. Other molecular markers (e.g., adenosinergic, endocannabinoid receptor subunits, and synaptic plasticity-associated genes) were also analyzed.

Results Only CP-2-treated mice expressed locomotor sensitization. This phenomenon was associated with increased *Drd1a*, *Gria1*, *Cnr1*, and *Syn* mRNA expression levels in the NAc. *Drd3* mRNA expression levels were only significantly increased in mPFC of CP-2-treated group.

Conclusions Our results demonstrated that caffeine actively collaborates in the induction of the molecular changes underlying CP sensitization. The present study provides new knowledge on the impact of active adulterants to understand the early dependence induced by CP consumption.

Keywords Dopamine · Glutamate · Adenosine · Endocannabinoids · Caffeine · Addiction

Introduction

Understanding the neuroadaptations induced by chronic exposure to drugs of abuse provides essential clues about the drug addiction process. Behavioral sensitization is a useful

animal paradigm to study behavioral and neural changes associated with drug addiction (Robinson and Berridge 2008), since it underlies similar neuroadaptations to behaviors involved in drug addiction, including the reinstatement of the drug-seeking and drug-taking behavior (Vanderschuren and Kalivas 2000; Steketee and Kalivas 2011; Liu and Steketee 2016). In animal studies, sensitization is expressed as a progressive and long-lasting enhancement in locomotor activity following repeated psychostimulant pretreatment, a withdrawal period, and the animal re-exposure to the drug (Kalivas et al. 1993; Pierce and Kalivas 1997). Mesocorticolimbic dopaminergic system, arising from the ventral tegmental area (VTA) and projecting to limbic and cortical brain regions such as the nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex (PFC), is a crucial player in the effects induced by repeated exposure to drugs of abuse (Pierce and Kalivas 1997; Nestler 2005;

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00213-020-05474-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Cecilia Scorza
cscorza@iibce.edu.uy; scorzacecilia@gmail.com

¹ Departamento de Neurofarmacología Experimental, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

² Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA-UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina

Steketee and Kalivas 2011). Short- and long-term neural adaptations in cellular and molecular levels of the mesocorticolimbic circuit (e.g., gene and protein expression) have been widely demonstrated after repeated exposure to psychostimulants (Pierce et al. 1996; Nestler and Aghajanian 1997; Hearing et al. 2012).

Cocaine is an alkaloid extracted from coca leaves (*Erythroxylum coca* bush) through a chemical process that ends with the obtainment of the cocaine hydrochloride. Since cocaine hydrochloride is hydrophilic, this constitutes its intranasal or intravenous form of consumption. However, other forms of cocaine (base) are used through the pulmonary inhalation route. Crack and coca paste (CP) or cocaine paste base are the most known smokable forms of cocaine (Hatsukami and Fischman 1996). CP is consumed mainly in Latin American countries (United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC 2013; Pascale et al. 2014) and it is defined as the earliest intermediate product of the mentioned cocaine alkaloid extraction process (Castaño 2000; United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC 2013). Like crack, the consumption of CP elicits a rapid and strong dependence due to smoke inhalation (Jeri 1984; Gossop et al. 1992; Samaha and Robinson 2005), and, in the case of CP, the presence of active adulterants in its content may collaborate in its abuse liability (López Hill et al. 2011; Prieto et al. 2016). As a common phenomenon in the illicit drugs market, substances including cocaine hydrochloride, crack, and CP are sold adulterated (Evrard et al. 2010; López Hill et al. 2011; Prieto et al. 2012; Sabogal and Urrego 2012; Fukushima et al. 2014; Broséus et al. 2016; Abin Carriquiry et al. 2018). Based on forensic data from drug-seized samples, we have reported that caffeine is one of the most common adulterants found in CP-seized samples (Abin Carriquiry et al. 2018). We have previously demonstrated that the repeated intraperitoneal treatment of CP elicited locomotor sensitization in rats and the presence of caffeine accelerated and enhanced its expression (Prieto et al. 2015). Using the same proportions of cocaine and caffeine found in CP-seized samples, we demonstrated that caffeine is able to stimulate the acute motor stimulation of cocaine (López Hill et al. 2011) and increase the reinforcing and motivational value of cocaine in the self-administration paradigm (Prieto et al. 2016). Moreover, caffeine potentiates cocaine reward-associated learning in the conditioning place preference test (Muñiz et al. 2017) and enhances the acute wake-promoting effect of cocaine (Schwarzkopf et al. 2018). Accordingly, other studies reported that the combined and repeated administration of cocaine and caffeine (at similar proportion to those found in CP-seized samples) in a *binge-like* regimen resulted in striatal reactive astrogliosis, suggesting maladaptive changes in striatal function (Muñiz et al. 2016). Besides, a clinical study was recently published showing neurocognitive markers of interoception signal increased in smoked cocaine consumers compared to control and

cocaine (hydrochloride). Although the contribution of adulterants was not studied, this work provides relevant information about the psychophysiological and neurocognitive adaptations triggered by CP addiction (de la Fuente et al. 2019). All these findings give support to understand the prototypical clinical profile observed in CP abusers (Jeri 1982; Ferrando et al. 2009; Pascale et al. 2010; Pascale et al. 2014).

There is a growing body of scientific evidence demonstrating that repeated psychostimulant exposure including cocaine induces changes in the expression of receptors belonging to many neurotransmitter systems. However, data are still not available showing the molecular changes underlying the CP sensitization. It is widely known that cocaine behavioral sensitization has been associated with changes in dopamine receptor expression (Puig et al. 2014), especially in those highly present in mesocorticolimbic projection areas, like D1, D2, and D3 receptors (Volkow et al. 2009; Steketee and Kalivas 2011; Sokoloff and Le Foll 2017). Enduring changes in glutamatergic neurotransmission were also reported after cocaine sensitization with a key role of AMPA and NMDA receptors (Boudreau and Wolf 2005; Wolf and Ferrario 2010; Steketee and Kalivas 2011). Moreover, it has been demonstrated that cocaine sensitization decreases the endocannabinoid (eCB) signaling and promote a hyperglutamatergic state in the PFC (Blanco et al. 2014), as well as increase the AMPA/NMDA receptor ratio in NAc (Kourrich et al. 2007). Adenosine has been implicated in the reward-related behavior and is able to modulate the DA neurotransmission through the adenosine receptors A1 and A2A (Filip et al. 2012; Ballasteros-Yáñez et al. 2018). Interestingly, caffeine (antagonist of A1 and A2A receptors) is able to modulate cocaine locomotor effects (Ballasteros-Yáñez et al. 2018).

As little is known about the neuroplastic events induced by adulterants that are commonly added to CP samples, like caffeine, the present study was designed to explore plasticity changes elicited by the repeated treatment of a CP-seized sample adulterated with caffeine (CP-2) and a non-adulterated one (CP-1) in mice following a locomotor sensitization regime. mRNA expression of dopaminergic, glutamatergic, adenosinergic, and eCB receptor subunits, together with synaptic plasticity-associated genes (cAMP-response element binding protein, *Creb1*; cocaine- and amphetamine-regulated transcript, *Cart*; and synaptophysin, *Syn*), was assessed in the NAc and mPFC.

Materials and methods

Animals

Male C57BL/6 mice (10–12 weeks old) from the Institut Pasteur of Montevideo animal facilities were employed. All animals were housed in a light- and temperature-controlled

room with a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 am) and had free access to food and water. All experimental procedures were conducted in agreement with the National Animal Care Law (No. 18611) and with the “Guide to the care and use of laboratory animals” (8th edition, National Academy Press, Washington DC, 2010). Furthermore, the Institutional Animal Care Committee approved the experimental procedures. Efforts were made to use the minimal number of animals necessary to obtain reliable scientific data.

Drugs and doses

CP-seized samples (CP-1 and CP-2) were supplied by the Technical Forensic Institute (Uruguay), with the authorization of the National Drug Board and the Ministry of Public Health (Uruguay), from a seized drug shipment targeted for the Uruguayan illicit drug market. Table 1 shows the substances present in CP-1 and CP-2 (cocaine and active adulterants) after a chemical analysis previously performed and reported in Abin Carriquiry et al. (2018). The chemical analysis indicated that CP-1 contained 60% of cocaine base and was not adulterated with caffeine, while CP-2 had 63.8% of cocaine base and 36.2% of caffeine (Abin Carriquiry et al. 2018). No other active adulterants were found in any of the samples (Table 1), and the number of impurities (i.e., substances present in the drug as a natural result of the manufacturing process) was negligible. Both samples were selected based on previous published data regarding the acute effects and the locomotor sensitization elicited by CP-seized samples with the same cocaine/caffeine ratio (López Hill et al. 2011; Prieto et al. 2015). Cocaine hydrochloride (pure) was generously donated by Verardo & Cía Laboratory (Argentina). CP was dissolved in a vehicle solution containing 2% hydrochloric acid (HCl) and enough sodium hydroxide to titrate the solution to a pH of 6.3. Cocaine hydrochloride was dissolved in saline. In previous studies, we confirmed that the CP-vehicle administration did not induce any physiological effect and was indistinguishable of saline (López Hill et al. 2011). CP-1- and CP2-seized samples were intraperitoneally injected at an equivalent cocaine dose of 5 mg/kg, and cocaine was administered at 5 mg/kg. Control animals were injected with saline.

Despite that our laboratory has provided strong evidence demonstrating that the combination of cocaine and caffeine is a valid surrogate of caffeine-adulterated CP samples (López Hill et al. 2011; Prieto et al. 2012; Meikle et al. 2013; Prieto et al. 2015; Prieto et al. 2016; Muñiz et al. 2017; Abin Carriquiry et al. 2018; Schwarzkopf et al. 2018), a routine pilot study was included in the present work, in order to confirm that the combination of cocaine and caffeine and caffeine-adulterated CP samples exert similar biological effects within the context of the current work. Specifically, the locomotor effect elicited by the acute administration of each chosen CP samples (at an equivalent cocaine dose of 5 mg/kg) in comparison with that induced by cocaine (5 mg/kg) or the combination of cocaine (5 mg/kg) plus caffeine (2.5 mg/kg) was performed. Results are shown as a supplementary material (see Online Resource 1). As expected, CP-1-treated group showed a similar activity to the cocaine-treated group (CP-1 surrogate), and similarly, CP-2-treated group motor activity was indistinguishable from the group injected with the combination of cocaine plus caffeine (CP-2 surrogate).

Behavioral assays: locomotor sensitization

Mice were moved to an experimental room with controlled conditions 24 h previous the beginning of the experiments. Measurement of locomotor sensitization was carried out using the Open Field (OF) paradigm, consisting of 30 × 40 × 35-cm acrylic boxes. The experiments were recorded and analyzed with the Ethovision XT12 video-tracking software (Noldus, the Netherlands). We measured the horizontal locomotor activity, defined as the total distance moved in meters (m). Animals were randomly assigned to different experimental groups which received CP-1, CP-2, cocaine (COC), or saline. The experimental schedule is shown in Fig. 1. Based on a previous study (Prieto et al. 2015), 1-day preceding drug treatment, animals were habituated to the OF over a 60-min period (day 0) in which basal locomotor activity was recorded. Then, animals were treated for 3 days, once a day, and distance moved was assessed each day for 60 min after the drug (CP-1, CP-2, COC) or saline administration. After that, animals were kept in their home

Table 1 Chemical analysis of both CP-seized samples

CP samples	mg/g of cocaine and active adulterants					
	Cocaine	Caffeine	Phenacetin	Lidocaine	Aminopyrine	Benzocaine
CP-1	600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CP-2	638	362	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Table shows the chemical analysis of both CP samples used in this study showing the content of cocaine and main active adulterants. Data are expressed as mg of each compound/g of CP. These two samples were selected from a complete chemical analysis of a series of 306 samples previously analyzed (Abin-Carriquiry et al. 2018). Quantifications were calculated taking standard solution of all the compounds as reference

N.d. non-detectable levels

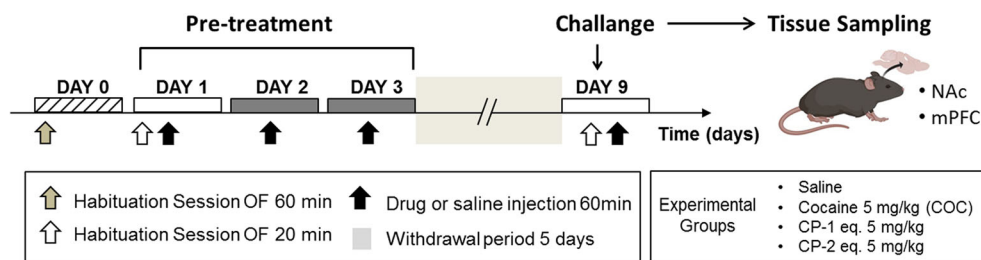


Fig. 1 Schematic representation of the experimental protocol used in this study. Mice were treated with CP-1 and CP-2, cocaine or saline during 3 days, and the locomotor activity was recorded each day. Five days later

(withdrawal period), animals were challenged (day 9) with the corresponding treatments. Tissue samples were taken immediately after the end of the behavioral testing on the challenge day (day 9)

cages for a 5-day withdrawal period. On day 9, mice were challenged with a new injection of the corresponding treatment (CP-1, CP-2, or COC), and locomotor activity was recorded for 60 min. On days 1 and 9, before drug injection, animals were put in the OF for 15-min habituation period, to assess the basal locomotion before and after the drug treatment and context association effects. During the experiments, the OF was cleaned with alcohol 30% after each session, before placing the following animal.

Molecular assays: real-time PCR

Immediately after the end of the last behavioral session (day 9), mice were sacrificed, and its brain rapidly removed. mPFC and NAc were dissected out, placed on dry ice, and then stored at -80°C in RNA later until further assays. Total RNA was isolated using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Five hundred nanograms (ng) of RNA were treated with DNase I (Invitrogen) and reverse-transcribed in a 20- μL reaction using M-MLV reverse transcriptase (Promega) and random hexamer (Biodynamics). For quantitative real-time PCR primers, sets were designed for the specific amplification of murine *Drd1a*, *Drd2*, *Drd3*, *Gria1*, *Grin1*, *Adora1*, *Adora2a*, *Cnr1*, *Creb1*, *Cart*, *Syn*, and *Actb* as a housekeeping control gene (sequences listed in Table 2). Each sample was assayed in duplicate using 4 pmol of each primer, 1 \times SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), and 2–20 ng of cDNA in a total volume of 13 μL . Amplification was carried out in an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Data are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Locomotor activity was analyzed by two-way (time and pretreatment) ANOVA with repeated measures followed by Tukey post hoc test. RNA expression was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. Before performing ANOVAs, data sets of each

of the different experimental variables were inspected for homogeneity of variances and normal distribution among the four experimental groups. Kruskal-Wallis ANOVA on ranks was performed when data did not comply with the assumptions of parametric tests. STATISTICA 10 software was used for the analysis. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Locomotor sensitization induced by CP-2 but not CP-1

Figure 2 a shows the effect of CP-1, CP-2, and COC treatment in locomotor activity during the first day and the challenge day of the protocol. All animals had similar basal activity measured on the day preceding the beginning of drug treatment (data not shown). Locomotor sensitization was defined as a greater total distance moved after drug injections on the challenge day (day 9) compared to the first drug exposure (day 1). Repeated measures two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [$F_{(3,29)} = 6.67, p < 0.01$] and day [$F_{(1,29)} = 10.16, p < 0.01$], but not for treatment \times day interaction [$F_{(3,29)} = 2.75, p > 0.05$]. As shown in Fig. 2 a, Tukey post hoc analysis showed that only the CP-2 group achieved locomotor sensitization, since an increased distance moved on day 9 was observed compared to the day 1 ($p < 0.05$). No changes were observed in both days in COC- and CP-1-treated groups. The locomotor activity of vehicle and treated groups for each day is shown in Table 3. Figure 2 b shows the distance moved of animals in the 15-min habituation period on days 1 and 9, before the drug administration. Repeated measures two-way ANOVA showed no significant treatment effects [$F_{(3,29)} = 0.70, p > 0.05$], but significant day [$F_{(1,29)} = 32.86, p < 0.001$] and treatment \times day interaction [$F_{(3,29)} = 5.02, p < 0.01$] effects. Only CP-2-treated mice exhibited a higher locomotor activity when re-exposed to the OF on day 9 in a drug-free state than they did on day 1 ($p < 0.05$). This result suggests an emergence of drug-context association during the repeated treatment only for CP-2.

Table 2 Primer sequences

Gene	Ac. Number	Primer forward	Primer reverse
<i>Drd1a</i>	NM_010076	TTCTTCCTGGTATGGCTTGG	GCTTAGCCCTCACGTTCTTG
<i>Drd2</i>	NM_010077	TATGCCCTGGGTCGTCTATC	AGGACAGGACCCAGACAATG
<i>Drd3</i>	NM_007877	AGATTCGTGAAGCAGGATAA	CGATGACAATTCTCTGTGTG
<i>Gria1</i>	NM_001113325	CTGTGAATCAGAACGCCTCA	TCACTGTCTCCACTGCTG
<i>Grin1</i>	NM_008169	ACTCCCAACGACCACTTCAC	GTAGACGCGCATCATCTCAA
<i>Adora1</i>	NM_001039510	TAGACAGTTCAGGTGGCCAG	AGTACATTTCCGGGCACAGA
<i>Adora2a</i>	NM_009630	CGCAGAGTTCATCTTCAGC	ACGTCCTCAAACAGACAGGT
<i>Cnr1</i>	NM_007726	CCGTGCTTACTTAGTTTGCT	CTGCAGCGATAGACTTTCTT
<i>Creb1</i>	NM_001037726	CCTGTTACGGTGGAGAATGG	CTTGAGGGCAGAAAGTGAAG
<i>Cart</i>	NM_013732	CGAGAAGAAGTACGGCCAAG	GGAATATGGGAACCGAAGGT
<i>Syn</i>	NM_009305	TGACTTTTTCCCCCTTCCTT	TTGGCTGACTGGTCCTCTCT
<i>Actb</i>	NM_007393	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA

Changes in gene expression induced by CP-1 and CP-2 in the NAc and mPFC

We evaluated the gene expression profile of different genes that are responsive to psychostimulant action in the NAc and

mPFC, including neurotransmitter receptors like dopamine receptors *Drd1a*, *Drd2*, and *Drd3*, adenosine receptors *Adora1* and *Adora2a*, glutamate receptor subunits AMPA-type *Gria1* and NMDA-type *Grin1*, cannabinoid receptor *Cnr1*, transcription factors like *Creb1*, neuropeptides like *Cart*, and the marker of synaptic plasticity *Syn*.

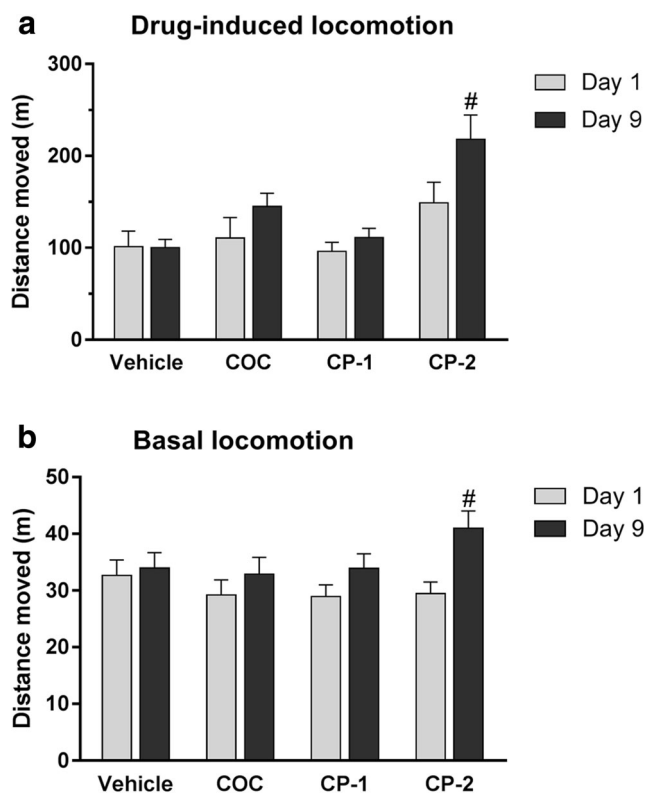


Fig. 2 Effect of cocaine, unadulterated CP sample (CP-1) and caffeine-adulterated CP sample (CP-2) on locomotor sensitization. **a** Total distance moved on day 1 and day 9 of the sensitization protocol. **b** Distance moved during the 15-min habituation to the open field prior to the drug injection on day 1 and day 9. Data are expressed as mean ± SEM. Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. [#]*p* < 0.05 different from day 1. *N* = 8

CP-2-treated mice expressing locomotor sensitization showed specific changes in the expression of some molecular markers in NAc in comparison with the control group and other treated groups (Fig. 3 a–k). ANOVA analysis showed significant differences across treatments for *Drd1a* [$F_{(3,20)} = 7.61, p < 0.01$], AMPA-type *Gria1* [$F_{(3,20)} = 9.79, p < 0.001$], *Cnr1* [$F_{(3,20)} = 3.75, p < 0.05$], and *Syn* [$F_{(3,20)} = 5.70, p < 0.01$]. Tukey post hoc test revealed an increased expression of *Drd1a* only in CP-2 group compared to saline, COC, and CP-1 ($p < 0.05$). No changes were observed in the other dopamine receptor subunits. Interestingly, NMDA-type *Grin1* showed reduced expression in animals treated with COC and CP-1, but not with CP-2 (Kruskal-Wallis $H = 14.08, p < 0.01$). For adenosine receptor subunits, there were no changes in *Adora1* gene expression, whereas an overall tendency to a reduced expression of *Adora2a* can be appreciated in all treated groups compared to saline [$F_{(3,20)} = 3.55, p < 0.05$], although Tukey post hoc showed that only CP-1 group reached statistical significance ($p < 0.05$). Significant differences among treatments were also found in *Cart* [$F_{(3,20)} = 5.68, p < 0.01$]. Mice treated with CP-1 showed increased *Cart* mRNA expression compared to saline and CP-2 ($p < 0.05$). No significant changes in *Creb1* expression were found in the NAc after any treatment.

CP-2-treated mice expressing locomotor sensitization showed fewer changes in the expression of the molecular markers in the mPFC than those found in NAc (Fig. 4 a–k), suggesting that mPFC was less responsive to the sensitization treatment used in this study than NAc. ANOVA

Table 3 Locomotor activity for each day of the sensitization protocol, induced by cocaine, CP-1 and CP-2

Treatment	Day 1	Day 2	Day 3	Day 9
Saline	105.33 ± 18.57	107.86 ± 14.02	110.71 ± 14.24	99.41 ± 10.17
COC	110.61 ± 22.38	144.91 ± 17.05	153.47 ± 20.14	144.78 ± 14.62
CP-1	96.47 ± 9.32	121.53 ± 10.38	116.58 ± 13.56	111.18 ± 9.93
CP-2	148.79 ± 22.45	192.77 ± 19.73*	219.23 ± 20.42****	218.04 ± 26.53****,##

Table shows the locomotor effect of the systemic administration of COC, CP-1, and CP-2 (5 mg/kg) on each day of the sensitization protocol, during the 60 min. Data are expressed as mean ± SEM. Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey post hoc test. Only comparisons between groups on the same days are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ different from saline (control group); ## $p < 0.01$ different from CP-1. $N = 8$

followed by Tukey post hoc analysis showed significant differences across treatments solely for *Drd3* [$F_{(3,20)} = 8.13$, $p < 0.001$] and *Creb1* [$F_{(3,20)} = 5.95$, $p < 0.01$]. For *Drd3*, CP-2 induced a marked increase of *Drd3*

expression compared to saline, COC, and CP-1 ($p < 0.01$). For *Creb1*, all treatments showed a higher level of mRNA expression compared to saline ($p < 0.05$), with no differences among them.

NAC

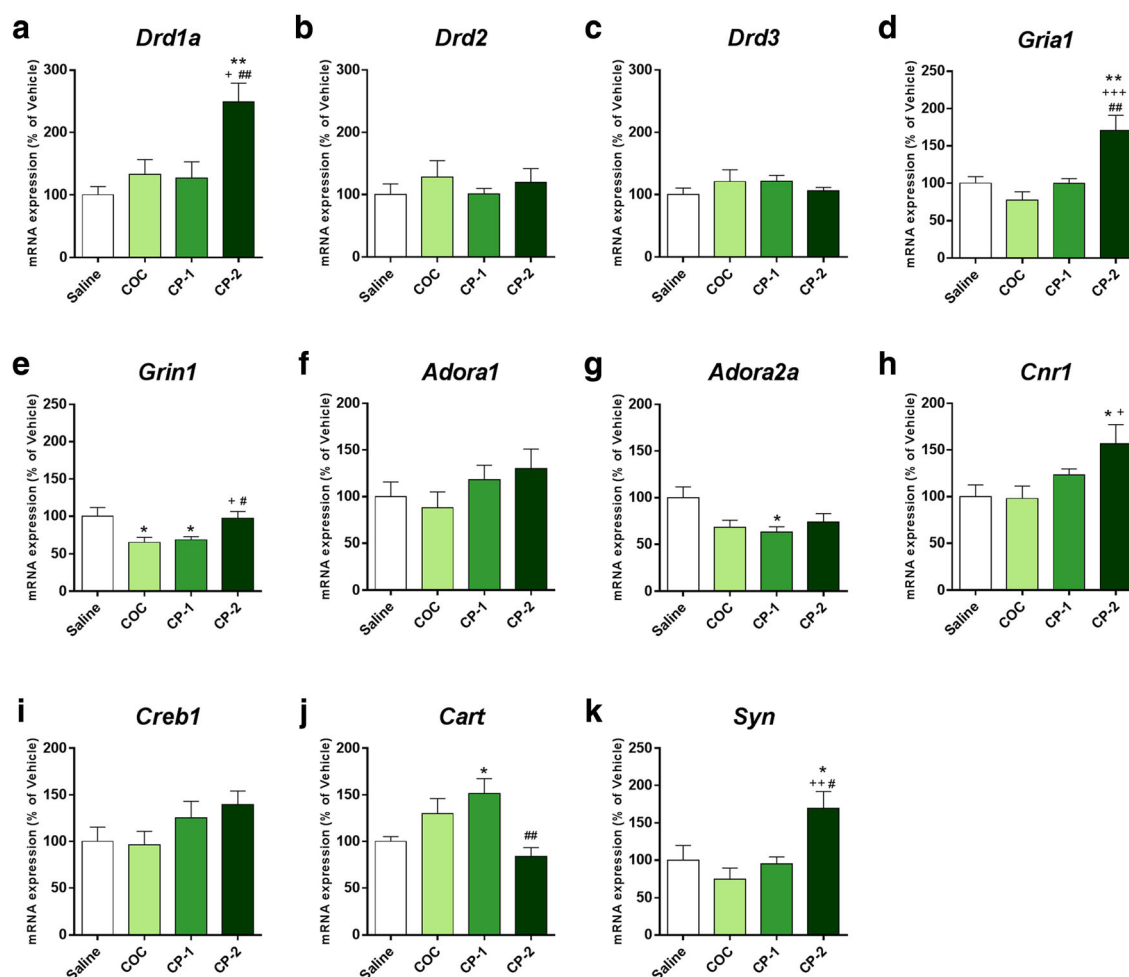


Fig. 3 Gene expression changes in the NAc induced by CP sensitization. Analysis of mRNA levels by RT-PCR of **a** dopamine D1 (*Drd1a*), **b** D2 (*Drd2*), **c** D3 (*Drd3*), **d** AMPA (*Gria1*), **e** NMDA (*Grin1*), **f** A1 (*Adora1*), **g** A2A (*Adora2a*), and **h** CB1 (*Cnr1*), **i** CREB (*Creb1*), **j** CART (*Cart*), and **k** synaptophysin (*Syn*) genes. Data are expressed as mean ± SEM.

One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks was used for *Grin1* data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ different from saline (control group); + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ different from COC; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ different from CP-1. $N = 6$

mPFC

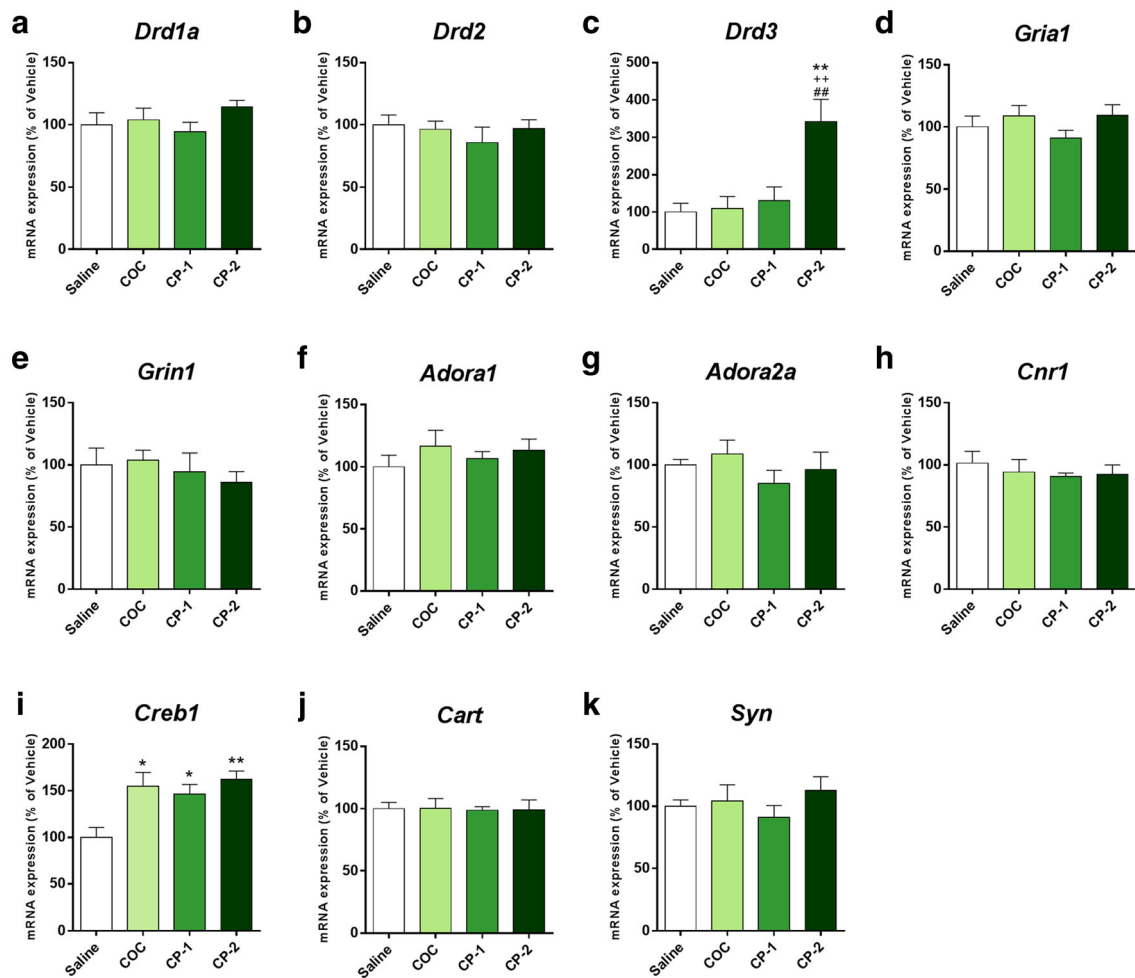


Fig. 4 Gene expression changes in the mPFC induced by CP sensitization. Analysis of mRNA levels by RT-PCR of **a** D1 (*Drd1a*), **b** D2 (*Drd2*), **c** D3 (*Drd3*), **d** AMPA (*Gria1*), **e** NMDA (*Grin1*), **f** A1 (*Adora1*), **g** A2A (*Adora2a*), and **h** CB1 (*Cnr1*), **i** CREB (*Creb1*), **j**

k CART (*Cart*), and **k** synaptophysin (*Syn*) genes. Data are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ different from saline (control group); ++ $p < 0.01$, different from COC; ## $p < 0.01$ different from CP-1. $N = 6$

Discussion

The present study shows that locomotor sensitization induced by a CP-seized sample adulterated with caffeine is accompanied by increases in *Drd1a*, *Gria1*, *Cnr1*, and *Syn* mRNA expression in the NAc and *Drd3* expression in the mPFC, two brain areas which integrate the mesocorticolimbic dopaminergic system intimately involved in the neurobiological processes of cocaine abuse (Steketee and Kalivas 2011).

We observed the expression of sensitization only in CP-2-treated mice in comparison with CP-1 or COC, which did not evoke the behavioral response. In accordance with our previous study (Prieto et al. 2015), present results reinforce the idea that caffeine (in CP-2) has a relevant role in the elicitation of those molecular changes which underlie the sensitization phenomenon, although not due to an effect per se but to its

interaction with cocaine action. This assumption is strongly supported by two findings. First, the behavioral response observed here was mimicked in a previous study (Prieto et al. 2015) using the combination of cocaine plus caffeine at the proportion found in CP-2 (5 and 2.5 mg/kg, respectively). Second, the repeated treatment with caffeine alone at 2.5 mg/kg was behaviorally indistinguishable from saline (Prieto et al. 2015) and changes in gene expression were only observed from 5-mg/kg dose of caffeine and more intensive protocols (Muñiz et al. 2016; Muñiz et al. 2017). Overall, the assayed dose of caffeine is enough to interact and collaborate with cocaine action to elicit significant changes in some of the analyzed molecular markers.

Caffeine is an unspecific antagonist of adenosine A1 and A2A receptors (Fisone et al. 2004; Ferré 2016), although some pieces of evidence suggest a predominant role of A2A

receptors, especially at low caffeine doses (Yacoubi et al. 2000). Filip et al. (2006a) showed that the A2A antagonist MSX-3 increases cocaine locomotor activation, explained by the antagonistic interaction between A2A and D2 receptors (Ferré 2016). A similar neurochemical effect is probably involved during the sensitization induced by the caffeine-adulterated CP observed here and in our previous study (Prieto et al. 2015). However, the underlying molecular changes of this phenomenon remained to be reported.

Here, we found distinct changes in the expression of some receptor subunits and synaptic plasticity genes that were present solely in the CP-2-treated group, which could be related to its differential behavioral response. In NAc, a specific increased *Drd1* mRNA expression was observed, while other dopamine receptor subunits genes analyzed (*Drd2* and *Drd3*) were unchanged. While it has been reported that different patterns of cocaine administration (intermittent vs. binge pattern) induced different modifications in dopaminergic receptors (Puig et al. 2014), the relevance of D1 receptors in cocaine locomotor sensitization is well established. This phenomenon can be blocked by the D1 receptor antagonism (Pierce and Kalivas 1997) and is absent in D1 receptors *knockout* mice (Xu et al. 2000). Our results imply a predominant role of D1 receptors in CP-2 sensitization since it was the only one affected by the treatment. Low dose of cocaine alone (both in COC- or CP-1-treated group) seems not to be large enough to elicit change in the expression of these receptors. Interestingly, Zhang et al. (2017) showed that D1 receptor activation promotes cocaine-induced synaptic plasticity of the glutamatergic signaling in the NAc. Actually, long-lasting changes in glutamate transmission in this region are critical for cocaine-induced behavioral sensitization (Wolf 1998; Allain et al. 2017). Zhang et al. (2017) demonstrated an increased number of asymmetrical synapses and postsynaptic density length in NAc neurons after the repeated treatment with cocaine, which was inhibited by D1 receptor antagonist SCH23390. Consistent with this evidence, and the fact that in the NAc and the dorsal striatum, most asymmetric synapses are glutamatergic in nature (Johnson et al. 1994; Pinto et al. 2003), we found an increased synaptophysin and GLUR1 mRNA expression in CP-2-sensitized animals.

Synaptophysin is an integral membrane glycoprotein of the presynaptic vesicles that is often used as an indicator of synaptic density and plasticity (Rodríguez-Espinosa and Fernández-Espejo 2015). Our results agree with Zhang et al. (2017) and suggest plasticity mechanisms occurring in sensitized animals, which can be glutamatergic, considering the increased *Gria1* expression. Similar results were obtained by Churchill et al. (1999), who observed enhanced expression of GLUR1 in the NAc only in those animals which developed behavioral sensitization. In contrast to GLUR1, CP-2 did not induce any change in NMDA receptor subunit 1 (NMDAR1) mRNA expression, while COC and CP-1 decreased it,

suggesting a differential AMPA/NMDA subunit composition (Yamamoto and Zahniser 2012) following the treatment with adulterated and non-adulterated CP.

We also found increased levels of CB1 mRNA expression in CP-2-sensitized animals, suggesting that the eCBs system participates in the behavioral response. Several reports support an essential role of this system over cocaine use disorder and cocaine-induced plasticity (Fattore et al. 2007; Filip et al. 2006b; Blanco et al. 2014; Mereu et al. 2015). Specific mechanisms involving eCBs in the striatum have been proposed to explain motor stimulation induced by combined co-administration of cocaine and A2A-R antagonists (e.g., caffeine). Both compounds lead to a Ca^{2+} -mediated and retrograde release of eCBs, which can also modify the excitatory transmission by the stimulation of CB1 receptors located on presynaptic glutamatergic terminals (Tozzi et al. 2012). Moreover, CB1 receptor activation on glutamatergic innervation in NAc can facilitate long-term synaptic depression (LTD) and reduce glutamate release (Robbe et al. 2001; Robbe et al. 2002), which in turn can attenuate the GABAergic output (from the medium spiny neurons) to the VTA and cause a disinhibition of dopaminergic VTA-NAc pathway (Szabo et al. 2002). In addition to these findings, experiments using the self-administration paradigm showed that yoked animals which passively received cocaine for 14 days had increased CB1 receptor expression in NAc (Adamczyk et al. 2012; Bystrowska et al. 2018). Remarkably, we found a similar increase of CB1 mRNA expression in CP-2-sensitized animals after a shorter administration regime, suggesting that the composition of CP-2 facilitates the onset of plasticity mechanisms involving changes in the eCBs system, as well as in dopaminergic and glutamatergic signaling pathways. This interpretation is supported by the results from COC- or CP-1-treated group, in which we did not observe any of the changes described.

Significant changes in adenosine receptors were not observed under this treatment, indicating that the CP-2-induced sensitization is not mediated by changes in the adenosinergic system. It is likely that the amount of caffeine present in CP-2 be enough to boost the behavioral response but not to alter the expression of this type of receptors.

CART is a critical regulatory peptide that can reduce cocaine actions and decrease dopamine release in NAc (Kuhar 2016; Rakovska et al. 2017). CART exhibits an interesting expression dynamic: its expression is augmented after acute or short cocaine administration protocols, mediated predominantly by D1 receptors (Hu et al. 2015), but after a repeated treatment, the over-expression of CART is gradually reduced, along with its attenuating locomotor effects, ultimately reaching basal levels in fully sensitized animals (Hu et al. 2015; Job et al. 2013). The loss of the CART's negative

regulatory effects on the reward pathway after the repeated drug administration has been hypothesized to be part of the addictive process (Kuhar 2016). Hu et al. (2015) described an increased CART mRNA levels in mice treated with 15 mg/kg of cocaine for 5 days, which returned to basal levels on the 7th day of treatment. In our study, CP-1 showed an increased CART mRNA expression after the treatment as expected, while CP-2 had no difference with the saline group, suggesting an early loss of CART regulatory actions accompanying the locomotor sensitization. CREB, on the other hand, is involved in the regulation of CART gene expression (Lakatos et al. 2002), and its upregulation in NAc by cocaine mediates tolerance to its reinforcing effects (Bilbao et al. 2014; McClung and Nestler 2003). We did not observe any changes in *Creb1* expression, as was not expected to see any tolerance effects with the treatment and doses used.

Molecular changes in the mPFC were restricted to *Drd3* and *Creb1* genes, but only *Drd3* changes were exclusive of the CP-2 sensitized group, suggesting a significant role of this receptor (Filip et al. 2002). It has been postulated that D3 receptors in PFC can modulate reward-related learning induced by low doses of cocaine (Kong et al. 2011), and notably, CP-2 group was the only one showing context-association effects (Fig. 2b). Besides, D3 receptors also participate in other drug-evoked effects, including cocaine sensitization (Filip et al. 2002), and its activation in PFC has been associated with the weakened inhibitory control from PFC which characterize chronic cocaine consumption (Baler and Volkow 2006; Chen et al. 2011). Although the precise role of D3 receptors in the CP-2 sensitization is challenging to establish, our results indicate that further attention should be paid to these receptors in mPFC when studying chronic psychostimulants consumption. Alterations at the transcriptional level should be interpreted carefully, since the protein level may differ by post-transcriptional regulation mechanisms (Tobón et al. 2015). However, our results provide strong evidence that CP-2 sensitization is accompanied by changes in the expression of genes related to long-term drug-induced plasticity, usually associated with chronic cocaine intake, and increased vulnerability to drug-induced reinstatement of drug-seeking behavior (De Vries et al. 1998). Interestingly, our results are complementary with a current work which reported changes in the expression of immediate-early genes associated to specific behavioral effects induced by a CP-seized sample and related to CP addiction (Berardino et al. 2019).

In conclusion, our study provides novel evidence about molecular mechanisms associated to the behavioral sensitization induced by caffeine-adulterated CP. Unraveling these underlying mechanisms will help to understand the impact of active adulterants in the early and strong dependence observed in CP users.

Funding information This study was fully supported by PROLAB-IBRO grant 2016 and partially by Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA-Uruguay), and the *Premio Concursable Junta Nacional de Drogas 2015*. José Pedro Prieto has a postgraduate fellowship from ANII (Uruguay).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abin Carriquiry JA, Martínez Busi M, Galvalisi M, Minteguiga M, Prieto JP, Scorza C (2018) Identification and quantification of cocaine and active adulterants in coca-paste seized samples: useful scientific support to health care. *Neurotox Res* 34:295–304
- Adamczyk P, Faron-Górecka A, Kusmider M, Dziedzicka-Wasylewska M, Papp M, Filip M (2012) Long-lasting increase in [³H]CP55,940 binding to CB1 receptors following cocaine self-administration and its withdrawal in rats. *Brain Res* 1451:34–43
- Allain F, Roberts D, Lévesque D, Samaha A (2017) Intermittent intake of rapid cocaine injections promote robust psychomotor sensitization, increased incentive motivation for the drug, and mGlu2/3 receptor dysregulation. *Neuropharmacol* 117:227–237
- Baler R, Volkow N (2006) Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. *Trends Mol Med* 12:559–566
- Ballasteros-Yáñez I, Castillo C, Merighi S, Gessi S (2018) The role of adenosine receptors in psychostimulant addiction. *Front Pharmacol* 8:985
- Berardino B, Fesser E, Belluscio L, Gianatiempo O, Pregi N, Cánepa E (2019) Effects of cocaine base paste on anxiety-like behavior and immediate-early gene expression in nucleus accumbens and medial prefrontal cortex of female mice. *Psychopharmacology (Berlin)* 236: 3525–3539. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05321-0>
- Bilbao A, Rieker C, Cannella N, Parlato R, Golda S, Piechota M, Korostynski M, Engblom D, Przewlocki R, Schultz G (2014) CREB activity in dopamine D1 receptor expressing neurons regulates cocaine-induced behavioral effects. *Front Neurosci* 8:212
- Blanco E, Pavón F, Palomino A, Luque-Rojas MJ, Serrano A, Rivera P, Bilbao A, Alen F, Vida M, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F (2014) Cocaine-induced behavioral sensitization is associated with changes in the expression of endocannabinoid and glutamatergic signaling system in the mouse prefrontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol*:1–10
- Boudreau A, Wolf M (2005) Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 25:9144–9151
- Broséus J, Gentile N, Esseiva P (2016) The cutting of cocaine and heroin: A critical review. *Forensic Sci Int* 262:73–83
- Bystrowska B, Frankowska M, Smaga I, Pomierny-Chamióło L, Filip M (2018) Effects of cocaine self-administration and its extinction on the rat brain cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Neurotox Res* 34(3):547–558
- Castaño GA (2000) Cocainas fumables en Latinoamérica. *Adicciones* 12: 541–550
- Chen Y, Famous K, Xu H, Choi J, Mandeville J, Schmidt H, Pierce C, Jenkins B (2011) Cocaine self-administration leads to alterations in temporal responses to cocaine challenge in limbic and motor circuitry. *Eur J Neurosci* 34:800–815
- Churchill L, Swanson C, Urbina M, Kalivas P (1999) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens

- and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* 42:2397–2403
- de la Fuente A, Sedeño L, Vignaga SS, Ellmann C, Sonzogni S, Belluscio L, García-Cordero I et al (2019) Multimodal neurocognitive markers of interoceptive tuning in smoked cocaine. *Neuropsychopharmacol* 44:1425–1434. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0370-3>
- De Vries T, Schoffelmeier A, Binnekade R, Mulder A, Vanderschuren L (1998) Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioral sensitization. *Eur J Neurosci* 10:3565–3571
- Evrard I, Legleye S, Cadet-Taïrou A (2010) Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *Int J Drug Policy* 21(5):399–406
- Fattore L, Spano M, Deiana S, Melis V, Cossu G, Fadda P, Fratta W (2007) An endocannabinoid mechanism in elapse to drug seeking: a review of animal studies and clinical perspectives. *Brain Res Rev* 53:1–16
- Ferrando R, Bocchino S, Barrachina A, Ferro A, Rodríguez J, Silveira A, Ventura R, Gioia A, López A, Langhain M, Cardoso A, Zumendi P, Triaca J, Lago G (2009) Alteraciones de la perfusión cerebral en consumidores activos de pasta base de cocaína. *Rev Psiquiatr Uru* 73:51–62
- Ferré S (2016) Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. *Psychopharmacology (Berlin)* 233:1963–1979
- Filip M, Papla I, Czeplak K (2002) Role of dopamine D3 receptors in controlling the expression of cocaine sensitization in rats. *Pol J Pharmacol* 54:867–891
- Filip M, Frankowska M, Zaniewska M, Przegaliński E, Müller CE, Agnati L, Franco R, Roberts D, Fuxe K (2006a) Involvement of adenosine A2A and dopamine receptors in the locomotor and sensitizing effects of cocaine. *Brain Res* 1077:67–80
- Filip M, Golda A, Zaniewska M, McCreary A, Nowak E, Kolasiewicz W, Przegaliński E (2006b) Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimobant on behavioral responses induced by cocaine. *Pharmacol Rep* 58:806–819
- Filip M, Zaniewska M, Frankowska M, Wydra K, Fuxe K (2012) The importance of the adenosine A2A receptor-dopamine D(2) receptor interaction in drug addiction. *Curr Med Chem* 19:317–355
- Fisone G, Borgkvist A, Usiello A (2004) Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 61:857–872
- Fukushima AR, Carvalho VM, Carvalho DG, Diaz E, Bustillos JO, Spinosa HD et al (2014) Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. *Forensic Sci Int* 243C:95–98
- Gossop M, Griffiths P, Powis B, Strang J (1992) Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine, and amphetamines. *Br J Addict* 87:1527–1536
- Hatsukami D, Fischman M (1996) Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *JAMA* 276:1580–1588
- Hearing MC, Zink AN, Wickman K (2012) Cocaine-induced adaptations in metabotropic inhibitory signaling in the mesocorticolimbic system. *Rev Neurosci* 23(4):325–351
- Hu Z, Oh EH, Chung Y, Hong J, Oh KW (2015) Predominant D1 receptors involvement in the over-expression of CART peptides after repeated cocaine administration. *Korean J Physiol Pharmacol* 19:89–97
- Jeri F (1982) The coca paste epidemic in South America: epidemiological, clinical, experimental and therapeutic observations. *Revi Sanid Fuerzas Polic* 43(2):170–179
- Jeri F (1984) Coca-paste smoking in some Latin American countries: a severe and unabated form of addiction. *Bull Narc* 36:15–31
- Job M, Shen L, Kuhar M (2013) The inhibition of cocaine-induced locomotor activity by CART 55-102 is lost after repeated cocaine administration. *Neurosci Lett* 550:179–183
- Johnson LR, Aylward RL, Hussain Z, Totterdell S (1994) Input from the amygdala to the rat nucleus accumbens: its relationship with tyrosine hydroxylase immunoreactivity and identified neurons. *Neurosci* 61:851–865
- Kalivas P, Sorg B, Hooks M (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 4:315–334
- Kong H, Kuang W, Li S, Xu M (2011) Activation of dopamine D3 receptors inhibits reward-related learning induced by cocaine. *Neurosci* 176:152–161
- Kourrich S, Rothwell P, Klug J, Thomas M (2007) Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 27:7921–7928
- Kuhar M (2016) CART peptides and drugs of abuse: a review of recent progress. *J Drug Alcohol Res* 5
- Lakatos A, Dominguez G, Kuhar M (2002) CART promoter CRE site binds phosphorylated CREB. *Mol Brain Res* 104:81–85
- Liu K, Steketeer J (2016) The role of adenylyl cyclase in the medial prefrontal cortex in cocaine-induced behavioral sensitization in rats. *Neuropharmacol* 111:70–77
- López Hill X, Prieto J, Meikle M, Urbanavicius J, Prunell J, Abin Carriquiry A, Umpiérrez E, Scorza C (2011) Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav Brain Res* 221:134–141
- McClung C, Nestler E (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* 6:1208–1212
- Meikle MN, Prieto JP, Urbanavicius J, López X, Abin-Carriquiry JA, Prunell G, Scorza MC (2013) Anti-aggressive effect elicited by coca-paste in isolation-induced aggression of male rats: influence of accumbal dopamine and cortical serotonin. *Pharmacol Biochem Behav* 110:216–223
- Mereu M, Tronci V, Chun L, Thomas A, Green J, Katz J, Tanda G (2015) Cocaine-induced endocannabinoid release modulates behavioral and neurochemical sensitization in mice. *Addict Biol* 20:91–103
- Muñiz J, Gomez G, González B, Rivero-Echeto MC, Cadet JL, García-Rill E, Urbano F, Bisagno V (2016) Combined effects of simultaneous exposure to caffeine and cocaine in the mouse striatum. *Neurotox Res* 29:525–538
- Muñiz J, Prieto JP, González B, Sosa M, Cadet JL, Scorza C, Urbano F, Bisagno V (2017) Cocaine and caffeine effects on the conditioned place preference test: concomitant changes on early genes within the mouse prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Front Behav Neurosci* 11:200
- Nestler EJ (2005) The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 3:4–10
- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278:58–63
- Pascale A, Negrin A, Laborde A (2010) Pasta base de cocaína: experiencia del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico. *Adicciones* 22:227–232
- Pascale A, Hynes M, Cumsille F, Bares C (2014) Consumo de pasta base de cocaína en América del Sur: revisión de los aspectos epidemiológicos y médico-toxicológicos. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas. Organización de los Estados Americanos
- Pierce C, Kalivas P (1997) Circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25:192–216
- Pierce C, Bell K, Duffy P, Kalivas P (1996) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* 16:1550–1560
- Pinto A, Jankowski M, Sesack SR (2003) Projections from the paraventricular nucleus of the thalamus to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens shell: ultra-structural characteristics and spatial relationships with dopamine afferents. *J Comp Neurol* 459:142–155

- Prieto JP, Meikle M, López Hill X, Urbanavicius J, Abin Carriquiry A, Prunell G, Scorza MC (2012) Relevancia del adulterante activo cafeína en la acción estimulante de la pasta base de cocaína. *Rev Psiquiatr Uru* 76:35–48
- Prieto JP, Galvalisi M, López Hill X, Meikle MN, Abin Carriquiry JA, Scorza C (2015) Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am J Addict* 24:475–481
- Prieto JP, Scorza C, Serra GP, Perra V, Piras G, Galvalisi M, Abin Carriquiry JA, Valentini V (2016) Cocaine motivational value is enhanced when co-administered with caffeine: relevance of adulterants in reinforcement. *Psychopharmacol* 233:2879–2889
- Puig S, Marie N, Benturquia N, Noble F (2014) Influence of cocaine administration patterns on dopamine receptor regulation. *Psychopharmacology (Berlin)* 231:3131–3137
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni O (2001) Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 21:109–116
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni O (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8384–8388
- Robinson T, Berridge K (2008) The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 363:3137–3146
- Rodriguez-Espinosa N, Fernandez-Espejo E (2015) Effects of acute and repeated cocaine on markers for neural plasticity within the mesolimbic system in rats. *Neuropsychopharmacol* 232:57–62
- Sabogal J, Urrego J (2012) Quantifying the chemical composition of crack-cocaine (bazuco) samples seized in Colombia during the first half of 2010. *J Public Health* 14(6):1014–1025
- Samaha A, Robinson T (2005) Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends Pharmacol Sci* 26:82–87
- Schwarzkopf N, Lagos P, Falconi A, Scorza C, Torterolo P (2018) Caffeine as an adulterant of coca paste seized samples: preclinical study on the rat sleep-wake cycle. *Behav Pharmacol* 29(6):519–529
- Sokoloff P, Le Foll B (2017) The dopamine D3 receptor, a quarter century later. *Eur J Neurosci* 45:2–19
- Steketee J, Kalivas P (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 63:348–365
- Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I (2002) Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci* 15:2057–2061
- Tobón K, Catuzzi J, Cote S, Sonaike A, Kuzhikandathil E (2015) Post-transcriptional regulation of dopamine D1 receptor expression in caudate-putamen of cocaine-sensitized mice. *Eur J Neurosci* 42:1849–1857
- Tozzi A, de Iure A, Marsili V, Romano R, Tantucci M, Di Filippo M, Costa C et al (2012) A2A adenosine receptor antagonism enhances synaptic and motor effects of cocaine via CB1 cannabinoid receptor activation. *PLoS One* 7(6):e38312
- United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC (2013) *Pasta Básica de Cocaína: Cuatro décadas de historias, actualidad y desafíos*. UNODC, Lima
- Vanderschuren L, Kalivas P (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacol* 151:99–120
- Volkow N, Fowler J, Wang G, Baler R, Telang F (2009) Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacol* 56:3–8
- Wolf M (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 54:679–720
- Wolf ME, Ferrario CR (2010) AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neurosci Biobehav Rev* 35:185–211
- Xu M, Guo Y, Vorhees C, Zhang J (2000) Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Res* 852:198–207
- Yacoubi M, Ledent C, Menard J et al (2000) The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *Br J Pharmacol* 129:1465–1473
- Yamamoto DJ, Zahniser NR (2012) Differences in rat dorsal striatal NMDA and AMPA receptors following acute and repeated cocaine-induced locomotor activation. *PLoS One* 7(5):e37673
- Zhang L, Huang L, Lu K, Liu Y, Tu G, Zhu M, Ying L, Zhao J, Liu N, Guo F, Zhang L, Zhang L (2017) Cocaine-induced synaptic structural modification is differentially regulated by dopamine D1 and D3 receptors-mediated signaling pathways. *Addict Biol* 22:1842–1855

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

RESULTADOS II

Objetivo 2.1 Determinar si la cafeína es capaz de potenciar el aprendizaje condicionado a cocaína en el paradigma de Condicionamiento de Preferencia de Lugar, y si eso conlleva una expresión génica diferencial en el NAc y mPFC

Los resultados obtenidos del desarrollo del Objetivo Específico 2.1 fueron incluidos en la publicación científica 2, adjunta a continuación.

Es importante mencionar que en dicho artículo científico se incluye una serie más extensa de resultados, que superan los incluidos en este trabajo de Tesis. En particular, el artículo incluye un experimento enfocado en la evaluación de la expresión génica luego de una única sesión de condicionamiento. En función de la hipótesis de la Tesis y la pregunta particular asociada al Objetivo Específico 2.1, los resultados que forman parte de esta tesis son aquellos que se enfocan en el proceso completo de condicionamiento (Experimento 1 en el artículo), y el experimento control en dónde se administró el mismo tratamiento, pero sin la exposición a un ambiente novedoso/diferente (Experimento 3 en el artículo).

Artículo científico 2: Muñiz J*, Prieto JP*, González B, Sosa M, Cadet JL, Scorza C, Urbano F, Bisagno V. (2017) Cocaine and caffeine effects on the conditioned place preference test: concomitant changes on early genes within the mouse prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11:200. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00200

*= Primera autoría compartida



Cocaine and Caffeine Effects on the Conditioned Place Preference Test: Concomitant Changes on Early Genes within the Mouse Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens

Javier A. Muñiz^{1,2†}, José P. Prieto^{3†}, Betina González^{1,2}, Máximo H. Sosa^{1,2}, Jean L. Cadet⁴, Cecilia Scorza³, Francisco J. Urbano⁵ and Verónica Bisagno^{1,2*}

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, ² Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina, ³ Departamento de Neurofarmacología Experimental, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, ⁴ National Institute on Drug Abuse (NIDA), Intramural Program, Molecular Neuropsychiatry Research Branch, Baltimore, MD, United States, ⁵ Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

OPEN ACCESS

Edited by:

Amelia Gallitano,
University of Arizona, United States

Reviewed by:

Mary Kay Lobo,
University of Maryland, United States
Andrew L. Eagle,
Michigan State University,
United States

*Correspondence:

Verónica Bisagno
vbisagno@ffyb.uba.ar

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Received: 28 May 2017

Accepted: 04 October 2017

Published: 18 October 2017

Citation:

Muñiz JA, Prieto JP, González B, Sosa MH, Cadet JL, Scorza C, Urbano FJ and Bisagno V (2017) Cocaine and Caffeine Effects on the Conditioned Place Preference Test: Concomitant Changes on Early Genes within the Mouse Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens. *Front. Behav. Neurosci.* 11:200. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00200

Caffeine is the world's most popular psychostimulant and is frequently used as an active adulterant in many illicit drugs including cocaine. Previous studies have shown that caffeine can potentiate the stimulant effects of cocaine and cocaine-induced drug seeking behavior. However, little is known about the effects of this drug combination on reward-related learning, a key process in the maintenance of addiction and vulnerability to relapse. The goal of the present study was thus to determine caffeine and cocaine combined effects on the Conditioned Place Preference (CPP) test and to determine potential differential mRNA expression in the Nucleus Accumbens (NAc) and medial prefrontal cortex (mPFC) of immediate-early genes (IEGs) as well as dopamine and adenosine receptor subunits. Mice were treated with caffeine (5 mg/kg, CAF), cocaine (10 mg/kg, COC), or their combination (caffeine 5 mg/kg + cocaine 10 mg/kg, CAF-COC) and trained in the CPP test or treated with repeated injections inside the home cage. NAc and mPFC tissues were dissected immediately after the CPP test, after a single conditioning session or following psychostimulant injection in the home cage for mRNA expression analysis. CAF-COC induced a marked change of preference to the drug conditioned side of the CPP and a significant increase in locomotion compared to COC. Gene expression analysis after CPP test revealed specific up-regulation in the CAF-COC group of *Drd1a*, *cFos*, and *FosB* in the NAc, and *cFos*, *Egr1*, and *Npas4* in the mPFC. Importantly, none of these changes were observed when animals received same treatments in their home cage. With a single conditioning session, we found similar effects in both CAF and CAF-COC groups: increased *Drd1a* and decreased *cFos* in the NAc, and increased expression of *Drd1a* and *Drd2*, in the mPFC. Interestingly, we found that *cFos* and *Npas4* gene expression were increased only in the mPFC of the CAF-COC. Our study provides evidence that caffeine acting as an adulterant could potentiate reward-associated memories elicited by cocaine. This is associated

with specific changes in IEGs expression that were observed almost exclusively in mice that received the combination of both psychostimulants in the context of CPP memory encoding and retrieval. Our results highlight the potential relevance of caffeine in the maintenance of cocaine addiction which might be mediated by modifying neural plasticity mechanisms that strengthen learning of the association between drug and environment.

Keywords: caffeine, cocaine, immediate-early genes, nucleus accumbens, prefrontal cortex, learning

INTRODUCTION

Addictions are brain disorders that affect neural pathways involved in reward, motivation, and memory (Volkow et al., 2012). Recent neurobehavioral studies have shown that drug users show a number of cognitive deficits that may be secondary to drug-induced changes in brain structure and function (Cadet and Bisagno, 2016). Learned associations between the rewarding effects of a drug, and contextual stimuli present at the time of drug use, are a central component of acquiring and maintaining drug seeking behavior, and are capable of inducing relapse (Volkow et al., 2012). Understanding the mechanisms that underlie these unwanted memories should provide insight into effective therapies aimed at reducing context-induced relapse.

Cocaine is a highly addictive psychostimulant and is rarely obtained on the illegal market in its pure form (Cole et al., 2011). Forensic analyses of seized illicit cocaine samples usually report variable quantities of caffeine (López-Hill et al., 2011; Sena et al., 2017). Caffeine deserves a special consideration on its own. Energy drinks marketed as dietary supplements or beverages usually contain caffeine as their active ingredient (Sena et al., 2017). Such supplements are taken to enhance cognitive performance but might also influence mood and sleep (Childs, 2014). In clinical settings, caffeine intake is positively correlated with substance-use disorders (Kendler et al., 2006) and has been shown to increase illicit drug use (Miller, 2008).

In preclinical studies, we have previously demonstrated that caffeine can potentiate cocaine-mediated motor (Prieto et al., 2015; Muñiz et al., 2016) and motivational effects (Prieto et al., 2016). Also, caffeine potentiates striatal reactive astrogliosis induced by cocaine (Muñiz et al., 2016) or MDMA (Khairnar et al., 2010) and cocaine-mediated testicular toxicity (González et al., 2015).

Expression of immediate-early genes (IEGs) has been shown to be induced by activity-dependent synaptic plasticity or behavioral training and is thought to play an important role in memory storage (Cruz et al., 2015). IEGs encode regulatory transcription factors and a variety of proteins that act on diverse cellular processes (Cruz et al., 2013). Several IEGs have been of particular interest due to their association with synaptic plasticity and learning. These include *Egr1* (early growth response gene 1) (Veyrac et al., 2014) or *Npas4* (neuronal Per-Arnt-Sim domain protein 4) (Spiegel et al., 2014).

Findings reviewed above suggest that distinct neuroadaptations can emerge in the central nervous system (CNS) with the combination of caffeine and cocaine. At the basis of such neuroadaptations lie changes in the expression of IEGs. However, information is scarce regarding potential additive effects of these two psychostimulants on transcriptional

regulators controlling genomic responses of activated neurons within the mesolimbic circuit. Therefore, in the present study we investigated changes in expression of IEGs (*cFos*, *FosB*, *cJun*, *Egr1*, *Npas4*) as well as Dopamine and Adenosine receptor subunits mRNA changes in the Nucleus Accumbens (NAc) and medial Prefrontal Cortex (mPFC), as a consequence of combined administration of caffeine and cocaine. We compared molecular changes induced by associative learning with both psychostimulants, using the conditioned place preference (CPP) test, with those obtained after repeated psychostimulant injections given in the home cage.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male C57BL/6 mice (10–12 weeks old) from the School of Exact and Natural Sciences of the University of Buenos Aires (UBA) were housed in a light- and temperature-controlled room. Mice had free access to food and water. We followed “Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research” (National Research Council (US) Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, 2003) and approved by IACUC Committee of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Universidad de Buenos Aires (Protocol Number: EXP_UBA N° 40944/20151). Mice were euthanized by cervical dislocation performed by an individual proficient in this technique.

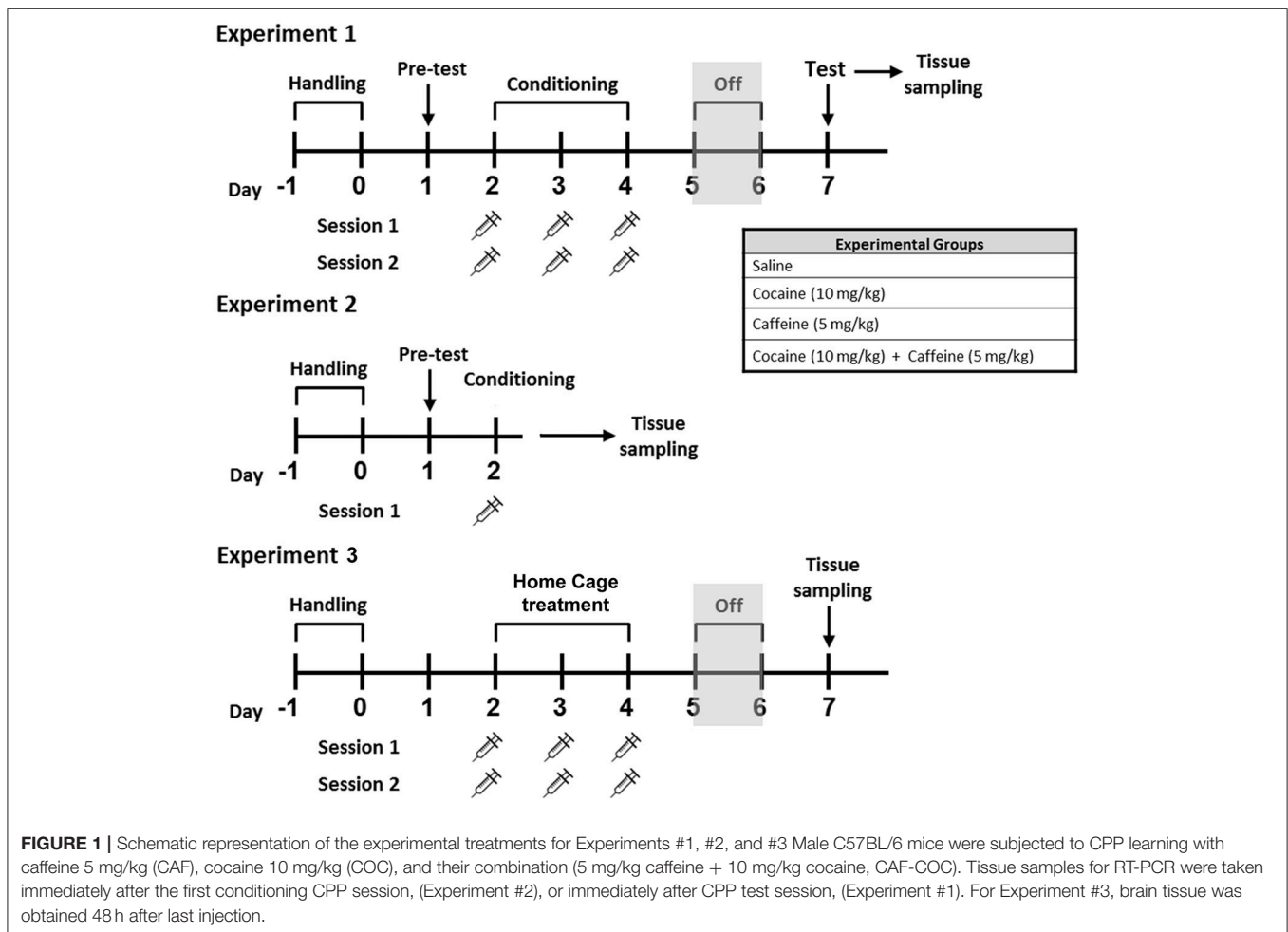
Pharmacological and Physiological Procedures

Cocaine hydrochloride and caffeine were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Animals were assigned to four different groups: COC (Cocaine-only, 10 mg/kg), CAF (Caffeine-only, 5 mg/kg), CAF-COC (Combined, 10 mg/kg + Caffeine 5 mg/kg), both dissolved in sterile saline and co-administered in a single injection) or Control (sterile saline), see **Figure 1**.

Brain tissue, mPFC and NAc, were obtained immediately after CPP test ended (Experiment #1), or just after first conditioning session of the CPP test (Experiment #2). For Experiment #3, animals were injected with the same number of injections (saline and/or drug) used for CPP experiments but injections were made inside their home cage, and animals were sacrificed 48 h after last injection (following the same time schedule used for CPP, see **Figure 1**).

Behavioral Analysis Conditioned Place Preference

A detailed plan of the training schedule is shown in **Figure 1**. CPP test was done in a custom-made plastic apparatus consisting



of two equal size chambers ($25 \times 20 \times 20$ cm) connected by a smaller center chamber ($25 \times 7.5 \times 18$ cm) (see **Figure 2B**). Between the chambers were guillotine doors that were closed on the conditioning days and opened on the pretest and testing days. Both conditioning compartments had different visual, tactile and olfactory cues following a procedure previously described by Aguilar-Valles et al. (2014). First, animals were handled twice a day for 2 days before pretest trial. On the pretest session, animals were placed in the center chamber and allowed to explore freely for 15 min in order to establish the baseline preferences. Preference bias for any of the two conditioning compartments was declared based on the time spent in each compartment during the pretest session. Drug injections were paired with the initially non-preferred side (CS+ chamber), and saline was given in the preferred side (CS- chamber). On the following day, CPP conditioning started consisting in three consecutive training days with two daily training sessions (30 min). Injections were given just prior to placing the animal in the CS+ chamber and saline prior to the CS- chamber (chambers and time of day were counterbalanced between and within groups). Control animals received saline in both CS+ and CS- compartments. Forty-eight hours after the final training session, testing (15 min) consisted of

giving mice free access to the apparatus in a drug-free state. CPP score was expressed as the time spent in the CS+ minus CS- compartments.

Experiment #2 was aimed to investigate changes during the initial encoding of the drug-context association. In this experiment, animals were exposed to the pretest session and then 24 h later received one CS+ pairing session in the morning. Brain tissue was collected immediately after the end of the first exposure to CS+.

Time spent in each chamber was recorded and analyzed using EthoVision XT 7.0 (Noldus) and confirmed by experimenter observation. Locomotor activity (total distance in cm) was recorded for all sessions while animals were inside CPP compartments.

Real Time PCR

Brain tissues were extracted after CPP test (Experiment #1), after CPP first conditioning (Experiment #2), or 48 h after last injection in the home cage (Experiment #3). Mouse brains were rapidly removed. mPFC and NAc were dissected, placed on dry ice, and then stored at -70°C in RNAlater (Qiagen) until further assays. Total RNA was isolated using

TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Five hundred nanograms of RNA were treated with DNaseI (Invitrogen) and reverse-transcribed in a 20 μL reaction using M-MLV reverse transcriptase (Promega) and random hexamer (Biodynamics). For quantitative real-time PCR primers sets were designed for the specific amplification of murine *Drd1a*, *Drd2*, *Adora1*, *Adora2a*, *cFos*, *FosB*, *cJun*, *Egr1*, *Npas4*, and *Actb* as a housekeeping control gene (sequences listed in **Table 1**). Each sample was assayed in duplicate using 4 pmol of each primer, 1X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), and 2–20 ng of cDNA in a total volume of 13 μL. Amplification was carried out in an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Statistical Analysis

Several statistical analyses were performed with ANOVAs in order to detect and better characterize possible differences between the experimental conditions. Before performing ANOVAs, data sets of each of the different experimental variables were inspected for homogeneity of variances and normal distribution among the four experimental groups. Transformation of data was applied to bring data to normal distribution when required. Kruskal Wallis ANOVA on Ranks was performed when data did not comply with the assumptions of parametric tests. When one-way ANOVA was performed, Tukey was used as the post-hoc test (<http://www.infostat.com.ar/>). Infostat software by default applies Tukey-Kramer test for unbalanced designs when needed. Data are expressed as

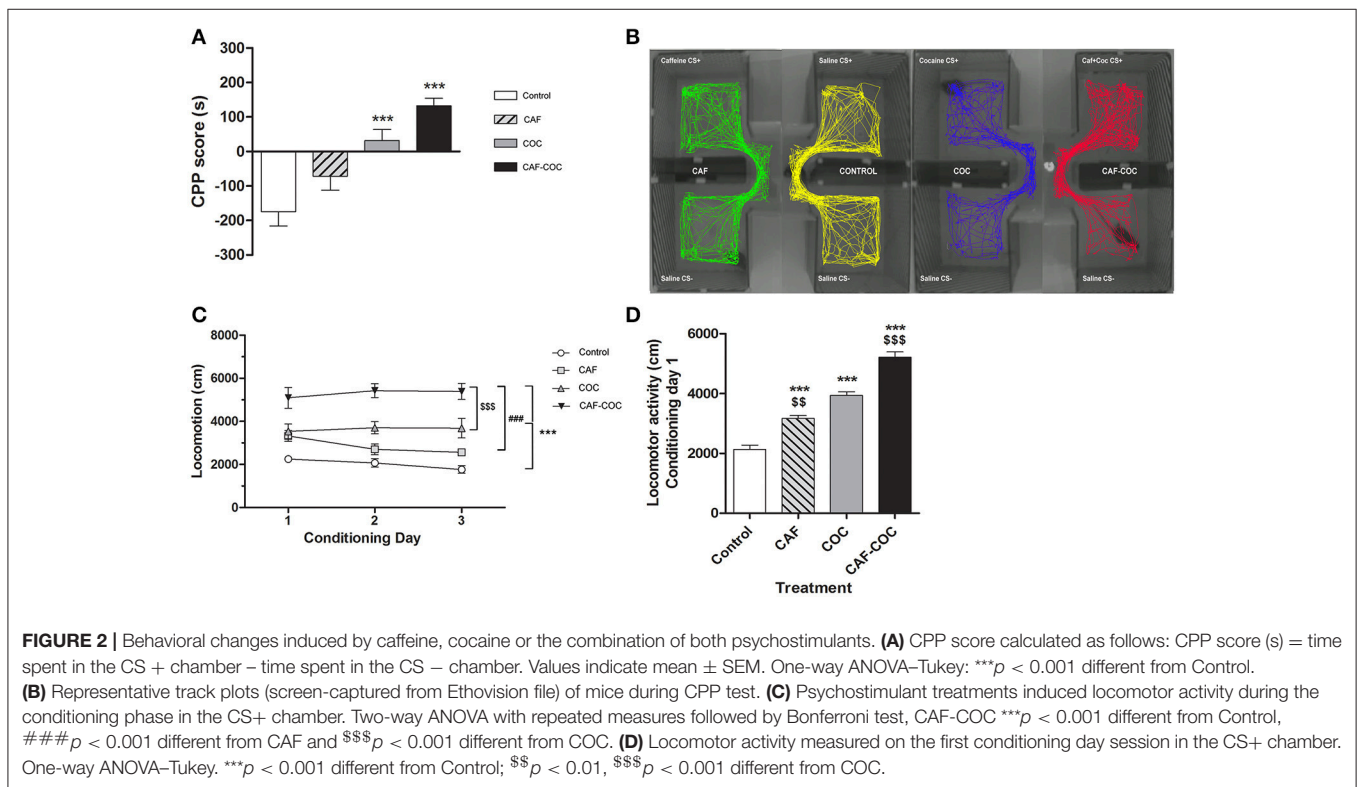


TABLE 1 | Primer sequences.

Gene	Ac. Number	Primer forward	Primer reverse
<i>Drd1a</i>	NM_010076	TTCTTCCTGGTATGGCTTGG	GCTTAGCCCTCACGTTCTTG
<i>Drd2</i>	NM_010077	TATGCCCTGGTGCCTATC	AGGACAGGACCCAGACAATG
<i>Adora1</i>	NM_001039510	TAGACAGTTCAGGTGGCCAG	AGTACATTTCCGGGCACAGA
<i>Adora2a</i>	NM_009630	CGCAGAGTTCATCTTCAGC	ACGTCTCAAACAGACAGGT
<i>cFos</i>	NM_010234	TCCCCAACTTCGACCATGA	AGTTGGCACTAGAGACGGAC
<i>FosB</i>	NM_008036	ACAGATCGACTTCAG GCGGA	GTTTGTGGCCACCAGGAC
<i>cJun</i>	NM_010591	CATAGCCAGAACAGCTTCC	TTGAAGTTGCTGAGGTTGGC
<i>Egr1</i>	NM_007913	GATGGTGGAGACGAGTTAT	GATTGGTCATGCTCACG
<i>Npas4</i>	NM_153553	CATCTGGGCCACTCTATGGT	AGGGGTCTCTCTCTCCAGT
<i>Actb</i>	NM_007393	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGTCTCAAA

the mean \pm SEM. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

For statistical analysis of locomotor activity of Experiment #1, two-way ANOVA with repeated measures (treatment and day effects) followed by Bonferroni test was applied using the software IBM SPSS Statistics V20.0.0. Bonferroni correction allows controlling α error by adjusting the level of significance of each individual contrast according to the number of comparisons.

RESULTS

Experiment #1: Cocaine and Caffeine-Induced Behavioral and Molecular Effects following the CPP Test

1a. CPP

All animals established a preference for one of the two conditioning compartments of the CPP box at the pretest day, i.e., before place conditioning was initiated. Animals assigned to the drug group were conditioned with drugs to the non-preferred compartment (CS+ chamber). As shown in **Figure 2A**, mice in the COC group developed a positive CPP for the cocaine associated compartment at the CPP test day [$F_{(3, 38)} = 14.48$, $p < 0.001$, $N = 9-11$, Tukey: $p < 0.001$ different from Control]. CAF-COC also induced a positive CPP demonstrated by a marked preference for the initially non-preferred side following association with drug administration (Tukey: $p < 0.001$ different from Control). For caffeine treated mice, no statistical differences were found compared to the Control group (Tukey: $p > 0.05$). **Figure 2B** shows representative track plots (screen-captured from EthoVision file) of mice during CPP test. Previous work has indicated that when combined, low-doses of cocaine and caffeine enhance approach behavior to cues paired with their administration in rats, suggesting that reinforcement induced by these drugs may be additive (Bedingfield et al., 1998). Our results also show a tendency of caffeine to increase CPP score values (compared with cocaine values) but the doses tested in this study did not show a clear additive effect (**Figure 2A**).

In addition, locomotor activity was measured during the conditioning phase in the CS+ chamber (**Figure 2C**). Two-way ANOVA with repeated measures showed significant main treatment effect [$F_{(3, 40)} = 29.18$, $p < 0.001$, Bonferroni test for multiple comparisons: CAF-COC $p < 0.001$ different from Control; $p < 0.001$ different from CAF; $p < 0.001$ different from COC; COC $p < 0.001$ different from Control]. However, no significant effect of day [$F_{(2, 80)} = 0.86$, $p > 0.05$, $N = 10-12$], or day by treatment interaction [$F_{(6, 80)} = 1.62$, $p > 0.05$] were observed. As depicted in **Figure 2D**, mice receiving the combination of CAF-COC on day one of conditioning were significantly more active than animals administered with any other treatment.

1.b. Gene Expression Changes Induced by Caffeine and Cocaine-Associated Memory Retrieval in the CPP Test

Tissue samples from the mPFC and NAc were obtained for gene expression analysis immediately following CPP testing, as shown

in **Figure 1**. We measured mRNA expression of Dopamine and Adenosine receptor subunits and IEGs that are sensitive to drug exposure and associated with neuronal activation, plasticity and memory.

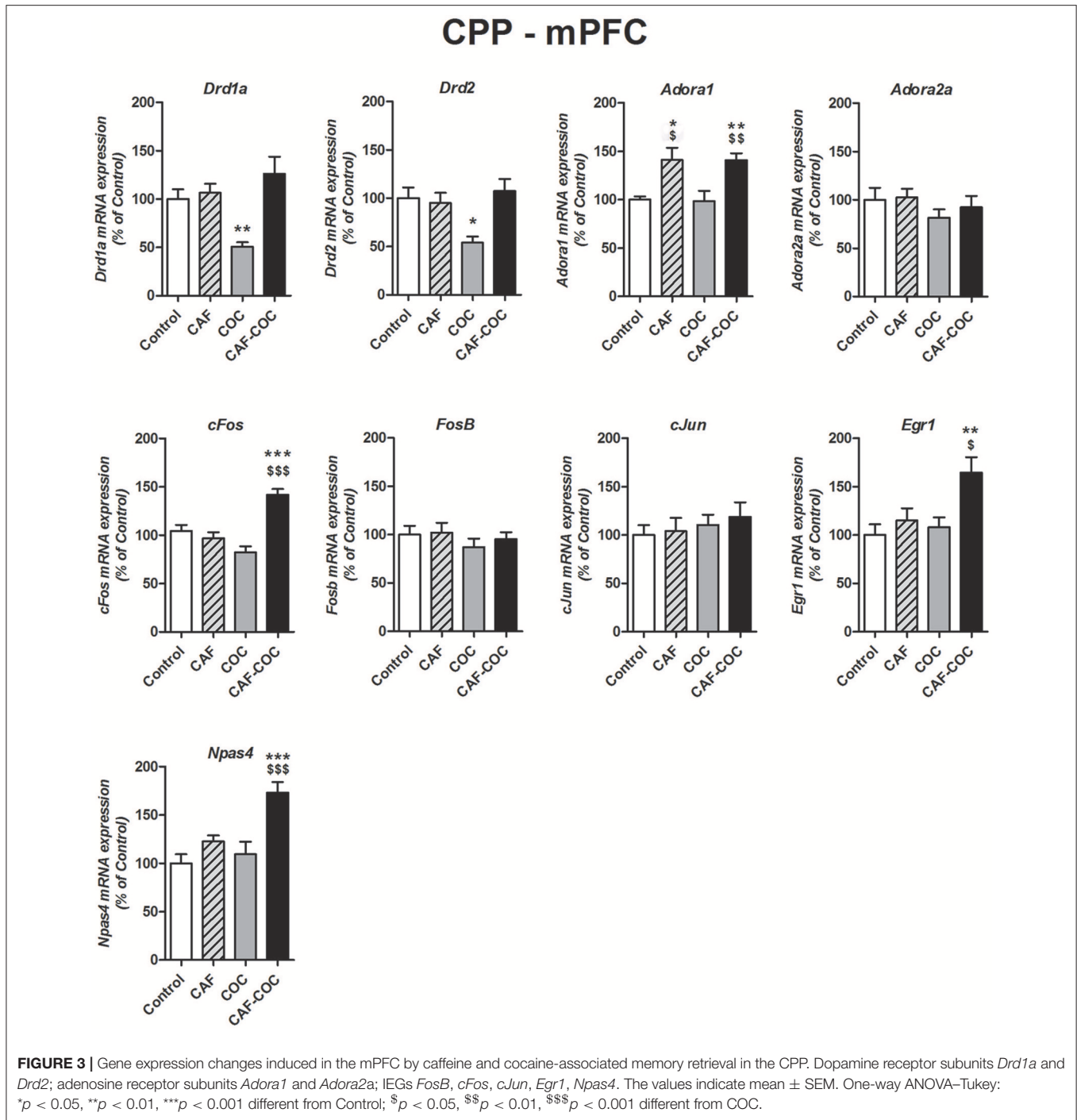
mPFC

Figure 3 shows gene expression effects following CPP with caffeine, cocaine, and their combination on Dopamine and Adenosine receptor subunit and IEGs mRNA expression in the mPFC. One-way ANOVA-Tukey indicated that cocaine given alone decreased Dopamine receptor subunits, *Drd1a* [$F_{(3, 19)} = 7.88$, $p < 0.01$, $N = 5$, Tukey: $p < 0.01$ different from Control] and *Drd2* [$F_{(3, 21)} = 5.73$, $p < 0.01$, $N = 5-6$, Tukey: $p < 0.05$ different from Control], in the mPFC. For the Adenosine receptor subunits, both groups that were trained in the CPP with caffeine had increased expression of *Adora1* [$F_{(3, 21)} = 6.97$, $p < 0.01$, $N = 5-6$, Tukey: CAF $p < 0.05$, CAF-COC $p < 0.01$ different from Control; CAF $p < 0.05$, CAF-COC $p < 0.01$ different from COC], whereas there were no changes in *Adora2a* gene expression [$F_{(3, 22)} = 0.82$, $p > 0.05$, $N = 5-6$]. Interestingly, three out of five IEGs including *cFos*, *Egr1*, and *Npas4* showed significant increases solely in the group that was trained with the combination of both psychostimulants [*cFos* [$F_{(3, 22)} = 18.41$, $p < 0.001$, $N = 5-6$, Tukey: $p < 0.001$ different from Control; $p < 0.001$ different from COC]; *Egr1* [$F_{(3, 23)} = 5.27$, $p < 0.01$, $N = 6$, Tukey: $p < 0.01$ different from Control; $p < 0.05$ different from COC]; *Npas4* [$F_{(3, 23)} = 10.57$, $p < 0.001$, $N = 6$, Tukey: $p < 0.001$ different from Control; $p < 0.001$ different from COC]]. No significant differences were found for *cJun* [$F_{(3, 22)} = 0.42$, $p > 0.05$, $N = 5-6$] and *FosB* [$F_{(3, 22)} = 0.64$, $p > 0.05$, $N = 5-6$] expression in the mPFC.

NAc

Figure 4 shows gene expression effects following CPP with caffeine, cocaine, and their combination on Dopamine and Adenosine receptor subunit and IEGs mRNA expression in the NAc. Caffeine or cocaine given alone did not modify Dopamine receptor subunits *Drd1a* but the combination of both drugs (CAF-COC) induced an increase in *Drd1a* expression [$F_{(3, 19)} = 3.31$, $p < 0.05$, $N = 4-5$, Tukey: $p < 0.05$ different from Control]. For *Drd2*, both COC and CAF-COC groups induced an increase in *Drd2* [Kruskal-Wallis $H = 11.68$, $p < 0.01$, $N = 4-5$, paired comparisons: $p < 0.05$ different from Control] suggesting a cocaine-mediated effect. We did not find any significant effects for Adenosine receptor subunits *Adora1* [$F_{(3, 20)} = 0.87$, $p > 0.05$, $N = 5-6$] and *Adora2a* [$F_{(3, 19)} = 0.22$, $p > 0.05$, $N = 4-6$] for any experimental group in the NAc.

FosB and *cFos* only increased in the group that received the combination of both psychostimulants [*FosB* [$F_{(3, 20)} = 5.272$, $p < 0.05$, $N = 5-6$, Tukey: $p < 0.05$ different from Control; $p < 0.05$, different from COC. *cFos* [$F_{(3, 20)} = 18.41$, $p < 0.01$, $N = 5-6$, Tukey: $p < 0.05$ different from Control]. Also, both COC and CAF-COC groups showed increased *Egr1* [$F_{(3, 19)} = 5.27$, $p < 0.01$, $N = 4-6$, Tukey: $p < 0.01$ different from Control]. CAF-COC treatment did not produce significant changes in *Npas4* and *cJun* expression [*Npas4* [$F_{(3, 20)} = 1.17$, $p > 0.05$, $N = 5-6$]; *cJun* [$F_{(3, 21)} = 0.45$, $p > 0.05$, $N = 5-6$].



Experiment #2: Cocaine and Caffeine-Induced Behavioral and Molecular Effects following a Single Conditioning Session of the CPP Test

2a. Single Conditioning Session of the CPP Test

Mice were handled for habituation, exposed to CPP pre-test and then exposed to CPP first conditioning session 24 h later, see **Figure 1**. We measured mRNA levels of the same

genes previously described in the mPFC and NAc but in this experiment brain tissues were obtained immediately after first CPP conditioning session. The main goal of this new experiment was to compare gene expression profile from a single exposure to the context with the drug or saline to the one observed following a full CPP test.

Treatments with both psychostimulants induced locomotor activity on the first conditioning session in the CS+ chamber, see

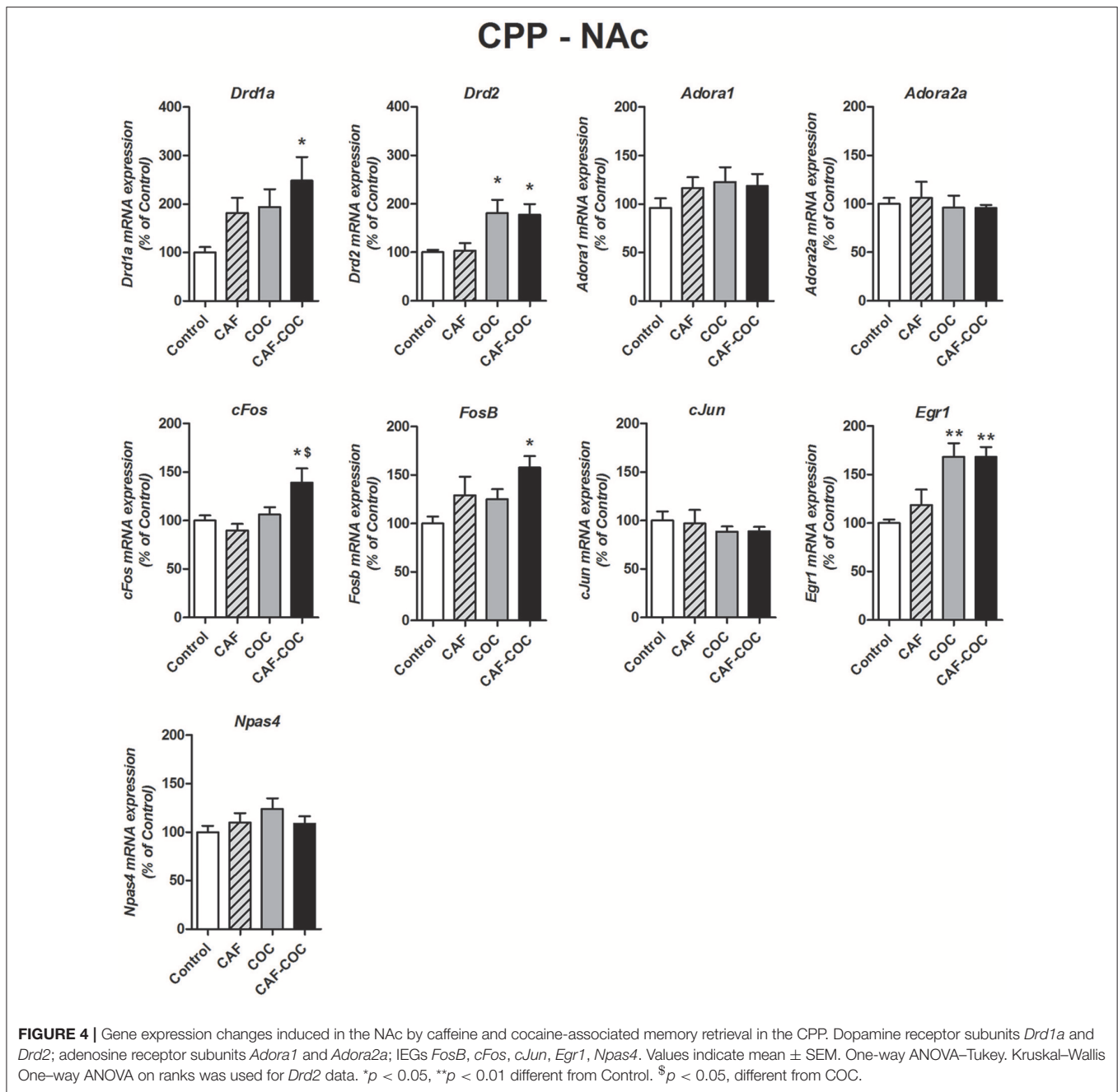


Figure 2D. One-way ANOVA–Tukey [$F_{(3, 26)} = 87.20, p < 0.001, N = 6–7$] indicated that all groups showed increased locomotion compared to Control ($p < 0.001$ different from Control). Also, CAF and CAF-COC groups were different from COC group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively).

2b. Gene Expression Changes following a Single Conditioning Session of the CPP Test mPFC

Figure 5 shows gene expression changes following a single CPP encoding session with caffeine, cocaine, and their combination

on Dopamine and Adenosine receptor subunits and IEGs mRNA expression in the mPFC. One-way ANOVA–Tukey indicated that groups that received caffeine, given alone or in combination with cocaine, showed significant increase in Dopamine receptor subunits *Drd1a* and *Drd2* in mPFC [*Drd1a* $F_{(3, 21)} = 8.43, p < 0.01, N = 5–6$, Tukey: CAF $p < 0.05$, CAF-COC $p < 0.01$ different from Control; CAF $p < 0.01$ different from COC; *Drd2* $F_{(3, 21)} = 23.09, p < 0.001, N = 5–6$, Tukey: CAF and CAF-COC $p < 0.001$ different from Control; $p < 0.001$ different from COC]. For *Adora1* we found increased expression in the CAF group [$F_{(3, 21)} = 6.75, p < 0.01, N = 5–6$ Tukey:

Single conditioning session - mPFC

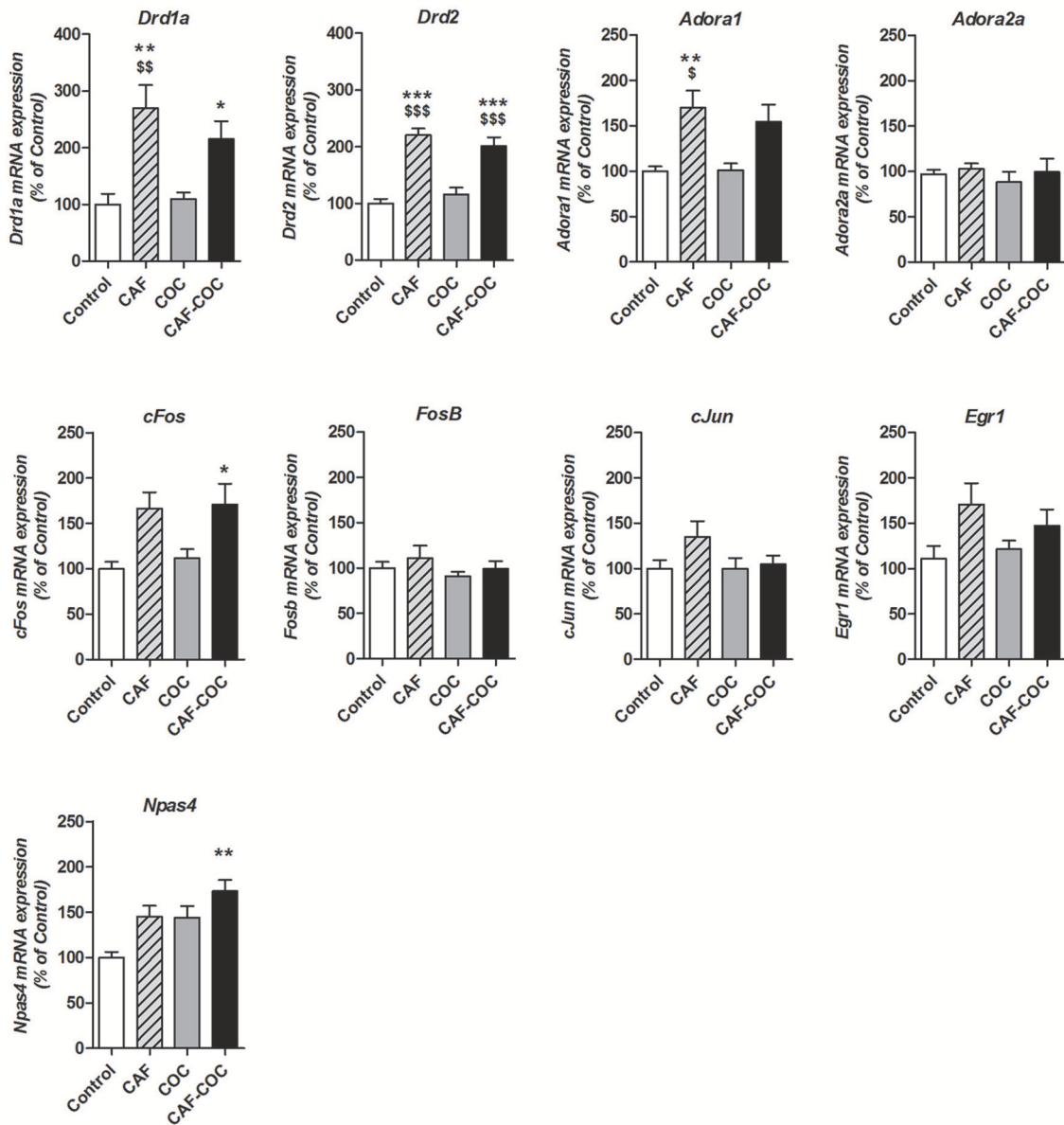


FIGURE 5 | Gene expression changes in the mPFC following a single conditioning session of the CPP. Dopamine receptor subunits *Drd1a* and *Drd2*; adenosine receptor subunits *Adora1* and *Adora2a*; IEGs *FosB*, *cFos*, *cJun*, *Egr1*, *Npas4*. Values indicate mean ± SEM. One-way ANOVA-Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ different from Control; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ different from COC.

$p < 0.01$ different from Control; $p < 0.05$ different from COC]. No changes were observed in *Adora2a* gene expression in any groups [$F_{(3, 22)} = 0.35$, $p > 0.05$, $N = 5-6$]. Concerning IEGs expression, for *cFos* and *Npas4* we observed the same trend that the one observed following full CPP, meaning that only groups that received the combination of CAF-COC showed increased expression [*cFos* $F_{(3, 20)} = 4.73$, $p < 0.05$, $N = 5-6$, Tukey: $p < 0.05$ different from Control; *Npas4* $F_{(3, 22)} = 6.46$, $p < 0.01$,

$N = 5-6$, Tukey: $p < 0.01$ different from Control]. No significant differences were found for *cJun*, *Egr1* or *FosB* expression in the mPFC [*cJun* $F_{(3, 23)} = 1.82$, $p > 0.05$, $N = 6$; *Egr1* $F_{(3, 23)} = 2.55$, $p > 0.05$, $N = 6$; *FosB* $F_{(3, 23)} = 0.77$, $p > 0.05$, $N = 6$].

NAc

Figure 6 shows gene expression changes following a single CPP encoding session with caffeine, cocaine, and their combination

Single conditioning session - NAc

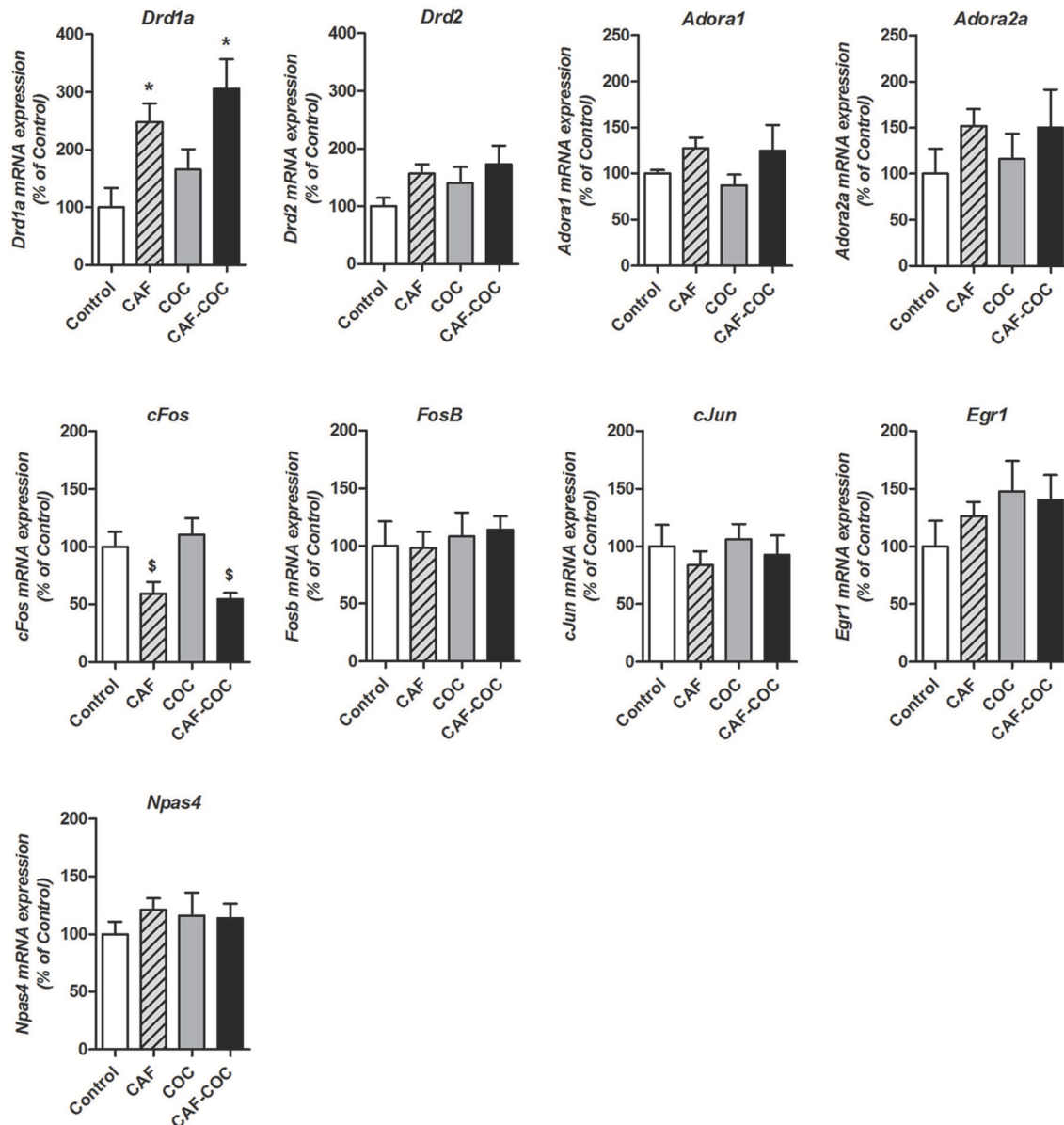


FIGURE 6 | Gene expression changes in the NAc following a single conditioning session of the CPP. Dopamine receptor subunits *Drd1a* and *Drd2*; adenosine receptor subunits *Adora1* and *Adora2a*; IEGs *FosB*, *cFos*, *cJun*, *Egr1*, *Npas4*. Values indicate mean \pm SEM. One-way ANOVA–Tukey: * $p < 0.05$ different from Control, \$ $p < 0.05$ different from COC.

on Dopamine and Adenosine receptor subunits and IEGs mRNA expression in the NAc. Overall, we found fewer gene expression changes (compared to the profile obtained after CPP test). The only genes that showed changes were *Drd1a* and *cFos*. For *Drd1a*, we found that caffeine induced increases in *Drd1a*, given alone or in combination [$F_{(3, 20)} = 5.68, p < 0.01, N = 4-6$, Tukey: CAF and CAF-COC $p < 0.05$ different from Control]. For *cFos*, we also observed a caffeine-mediated effect

but in this case, caffeine-treated groups showed a decrease in its expression compared to COC group [$F_{(3, 19)} = 5.87, p < 0.01, N = 4-6$, Tukey: $p < 0.05$ different from COC]. We did not observe any other significant change on other genes: *Adora1* [$F_{(3, 19)} = 1.43, p > 0.05, N = 4-5$]; *Adora2a* [$F_{(3, 20)} = 0.65, p > 0.05, N = 4-6$]; *Drd2* [$F_{(3, 18)} = 1.11, p > 0.05, N = 4-5$]; *FosB* [$F_{(3, 21)} = 0.17, p > 0.05, N = 5-6$]; *cJun* [$F_{(3, 20)} = 0.46, p > 0.05, N = 4-6$]; *Egr1* [$F_{(3, 21)} =$

0.93, $p > 0.05$, $N = 5-6$; *Npas4* [$F_{(3, 21)} = 0.37$, $p > 0.05$, $N = 5-6$].

[$F_{(3, 22)} = 2.23$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *Egr1* [$F_{(3, 23)} = 0.06$, $p > 0.05$, $N = 6$] and *Npas4* [$F_{(3, 21)} = 0.45$, $p > 0.05$, $N = 5-6$].

Gene expression data for all experimental conditions are summarized in **Table 2**.

Experiment #3: Gene Expression Changes Induced by Caffeine and Cocaine Repeated Treatment in the Home Cage

In Experiment #3, mice received the same handling and the same doses and number of injections (one injection with saline plus one injection with drug or saline per day, for 3 consecutive days) as the groups that were trained and tested in the CPP (Experiment #1) but injections were given in the home cage, see **Figure 1**. Following the CPP protocol, animals were left undisturbed in their home cage for 2 days. Animals were sacrificed 24 h later (in a drug free state) and brain tissue collected for gene expression analysis. The objective of the Experiment #3 was to investigate whether changes observed following the CPP test (i.e., in Experiment #1) were dependent on context or linked to drug administration (i.e., a consequence of repeated drug injection).

mPFC

Figure 7 shows changes in gene expression following a 3-day repeated treatment given in the home cage with caffeine, cocaine, and their combination in the mPFC. We measured Dopamine and Adenosine receptor subunits and IEGs mRNA expression from brain tissues obtained 48 h after the last injection, in a drug-free state. We have found decreased *Drd2* expression for all treatments [$F_{(3, 21)} = 6.64$, $p < 0.01$, $N = 5-6$, Tukey: $p < 0.05$ and $p < 0.01$ different from Control] and decreased *Adora2a* expression in cocaine treated groups [$F_{(3, 22)} = 4.62$, $p < 0.05$, $N = 5-6$, Tukey: $p < 0.05$ different from Control]. Also, the group injected with the combination of CAF-COC showed a significant decrease in *cJun* mRNA in the mPFC [$F_{(3, 23)} = 3.28$, $p < 0.05$, $N = 6$, Tukey: $p < 0.05$ different from Control]. No other significant changes were observed for *Adora1* [$F_{(3, 22)} = 1.17$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *Drd1a* [$F_{(3, 22)} = 0.60$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *FosB* [$F_{(3, 21)} = 2.10$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *cFos* [$F_{(3, 21)} = 0.22$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *Egr1* [$F_{(3, 20)} = 0.29$, $p > 0.05$, $N = 5-6$] and *Npas4* [$F_{(3, 21)} = 0.48$, $p > 0.05$, $N = 5-6$].

NAc

Figure 8 shows gene expression changes following repeated treatment given in the home cage with caffeine, cocaine, and their combination, in the NAc. We measured Dopamine and Adenosine receptor subunits and IEGs mRNA expression from brain tissues obtained 48 h after the last injection, in a drug-free state. Overall, in Experiment #3 few changes were found on gene expression. No changes were found in many of the gene expression tested except for *FosB*. One-way ANOVA–Tukey indicated that the only gene demonstrating significant changes was *FosB*, a significant decrease was found [$F_{(3, 23)} = 4.42$, $p < 0.05$, $N = 6$ Tukey: $p < 0.05$ different from Control]. No other significant changes were observed for *Adora1* [$F_{(3, 23)} = 0.21$, $p > 0.05$, $N = 6$], *Adora2a* [$F_{(3, 20)} = 0.78$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *Drd1a* [$F_{(3, 19)} = 0.55$, $p > 0.05$, $N = 5$]; *Drd2* [$F_{(3, 20)} = 0.79$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *cFos* [$F_{(3, 22)} = 1.01$, $p > 0.05$, $N = 5-6$], *cJun*

DISCUSSION

We report three main findings of the present study. (1) Combined administration of caffeine and cocaine induced a marked change of preference to the drug conditioned side of the CPP and a significant increase in locomotion. (2) Molecular changes observed at the time of CPP memory retrieval revealed specific effects on IEGs mRNA that were present almost exclusively in mice that received the combination of both psychostimulants. (3) Neuroadaptations mediated by both psychostimulants implicated different changes in mPFC or NAc, and were dependent on context (CPP or home-cage administration). These findings are of interest as neuroimaging studies involving human subjects have associated functional changes in the mPFC (Volkow et al., 2005) and NAc (Risinger et al., 2005) with cocaine craving.

Psychostimulants are drugs that can act as cognitive enhancers and potentiate learning and memory (Bisagno et al., 2016). Positive effects of caffeine are well known and include enhanced wakefulness, increased concentration, and stimulated activity (Daly and Fredholm, 1998). It is also known that the drug administration environment is critical in determining which neuronal ensembles are activated during cocaine treatment (Mattson et al., 2008). Moreover, formation and storage of memory representations rely on activity-driven changes in synaptic plasticity of neural networks mediated by IEGs (Veyrac et al., 2014). We found distinct changes in a subset of IEGs (*cFos*, *FosB*, *cJun*, *Egr1*, and *Npas4*) induced by caffeine and cocaine administration in the mouse brain that may underlie neuroplasticity in the NAc and mPFC circuits. The potential implications for these differential changes in gene expression are discussed below.

NAc

The NAc modulates the brain's natural reward system through changes in accumbal Dopamine released in response to rewarding stimuli that include motivation and incentivized learning (Cadet and Bisagno, 2016). CPP test trial responses depend on whether the animal remembers and/or retrieves the respective associations established during the drug-pairing sessions. In the present study we report that, while both groups that received cocaine showed positive CPP scores, only the group that received the combination of both psychostimulants during CPP training showed increased *cFos* and *FosB* mRNA in the NAc. These changes appear to be context-induced since they did not occur in the groups treated with the same drug doses and schedule but in their home cage. In fact, we only found reduced *FosB* mRNA levels in the NAc of animals that received home cage treatment.

Drug-induced Dopamine can synergistically enhance *cFos* promoter activation in striatal neurons and those Fos-expressing neurons may act as a unit to form neuronal ensembles that

Home cage treatment - mPFC

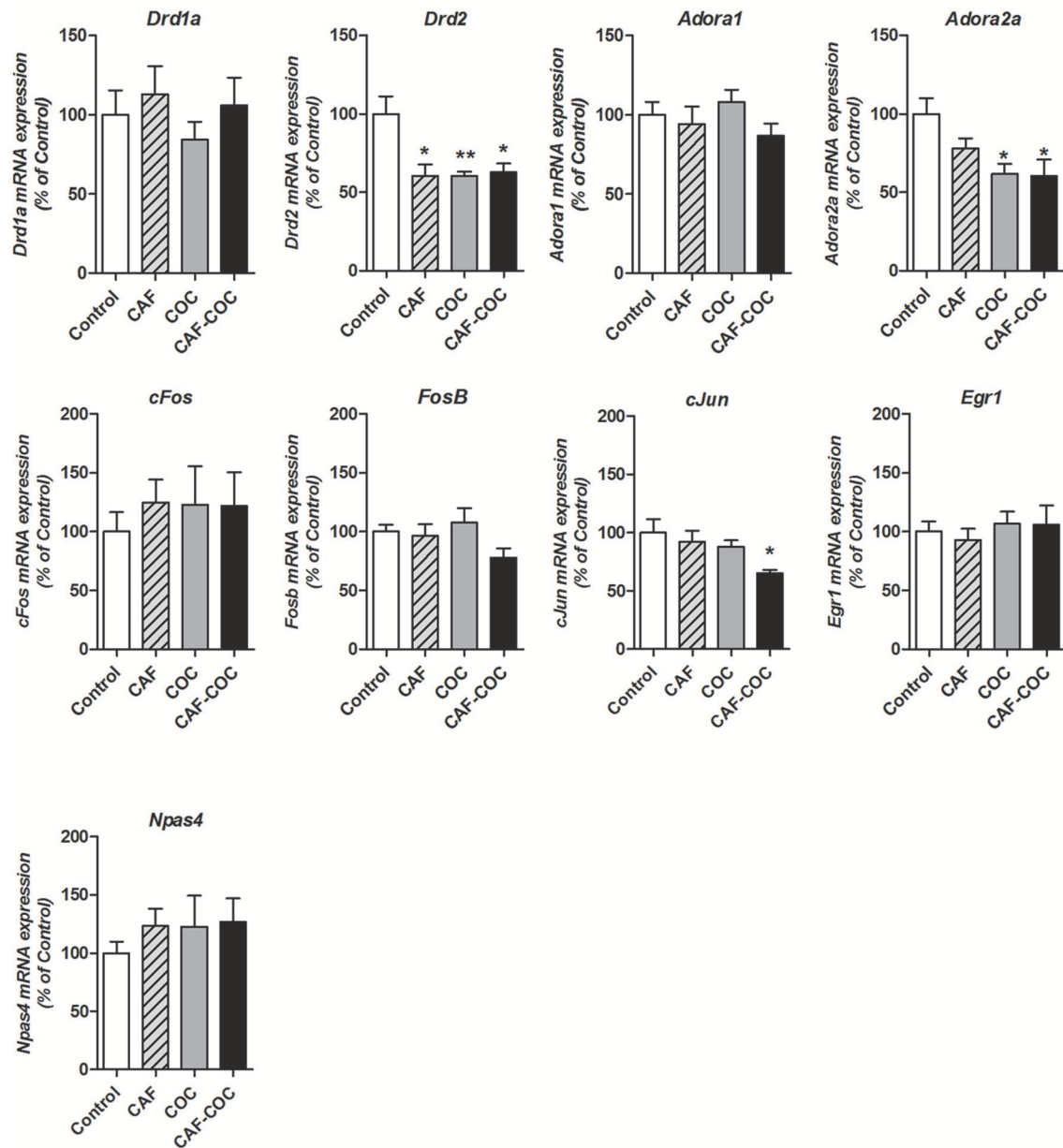


FIGURE 7 | Gene expression changes in the mPFC induced by caffeine and cocaine repeated treatment in the home cage. Dopamine receptor subunits *Drd1a* and *Drd2*; adenosine receptor subunits *Adora1* and *Adora2a*; IEGs *FosB*, *cFos*, *cJun*, *Egr1*, *Npas4*. Values indicate mean \pm SEM. One-way ANOVA–Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ different from Control.

encode conditioned drug behaviors (Cruz et al., 2015). Δ FosB, encoded by the *FosB* gene, is a member of the Fos family of IEGs induced in the NAc by the repeated administration of cocaine (Alibhai et al., 2007). It is important to note that the ability of Δ FosB to accumulate after a single exposure to cocaine is dependent on both the strength and duration of the stimulus (Kelz et al., 1999). This suggests that neuronal activity

must reach a threshold for Δ FosB to accumulate in the NAc. This “all or nothing” theory was suggested for *cFos* since it is likely that only a small proportion of neurons experience enough strong activation so that calcium concentration surpasses the threshold for induction of *cFos* and other IEGs (Cruz et al., 2015). Our results suggest that the association of context with reward was not robust enough in mice receiving only

Home cage treatment - NAc

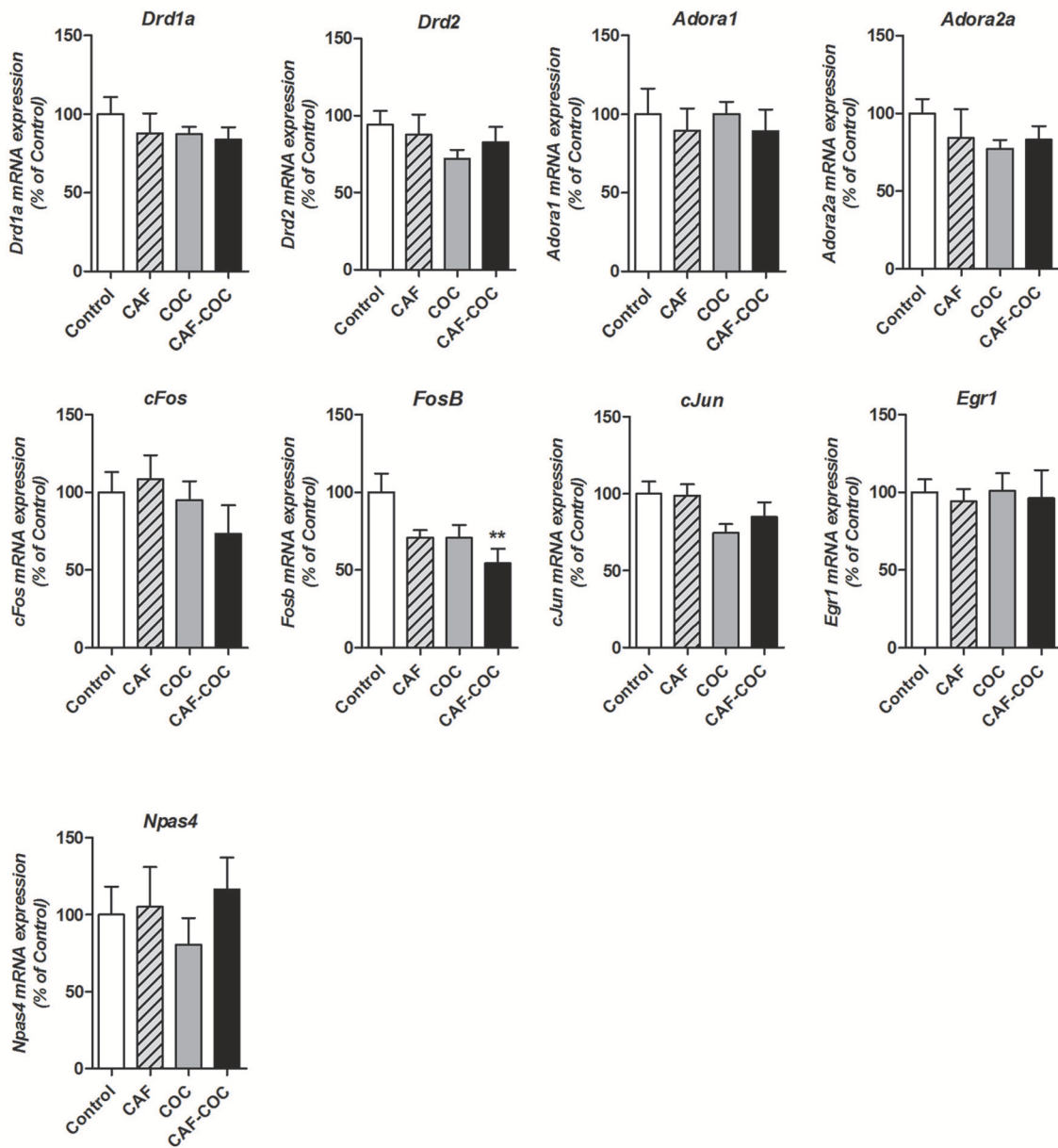


FIGURE 8 | Gene expression changes in the NAc induced by caffeine and cocaine repeated treatment in the home cage. Dopamine receptor subunits *Drd1a* and *Drd2*; adenosine receptor subunits *Adora1* and *Adora2a*; IEGs *FosB*, *cFos*, *cJun*, *Egr1*, *Npas4*. Values indicate mean ± SEM. One-way ANOVA–Tukey: ***p* < 0.01 different from Control.

one psychostimulant (at the doses used in the present study) to increase *cFos* or *FosB*. Accordingly, CPP training with the combination of caffeine plus cocaine is likely to produce a stronger stimulus that is sufficient to induce expression of these IEGs.

Expression of *Egr1* in the NAc was shown to be responsive to CPP training with cocaine (Fritz et al., 2011). Our results are also

in agreement with a recent report by Li et al. (2016) who showed that *Egr1* and *FosB* in the NAc mediate memory of cocaine-place association. Moreover, these authors suggest that both D1 and NMDA receptors regulate these two IEGs during drug memory consolidation (Li et al., 2016). Interestingly, we also found that following CPP, only caffeine plus cocaine treated animals showed increased D1 receptor mRNA in the NAc.

TABLE 2 | Gene expression change for all experimental conditions: FC (first conditioning CPP session), CPP (CPP test session) or HC (injections in home cage).

mPFC	FC			CPP			HC		
	Caf	Coc	Caf-Coc	Caf	Coc	Caf-Coc	Caf	Coc	Caf-Coc
<i>Drd1a</i>	↑	-	↑	-	↓	-	-	-	-
<i>Drd2</i>	↑	-	↑	-	↓	-	↓	↓	↓
<i>Adora1</i>	↑	-	-	↑	↑	-	-	-	-
<i>Adora2a</i>	-	-	↑	-	-	-	-	↓	↓
<i>cFos</i>	-	-	↑	-	-	↑	-	-	-
<i>FosB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cJun</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	↓
<i>Egr1</i>	-	-	-	-	-	↑	-	-	-
<i>Npas4</i>	-	-	↑	-	-	↑	-	-	-
NAC									
<i>Drd1a</i>	↑	-	↑	-	-	↑	-	-	-
<i>Drd2</i>	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-
<i>Adora1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Adora2a</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cFos</i>	↓	-	↓	-	-	↓	-	-	-
<i>FosB</i>	-	-	-	-	-	↑	-	-	↓
<i>cJun</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Egr1</i>	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-
<i>Npas4</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Symbol order: first symbol (↑, increase; ↓, decrease or -, no change) relates to Caffeine (green), second symbol to Cocaine (blue) and third symbol to Caffeine-Cocaine (red) groups.

Regarding caffeine-mediated effects, we found a decrease in *cFos* gene expression in the NAc of animals exposed to the first conditioning session that might be related to a decrease in NAc activation mediated by caffeine. It is important to note that the caffeine dose used in our study (5 mg/kg) is considered to be in the low range and other studies have reported that only high caffeine doses (i.e., 75 mg/kg) increase IEGs expression in the NAc (Bennett and Semba, 1998). In addition, significant increases in Δ FosB expression were observed in the NAc from animals exposed to caffeine mixed with alcohol, but not mice exposed to alcohol or caffeine (15 mg/kg) alone (Robins et al., 2016). These authors suggested that the combination of both drugs, i.e., caffeine and alcohol, increased Dopamine in the NAc to a higher degree than the stimulation produced by caffeine alone thereby increasing Δ FosB expression (Robins et al., 2016). We have also observed changes in the mRNAs for Adenosine and Dopamine receptors that appear to be sensitive to psychostimulants in striatal tissue (Ferré et al., 2010; Volkow et al., 2015; Muñiz et al., 2016).

mPFC

Ample evidence indicates that the mPFC has a significant role in the development and persistence of addictive behavior (Volkow et al., 2012). By integrating input from cortical and subcortical areas and conveying excitatory output to the NAc, the mPFC is thought to exert control over the motor circuitry to regulate drug

responses and drug-associated stimuli (Cadet and Bisagno, 2013). In preclinical models, mPFC is associated with reward, including cocaine-CPP, (Tzschentke and Schmidt, 1999) and salience- and novelty-detection (Dalley et al., 2004).

In the present study, we found that a combination of psychostimulants influenced the outcome of CPP. Molecular results from this study suggest that caffeine might strengthen environment-drug association within the mPFC-NAc network. Indeed, we found a pattern of IEGs mRNA expression similar to the one obtained from NAc tissue, i.e., increased mRNA of *cFos* and *Egr1* in the mPFC in the group that received the combination of both psychostimulants during CPP training. *cFos* levels are reported to be increased in mPFC neurons following exposure to a cocaine-associated environment (Slaker et al., 2015). In addition, cocaine-conditioned stimuli were associated with increased *Egr1* expression in the PFC (El Rawas et al., 2012).

In addition, we observed a cocaine-mediated decrease in *Drd2* mRNA following CPP and after chronic treatment in the home cage (in Experiment #3, all psychostimulants reduced *Drd2* expression in the mPFC). This finding is probably linked to chronic cocaine effects, in agreement with previous studies demonstrating a decrease in D2 receptor function in the mPFC is related to cocaine-induced sensitization (Beyer and Steketee, 2002). However, following acute psychostimulant administration, on the first

conditioning day, we only found caffeine-mediated effects on *Drd1a* and *Drd2*. Both groups receiving caffeine, but not the group receiving cocaine alone, showed increased mRNA of these receptors in the mPFC. The differences in gene expression patterns seen in this study following acute and chronic drug administration suggest that specific neuroadaptations occurred in between those time points.

Among the differentially expressed IEGs seen in the mPFC compared to the NAc is *Npas4*. This IEG is expressed throughout the brain at a low level, though it is enriched in the frontal, parietal, and entorhinal cortices (Maya-Vetencourt et al., 2012; Spiegel et al., 2014). In our study, *Npas4* was only increased in the group that was injected with both psychostimulants during CPP training and following a single pairing CPP session, suggesting increases in mPFC activation.

Specific roles for *Npas4* in cocaine-mediated adaptations were reported by Ye et al. (2016). These authors demonstrated that there are brain-wide projection patterns separating mPFC cells responding to positive and negative experiences and that there was enrichment of *Npas4* expression in mPFC cells responding to cocaine. These authors also demonstrated that cocaine-induced increase of *Npas4* expression in mPFC is very rapid, within 30 min (Ye et al., 2016). It was proposed that *Npas4*, by controlling distinct networks of genes, differentially regulated synaptic input to excitatory and inhibitory neurons in order to facilitate circuit responses to sensory experience (Spiegel et al., 2014). Cognitive impairments are associated with decreased *Npas4* mRNA expression in the mouse frontal cortex (Qiu et al., 2016). Our results showing an association of CPP learning and increases in *Npas4* mRNA levels complement the decreases observed in cognitive decline.

We provide evidence here that caffeine may affect neuroplasticity through IEGs expression in circuits that are activated by drug use and associative learning. Our results also show that IEGs changes are specific to environmental context and that they are brain-region dependent. It is important for us to refocus from using these genes as activity markers, as has been done in the past, to exploring the role of these gene in establishing memory in mPFC cortical and cortical-subcortical circuits. Whilst this study describes specific changes in some early genes previously linked to memory and reward, it is difficult to establish the specific contribution of each of these genes to learning and memory since they

may reflect general plasticity changes within the mPFC/NAc circuit.

Finally, it has been suggested that prevention of relapse might be achieved by using treatments that diminish the impact of drug-associated stimuli on drug seeking. Addiction is a brain disease and a learning disorder suggesting that drug-induced alterations can be undone or counteracted by a different learning strategy (Hyman et al., 2006). Interestingly, it has been reported that social interaction can prevent cocaine CPP (Prast et al., 2014).

This study also highlights the importance of considering caffeine effects as a potent adulterant in cocaine seized samples. Prieto et al. (2016) previously suggested that caffeine can act as a priming element for cocaine-related reward circuitry and as an effective discriminative stimulus for maintaining drug-seeking behavior in animals. In addition, caffeine intake is positively correlated with substance-use disorders (Kendler et al., 2006) and has been shown to increase illicit drug use (Miller, 2008). Thus, it seems reasonable to examine caffeine daily intake in psychostimulant-addicted patients undergoing treatment.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VB, FU, CS, and BG were responsible for the study design. JM, JP, MS, and BG performed the experiments and analyzed data. VB, FU, BG, JLC, and CS provided critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors have critically reviewed content and approved final version submitted for publication.

FUNDING

This study was supported by grants from ANPCyT, Préstamo BID-PICT 2012-0924, Préstamo BID-PICT 2014-2499, Préstamo BID-PICT 2015-2594 and Préstamo BID-PICT 2016-1728, Argentina.

ACKNOWLEDGMENTS

VB has been authorized to study drug abuse substances in animal models by A.N.M.A.T. (National Board of Medicine Food and Medical Technology, Ministerio de Salud, Argentina). We are also grateful to IBRO for the PROLAB grant that funded collaborative activities between CS's laboratory at IIBCE, Uruguay and VB's laboratory at ININFA, Argentina.

REFERENCES

- Aguilar-Valles, A., Vaissière, T., Griggs, E. M., Mikaelsson, M. A., Takács, I. F., Young, E. J., et al. (2014). Methamphetamine-associated memory is regulated by a writer and an eraser of permissive histone methylation. *Biol. Psychiatry* 76, 7–65. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.09.014
- Alibhai, I. N., Green, T. A., Potashkin, J. A., and Nestler, E. J. (2007). Regulation of fosB and DeltafosB mRNA expression: *in vivo* and *in vitro* studies. *Brain Res.* 1143, 22–33. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.069
- Bedingfield, J. B., King, D. A., and Holloway, F. A. (1998). Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61, 291–296. doi: 10.1016/S0091-3057(98)00092-6
- Bennett, H. J., and Semba, K. (1998). Immunohistochemical localization of caffeine-induced c-Fos protein expression in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 401, 89–108. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981109)401:1<89::AID-CNE6>3.0.CO;2-X
- Beyer, C. E., and Steketee, J. D. (2002). Cocaine sensitization: modulation by dopamine D2 receptors. *Cereb. Cortex* 12, 526–535. doi: 10.1093/cercor/12.5.526

- Bisagno, V., González, B., and Urbano, F. J. (2016). Cognitive enhancers versus addictive psychostimulants: the good and bad side of dopamine on prefrontal cortical circuits. *Pharmacol. Res.* 109, 108–118. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.013
- Cadet, J. L., and Bisagno, V. (2013). The primacy of cognition in the manifestations of substance use disorders. *Front. Neurol.* 4:189. doi: 10.3389/fneur.2013.00189
- Cadet, J. L., and Bisagno, V. (2016). Neuropsychological consequences of chronic drug use: relevance to treatment approaches. *Front. Psychiatry* 6:189. doi: 10.3389/fpsyt.2015.00189
- Childs, E. (2014). Influence of energy drink ingredients on mood and cognitive performance. *Nutr. Rev.* 72, 48–59. doi: 10.1111/nure.12148
- Cole, C., Jones, L., McVeigh, J., Kicman, A., Syed, Q., and Bellis, M. (2011). Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Test. Anal.* 3, 89–96. doi: 10.1002/dta.220
- Cruz, F. C., Javier Rubio, F., and Hope, B. T. (2015). Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain Res.* 1628, 157–173. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.005
- Cruz, F. C., Koya, E., Guez-Barber, D. H., Bossert, J. M., Lupica, C. R., Shaham, Y., et al. (2013). New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 743–754. doi: 10.1038/nrn3597
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., and Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 771–784. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.09.006
- Daly, J. W., and Fredholm, B. B. (1998). Caffeine—an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend.* 51, 199–206. doi: 10.1016/S0376-8716(98)00077-5
- El Rawas, R., Klement, S., Kummer, K. K., Fritz, M., Dechant, G., Saria, A., et al. (2012). Brain regions associated with the acquisition of conditioned place preference for cocaine vs. social interaction. *Front. Behav. Neurosci.* 6:63. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00063
- Ferré, S., Lluís, C., Justinova, Z., Quiroz, C., Orru, M., Navarro, G., et al. (2010). Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *Br. J. Pharmacol.* 160, 443–453. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00723.x
- Fritz, M., El Rawas, R., Salti, A., Klement, S., Bardo, M. T., Kemmler, G., et al. (2011). Reversal of cocaine-conditioned place preference and mesocorticolimbic Zif268 expression by social interaction in rats. *Addict. Biol.* 16, 273–284. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00285.x
- González, C. R., González, B., Matzkin, M. E., Mu-iz, J. A., Cadet, J. L., Garcia-Rill, E., et al. (2015). Psychostimulant-induced testicular toxicity in mice: evidence of cocaine and caffeine effects on the local dopaminergic system. *PLoS ONE* 10:e0142713. doi: 10.1371/journal.pone.0142713
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., and Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 565–598. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009
- Kelz, M. B., Chen, J., Carlezon, W. A. Jr., Whisler, K., Gilden, L., Beckmann, A. M., et al. (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401, 272–276. doi: 10.1038/45790
- Kendler, K. S., Myers, J., and O Gardner, C. (2006). Caffeine intake, toxicity and dependence and lifetime risk for psychiatric and substance use disorders: an epidemiologic and co-twin control analysis. *Psychol. Med.* 36, 1717–1725. doi: 10.1017/S0033291706008622
- Khairnar, A., PlumitalloA Frau, L., Schintu, N., and Morelli, M. (2010). Caffeine enhances astroglia and microglia reactivity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”) in mouse brain. *Neurotox. Res.* 17, 435–439. doi: 10.1007/s12640-009-9125-y
- Li, Y., Ge, S., Li, N., Chen, L., Zhang, S., Wang, J., et al. (2016). NMDA and dopamine D1 receptors within NAc-shell regulate IEG proteins expression in reward circuit during cocaine memory reconsolidation. *Neuroscience* 315, 45–69. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.063
- López-Hill, X., Prieto, J. P., Meikle, M. N., Urbanavicius, J., Abin-Carriquiry, J. A., Prunell, G., et al. (2011). Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav. Brain Res.* 221, 134–141. doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.005
- Mattson, B. J., Koya, E., Simmons, D. E., Mitchell, T. B., Berkow, A., Crombag, H. S., et al. (2008). Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* 27, 202–212. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05984.x
- Maya-Vetencourt, J. F., Tiraboschi, E., Greco, D., Restani, L., Cerri, C., Auvinen, P., et al. (2012). Experience-dependent expression of NPAS4 regulates plasticity in adult visual cortex. *J. Physiol.* 590, 4777–4787. doi: 10.1113/jphysiol.2012.234237
- Miller, K. E. (2008). Energy drinks, race, and problem behaviors among college students. *J. Adolesc. Health.* 43, 490–497. doi: 10.1016/j.jadohealth.2008.03.003
- Muñiz, J. A., Gomez, G., González, B., Rivero-Echeto, M. C., Cadet, J. L., García-Rill, E., et al. (2016). Combined effects of simultaneous exposure to caffeine and cocaine in the mouse striatum. *Neurotox. Res.* 29, 525–538. doi: 10.1007/s12640-016-9601-0
- National Research Council (US) Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research (2003). *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*. Washington, DC: National Academies Press.
- Prast, J. M., Schardl, A., Schwarzer, C., Dechant, G., Saria, A., and Zernig, G. (2014). Reacquisition of cocaine conditioned place preference and its inhibition by previous social interaction preferentially affect D1-medium spiny neurons in the accumbens corridor. *Front. Behav. Neurosci.* 8:317. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00317
- Prieto, J. P., Galvalisi, M., López-Hill, X., Meikle, M. N., Abin-Carriquiry, J. A., and Scorza, C. (2015). Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am. J. Addict.* 24, 475–481. doi: 10.1111/ajad.12245
- Prieto, J. P., Scorza, C., Serra, G. P., Perra, V., Galvalisi, M., Abin-Carriquiry, J. A., et al. (2016). Caffeine, a common active adulterant of cocaine, enhances the reinforcing effect of cocaine and its motivational value. *Psychopharmacology* 233, 2879–2889. doi: 10.1007/s00213-016-4320-z
- Qiu, J., Dunbar, D. R., Noble, J., Cairns, C., Carter, R., Kelly, V., et al. (2016). Decreased *Npas4* and *Arc* mRNA levels in the hippocampus of aged memory-impaired wild-type but not memory preserved 11 β -HSD1 deficient mice. *J. Neuroendocrinol.* 28. doi: 10.1111/jne.12339
- Risinger, R. C., Salmeron, B. J., Ross, T. J., Amen, S. L., Sanfilippo, M., Hoffmann, R. G., et al. (2005). Neural correlates of high and craving during cocaine self-administration using BOLD fMRI. *Neuroimage* 26, 1097–1108. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.03.030
- Robins, M. T., Lu, J., and van Rijn, R. M. (2016). Unique behavioral and neurochemical effects induced by repeated adolescent consumption of caffeine-mixed alcohol in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE* 11:e0158189. doi: 10.1371/journal.pone.0158189
- Sena, L. C., Matos, H. R., Dórea, H. S., Pimentel, M. F., de Santana, D. C., and de Santana, F. J. (2017). Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and high-performance liquid chromatography to the analysis of cocaine’s major adulterants in human urine. *Toxicology* 376, 102–112. doi: 10.1016/j.tox.2016.04.008
- Slaker, M., Churchill, L., Todd, R. P., Blacktop, J. M., Zuloaga, D. G., Raber, J., et al. (2015). Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *J. Neurosci.* 35, 4190–4202. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015
- Spiegel, I., Mardinly, A. R., Gabel, H. W., Bazinet, J. E., Couch, C. H., Tzeng, C. P., et al. (2014). *Npas4* regulates excitatory-inhibitory balance within neural circuits through cell-type-specific gene programs. *Cell* 157, 1216–1229. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.058
- Tzschenkt, T. M., and Schmidt, W. J. (1999). Functional heterogeneity of the rat medial prefrontal cortex: effects of discrete subarea-specific lesions on drug-induced conditioned place preference and behavioural sensitization. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4099–4109. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00834.x
- Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S., and Laroche, S. (2014). The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. *Prog.*

- Mol. Biol. Transl. Sci.* 122, 89–129. doi: 10.1016/B978-0-12-420170-5.00004-0
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., and Tomasi, D. (2012). Addiction circuitry in the human brain. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 321–336. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134625
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Logan, J., Alexoff, D., Fowler, J. S., Thanos, P. K., et al. (2015). Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. *Transl. Psychiatry* 5:e549. doi: 10.1038/tp.2015.46
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Ma, Y., Fowler, J. S., Wong, C., Ding, Y. S., et al. (2005). Activation of orbital and medial prefrontal cortex by methylphenidate in cocaine-addicted subjects but not in controls: relevance to addiction. *J. Neurosci.* 25, 3932–3939. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0433-05.2005
- Ye, L., Allen, W. E., Thompson, K. R., Tian, Q., Hsueh, B., Ramakrishnan, C., et al. (2016). Wiring and molecular features of prefrontal ensembles representing distinct experiences. *Cell* 165, 1776–1788. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.010
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2017 Muñiz, Prieto, González, Sosa, Cadet, Scorza, Urbano and Bisagno. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RESULTADOS III

Objetivo 3.1 Evaluar la capacidad del CBD de atenuar el fenómeno de sensibilización comportamental inducido por el sucedáneo de PBC, y sus acciones sobre la actividad metabólica regional asociada, en el NAc y mPFC.

Los resultados obtenidos referentes al Objetivo Específico 3.2 fueron incluidos en la publicación científica 3, la cual se adjunta a continuación.

Artículo científico 3: Prieto JP, López Hill X, Urbanavicius J, Sanchez V, Nadal X, Scorza C. (2020) Cannabidiol prevents the expression of locomotor sensitization and the metabolic response in the nucleus accumbens and prefrontal cortex elicited by the combined administration of cocaine and caffeine in rats. *Neurotoxicity Research*, doi: 10.1007/s12640-020-00218-9



Cannabidiol Prevents the Expression of the Locomotor Sensitization and the Metabolic Changes in the Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex Elicited by the Combined Administration of Cocaine and Caffeine in Rats

José Pedro Prieto¹ · Ximena López Hill¹ · Jessika Urbanavicius¹ · Verónica Sanchez² · Xavier Nadal^{2,3} · Cecilia Scorza¹

Received: 19 March 2020 / Revised: 20 April 2020 / Accepted: 22 April 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

In the last years, clinical and preclinical researchers have increased their interest in non-psychotomimetic cannabinoids, like cannabidiol (CBD), as a strategy for treating psychostimulant use disorders. However, there are discrepancies in the pharmacological effects and brain targets of CBD. We evaluated if CBD was able to prevent the locomotor sensitization elicited by cocaine and caffeine co-administration. The effect of CBD on putative alterations in the metabolic activity of the medial prefrontal cortex (mPFC) and nucleus accumbens (NAc), and its respective subregions (cingulate, prelimbic, and infralimbic cortices, and NAc core and shell) associated to the behavioral response, was also investigated. Rats were intraperitoneally and repeatedly treated with CBD (20 mg/kg) or its vehicle, followed by the combination of cocaine and caffeine (Coc+Caf; 5 mg/kg and 2.5 mg/kg, respectively) or saline for 3 days. After 5 days of withdrawal, all animals were challenged with Coc+Caf (day 9). Locomotor activity was automatically recorded and analyzed by a video-tracking software. The metabolic activity was determined by measuring cytochrome oxidase-I (CO-I) staining. Locomotion was significantly and similarly increased both in Veh-Coc+Caf- and CBD-Coc+Caf-treated animals during the pretreatment period (3 days); however, on day 9, the expression of the sensitization was blunted in CBD-treated animals. A hypoactive metabolic response and a hyperactive metabolic response in mPFC and NAc subregions respectively were observed after the behavioral sensitization. CBD prevented almost all these changes. Our findings substantially contribute to the understanding of the functional changes associated with cocaine- and caffeine-induced sensitization and the effect of CBD on this process.

Keywords CBD · Cytochrome oxidase-I · Psychostimulants · Behavior · Motivational circuit · Metabolic activity

Introduction

The search for efficient treatments for substance use disorders (SUDs), especially for psychostimulant drugs, is still a significant challenge for clinical and preclinical research (Czoty et al. 2016; Mariani and Levin 2012). Cocaine is one of the most powerful psychostimulants in which abuse and

dependence continue eliciting public health problems, with no effective pharmacological or psychological therapies identified to date (Jordan et al. 2019; Rachid 2018). Besides, cocaine dependence could be faster and stronger depending on the form of consumption—e.g., snorted vs. smoked or intravenous route of administration—(Castaño 2000; Gossop et al. 1992; Hatsukami and Fischman 1996; Samaha and Robinson 2005), and the interaction with active adulterants, like caffeine (Abin Carriquiry et al. 2018; Broseus et al. 2016; Evrard et al. 2010; Fukushima et al. 2014; Sabogal and Urrego 2012).

In previous behavioral studies, we have demonstrated that caffeine can enhance several pharmacological effects induced by acute or repeated injections of cocaine. For example, we have shown that caffeine stimulates the acute motor stimulation of cocaine (Lopez-Hill et al. 2011; Prieto et al. 2012) and increases the reinforcing and motivational value of cocaine in

✉ Cecilia Scorza
cscorza@iibce.edu.uy; scorzacecilia@gmail.com

¹ Departamento de Neurofarmacología Experimental, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

² Phytoplant Research S.L., Córdoba, Spain

³ Barcelona, Spain

the self-administration paradigm (Prieto et al. 2016). Moreover, caffeine potentiates cocaine reward-associated learning in the conditioning place preference test (Muñiz et al. 2017) and enhances the acute wake-promoting effect of cocaine (Schwarzkopf et al. 2018). The repeated treatment with the combination of cocaine and caffeine also elicited the locomotor sensitization phenomenon, an effect that was not observed on cocaine-treated animals under the same protocol schedule (Prieto et al. 2015). This long-lasting phenomenon is thought to share neuroadaptations with SUDs and craving in humans (Di Chiara 1995; Robinson and Berridge 1993). We have also recently demonstrated that the behavioral sensitization response induced by a repeated administration of caffeine-adulterated coca-paste-seized samples (i.e., CP, a smokable form of cocaine; Perez 2003), containing specific ratios of cocaine and caffeine (Abin Carriquiry et al. 2018), is accompanied by molecular changes in the medial prefrontal cortex (mPFC) and nucleus accumbens (NAc), two relevant brain areas of the mesocorticolimbic dopaminergic system and intimately involved in the neurobiological processes of cocaine abuse (Prieto et al. 2020; Steketee and Kalivas 2011). In line with this last result, we have suggested that the combination of these two psychostimulants is enough to evoke rapid enduring neuroplastic events that may contribute to cocaine dependence (Prieto et al. 2020).

Cannabidiol (CBD) is one of the most abundant and studied non-psychotomimetic cannabinoids present in the *Cannabis sativa* L. plant. In the last years, the vast pharmacological potential of CBD in several psychiatric conditions has led the clinicians and preclinical researchers to propose it as a putative strategy for treating SUDs (Calpe-López et al. 2019; Chye et al. 2019; Lujan et al. 2018; 2019; Ware 2018; Wenzel and Cheer 2018). Accordingly, a call to investigate the potential therapeutic benefits of cannabinoids for crack-cocaine use, another smokable form of cocaine (Hatsukami and Fischman 1996), which also is sold containing active adulterants like caffeine (Fukushima et al. 2014), was reported based on promising studies (Fischer et al. 2015). However, research on CBD and psychostimulant-induced behavioral effects have revealed contradictory results (Calpe-López et al. 2019; Lujan et al. 2018). Some of these discrepancies may be explained by the multiple pharmacological effects described for CBD and its diverse brain targets depending on the CBD-injected doses used and regimen of administration and the different experimental approaches and models used, among other factors.

The present study was performed to investigate whether the combination of cocaine- and caffeine-induced locomotor sensitization could be prevented by repeated treatment of CBD. By assessing cytochrome oxidase-I (CO-I) histochemistry, we also characterized the putative alterations in the metabolic activity of the mPFC and the NAc as a result of the repeated cocaine and caffeine or CBD exposure. CO-I activity is a marker for metabolic activity of brain regions (Wong-Riley 1979), and levels of

cytochrome oxidase reaction are intimately associated with the neuron metabolic machinery, which is in turn closely related to the levels of neuronal activity (Vélez-Hernández et al. 2014; Wong-Riley 1979). Thus, the metabolic response may collaborate either in the understanding of the functional state of these brain regions involved in the behavioral sensitization induced by these and other psychostimulant drugs, and to shed light on CBD pharmacological actions and targets.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (IIBCE animal facilities, Montevideo) weighing 300–400 g were employed. All animals were housed in a light- and a temperature-controlled room with a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 am), with free access to food and water. All experimental procedures were conducted according to the National Animal Care Law (No. 18611) and the “Guide to the care and use of laboratory animals” (8th edition, National Academy Press, Washington DC, 2010). Furthermore, all experimental protocols had been approved by the IIBCE Animal Care Committee. Efforts were made to use the minimal number of animals necessary to obtain reliable scientific data.

Drugs and Doses

Cocaine hydrochloride was generously donated by Verardo & Cía Laboratory (Argentina), and caffeine was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Both cocaine and caffeine were dissolved in sterile saline. CBD was kindly donated by Phytoplant Research (Spain) and diluted in 3% Tween 80 in sterile saline (vehicle). Cocaine and caffeine were intraperitoneally (i.p.) co-administered at 5 mg/kg and 2.5 mg/kg, respectively. These doses were selected based on previously published data regarding the acute and facilitating effects of caffeine on cocaine locomotor sensitization (López Hill et al. 2011; Prieto et al. 2015; Prieto et al. 2020). CBD was i.p. injected at 20 mg/kg. The volume of injection was 1 ml/kg.

Behavioral Assays: Locomotor Sensitization

The rats were moved to an experimental room with controlled conditions 24 h previous to the beginning of the experiments. Measurement of locomotor sensitization was carried out using the open field (OF) paradigm, consisting of 30 × 45 × 55 cm acrylic boxes. The animal behavior was recorded and analyzed with the Ethovision XT12 video-tracking software (Noldus, the Netherlands). We measured the horizontal locomotor activity, defined as the total distance moved in meters (m).

The experimental schedule was based on previous studies (Prieto et al. 2015; Prieto et al. 2020), and it is shown in Fig. 1. One day preceding drug treatment, animals were habituated to the OF for 60 min (day 0), in which basal locomotor activity was recorded. Then, animals were pretreated for 3 days, once a day. Animals received an injection of CBD or its respective vehicle (Veh), and 30 min later were injected with the combination of cocaine and caffeine (Coc+Caf) or its respective control group (saline). Distance moved in the OF was assessed each day for 60 min after the second injection. After that, animals were kept in their home cages for a 5-day withdrawal period. On day 9, all rats received a challenge dose of Coc+Caf, and locomotor activity was recorded for 60 min. On days 1 and 9, before the second injection, animals were placed into the OF for 20-min habituation period (Fig. 1).

During the experiments, the OF was cleaned with alcohol 30% after each session, before placing the following animal.

Tissue Preparation

Immediately after the end of the last behavioral session (day 9), the rats were sacrificed, and their brains rapidly removed. The brain was sectioned in three smaller chunks (2 coronal cuts, at the optic chiasma and cerebellum antero-posterior level) and exposed to a light fixation by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB 0.1 M, pH = 7.4) for 15 h. Then, the brain was transferred to a PBS with 30% sucrose solution for cryoprotection. Forty-eight hours later, the brain fragments were frozen on dry ice, and the regions of interest (i.e., mPFC, NAc; Fig. 1) were sectioned into 40- μ m coronal sections by a cryostat (Leica Biosystems, USA). The tissue was then placed in an anti-freeze solution and stored at -20 °C until the histochemical assays.

Cytochrome Oxidase Histochemistry and Data Analysis

Histochemistry of CO-I was performed following the protocol of Wong-Riley (1979) and Tseng et al. (2006). Tissue sections were mounted onto double gelatin-coated glass slides and dehydrated at room temperature for 30 min. Slides were then incubated for 60 min at 37 °C in PBS 0.1 M containing 0.50 g/l of 3,3-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, USA), 0.33 g/l of horse heart cytochrome c (Sigma-Aldrich), 44 g/l of sucrose (Sigma-Aldrich), and 0.2 g/l of catalase (Sigma-Aldrich).

After incubation, the slides were digitalized using a FLA-9000 scanner (FUJIFILM, Japan). Images were converted to grayscale, and the CO-I activity in the regions of interest was inferred by measuring the optical density with ImageJ software. The mean relative optical density (ROD) per pixel was determined by subtracting the optical density of the structures of interest to the background. The structures of interest were mPFC (total activity) and cortical subregions (i.e., anterior cingulate, Acg; infralimbic, IL; and prelimbic, PrL), and the NAc (total activity) and specific subregions like NAc core and shell (NAc,co and NAc,sh). Background optical density was measured at the level of the corpus callosum for NAc sections, and the forceps minor of the corpus callosum for the mPFC sections. For each animal, a single value per structure was obtained by averaging measurements from both hemispheres of three consecutive sections. A representative coronal brain section showing the CO-I activity in regions of interest is illustrated in Fig. 2.

Statistical Analyses

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Locomotor activity was analyzed by two-way (time and pretreatment) analysis of variance (ANOVA) for repeated

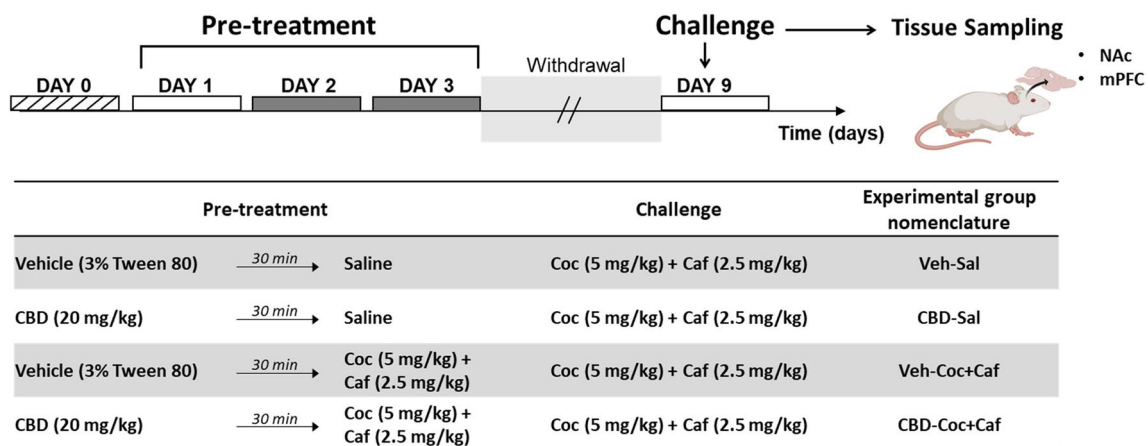


Fig. 1 Schematic representation of the experimental protocol used in this study and the detailed experimental groups, treatment, and nomenclature. Rats were pretreated with CBD or its vehicle (Veh-CBD, 3% Tween 80), and 30 min later received an injection of Coc+Caf or saline for 3 days.

Five days later (withdrawal period), animals were challenged (day 9) with a dose of Coc+Caf. Tissue samples were taken immediately after the end of the behavioral testing on the challenge day (day 9)

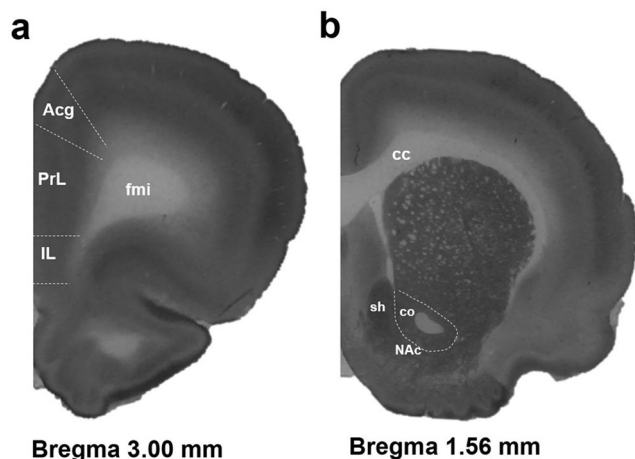


Fig. 2 Representative examples of coronal hemispheric sections at the level of the mPFC (a) and NAc (b) showing CO-I staining after 60 min of incubation. Representative sections are shown at different bregma levels, according to Paxinos and Watson, 2005. ACg, anterior cingular cortex; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; fmi, anterior forceps of the corpus callosum; NAc sh, NAc shell; NAc co, NAc core; cc, corpus callosum

measures followed by Tukey's post hoc test and by one-way ANOVA for independent measures (treatment) followed by Tukey's post hoc test. CO-I histochemistry was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. The analysis was performed with STATISTICA 10 software. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Locomotor Sensitization Induced by the Co-administration of Cocaine and Caffeine and the Effect of CBD

Figure 3 shows the effect of different treatments on animal motor activity during the 3 days of pretreatment period

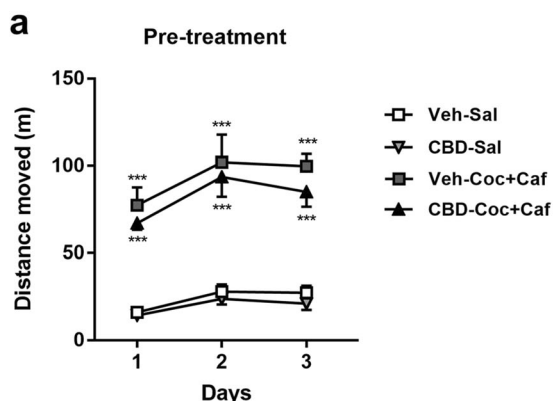
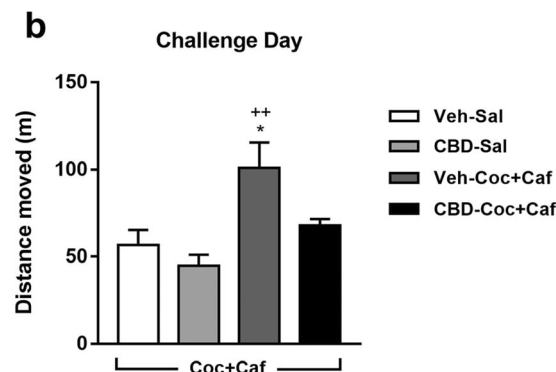


Fig. 3 Effect of CBD pretreatment on the pretreatment period (a), and the challenge day induced by Coc+Caf (b). Data are expressed as mean \pm SEM. Two-way repeated measures ANOVA and one-way ANOVA

(Fig. 3a) and on challenge day (Fig. 3b). In Fig. 3a, two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment [$F_{(2,63)} = 6.27, p < 0.01$] and time [$F_{(3,63)} = 73.78, p < 0.0001$] but not for the treatment \times time interaction [$F_{(6,63)} = 0.39, p = 0.88$]. Results of the Tukey post hoc test demonstrated a gradual rise and a significant increase ($p < 0.001$) in the total distance moved after the repeated injection of Veh-Coc+Caf, which remained high from day 1 to day 3 in comparison with the respective control group (Veh-Sal). CBD-Coc+Caf-treated animals showed a similar pattern than that observed in the Veh-Coc+Caf group, indicating that the treatment with CBD did not prevent the significant increment in the animal locomotion induced by the combination of the psychostimulant drugs (Fig. 3a). There were no significant changes in total locomotor activity between day 1 and day 3 in Veh-Sal or CBD-Sal-treated animals (Fig. 3a). For data illustrated in Fig. 3b, one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [$F_{(3,24)} = 8.58, p < 0.05$] and the Tukey post hoc test showed that the Veh-Coc+Caf-treated group was able to express the sensitization phenomenon since the effect of the challenge treatment (Coc+Caf) on the Veh-Coc+Caf group was significantly higher than that observed on the Veh-Sal group ($p < 0.05$). Interestingly, the pretreatment with CBD blunted the expression of sensitization, since the distance moved shown by CBD-Coc+Caf-treated animals was not statistically different from that observed in the Veh-Sal group (67.9 ± 3.7 vs. $56.5 \pm 8.8, p = 0.79$). Moreover, no statistical differences were observed in comparison with the CBD-Sal-treated group either (67.9 ± 3.7 vs. $44.8 \pm 6.2, p = 0.27$).

Metabolic Response in mPFC and NAc Associated to the Locomotor Sensitization and the Effect of CBD

Figures 4 and 5 show the effect of treatments on CO-I activity of the mPFC and NAc, respectively. For the mPFC, one-way ANOVA revealed a significant effect of



followed by Tukey's post hoc test. $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$ different from Veh-Sal; $++p < 0.01$ different from CBD-Sal. $N = 6-7$

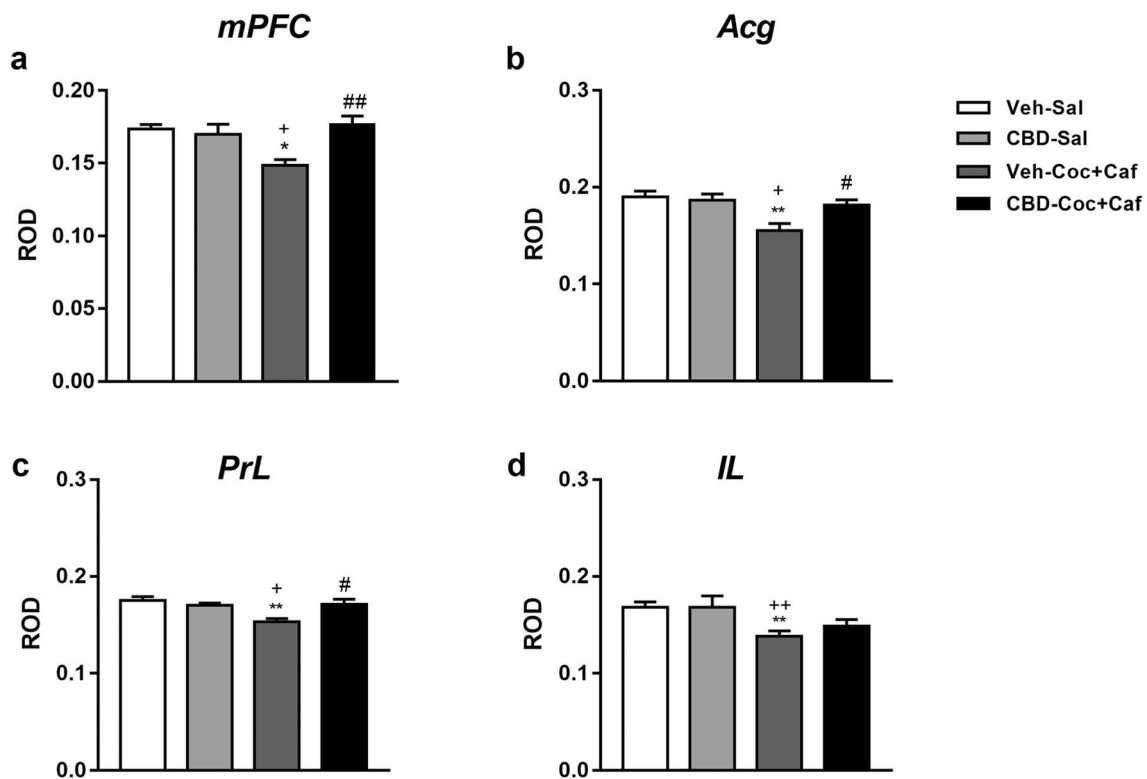


Fig. 4 CO-I activity after the Coc+Caf expression of locomotor sensitization and CBD pretreatment, in total mPFC (a), anterior cingular cortex (Acg; b), prelimbic cortex (PrL; c), and infralimbic cortex (IL; d). Data of relative optical density (ROD) are expressed as

mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ different from Veh-Sal; + $p < 0.05$ and ++ $p < 0.01$ different from CBD-Sal; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ different from Veh-Coc+Caf. $N = 6-7$

treatment [$F_{(3,24)} = 6.45, p < 0.01$], and the Tukey post hoc multiple comparisons test showed a significant decrease in the metabolic activity of CO-I of the Veh-Coc+Caf-treated animals in comparison with the Veh-Sal group ($p < 0.05$; Fig. 4a). This result indicated that the combination of cocaine and caffeine had significant effects on the functional activity of this region. Moreover, CBD did not per se modify the metabolic activity of the mPFC ($p > 0.05$), although it could significantly prevent the hypometabolic response observed in the Veh-Coc+Caf group ($p < 0.01$). Results also showed that this hypometabolic effect of repeated cocaine and caffeine co-administration persisted when mPFC subregions were individually analyzed, as illustrated in Fig. 4b–d. One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment for the Acg [$F_{(3,24)} = 6.18, p < 0.01$], PrL [$F_{(3,24)} = 5.44, p < 0.01$], and IL cortices [$F_{(3,24)} = 6.29, p < 0.01$]. Specifically, the Tukey post hoc test also demonstrated a significant decrease in metabolic activity of Acg (Fig. 4b; $p < 0.01$), PrL (Fig. 4c; $p < 0.01$), and IL cortical subregions (Fig. 4d; $p < 0.01$) of the Veh-Coc+Caf group while the pretreatment with CBD did not per se induce changes in this parameter. However, CBD significantly prevented the hypometabolic response induced by the combination

of cocaine and caffeine in the Acg and PrL cortices (Fig. 4b, c; $p < 0.05$), but not in the IL cortex (Fig. 4d; $p > 0.05$).

An opposite effect was observed on the metabolic activity of the NAc (Fig. 5), demonstrating a hypermetabolic response associated with the locomotor sensitization. One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on the CO-I activity of the NAc [$F_{(3,24)} = 3.73, p < 0.05$], and the Tukey post hoc test revealed a significant difference between Veh-Coc+Caf and Veh-Sal-treated animals ($p < 0.05$), indicating that the repeated treatment of cocaine and caffeine co-administration also had significant effects on the functional activity of this region. Moreover, CBD could significantly prevent this effect ($p < 0.05$), without per se induced changes in this parameter, as illustrated in Fig. 5a. A similar pattern was observed for both analyzed NAc subregions (Fig. 5b, c), in which one-way ANOVA also revealed a significant effect of treatment for NAc,co [$F_{(3,24)} = 5.01, p < 0.01$] and NAc,sh [$F_{(3,24)} = 4.98, p < 0.01$]. The Tukey post hoc test demonstrated a significant increase in the CO-I activity of NAc,co (Fig. 5b, $p < 0.05$) and NAc,sh (Fig. 5c, $p < 0.05$) of the Veh-Coc+Caf group which was significantly blunted by CBD ($p < 0.01$ for NAc,co and $p < 0.05$ for NAc,sh).

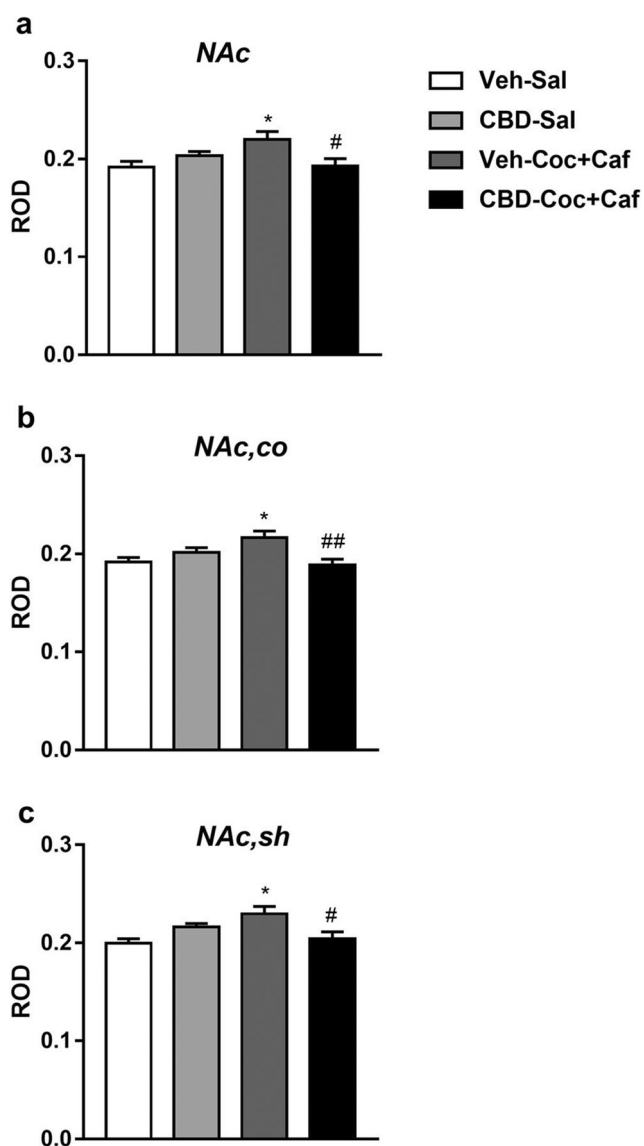


Fig. 5 CO-I activity after the Coc+Caf expression of locomotor sensitization and CBD pretreatment, in the total NAc (**a**), NAc core (NAc,co; **b**), and NAc shell (NAc,sh; **c**). Data of relative optical density (ROD) are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$ different from Veh-Sal; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ different from Veh-Coc+Caf. $N = 6-7$

Discussion

This study shows that animals repeatedly treated with cocaine and caffeine co-administration displayed locomotor sensitization when compared to their vehicle counterparts, and this phenomenon was associated with significant changes in the metabolic activity of the mPFC and NAc, two relevant brain regions closely involved in the expression of this behavioral response. In addition, our results demonstrated that repeated treatment with CBD blunted the behavioral response and the metabolic changes observed in both brain regions.

Here, we used the combined administration of cocaine and caffeine after a previously established protocol in rats in which locomotor sensitization was observed (Prieto et al. 2015). This particular combination reflected the chemical composition of specific CP-seized samples (Lopez Hill et al. 2011; Prieto et al. 2015; Prieto et al. 2016; Prieto et al. 2020). CP is a smokable cocaine form commonly consumed in several South American countries with a high abuse liability (Abin Carriquiry et al. 2018; Castaño 2000; Jeri 1982; Perez 2003). We recently demonstrated that specific caffeine-adulterated CP-seized sample evoked the behavioral sensitization in animals, in comparison with those treated with the non-adulterated counterpart, which was unable to express this behavioral response (Prieto et al. 2020). In the sensitized animals, we identified molecular changes involving the mRNA expression of receptor subunits of the dopaminergic and glutamatergic systems in the mPFC and NAc, as well as other molecular markers (e.g., adenosinergic, cannabinoid receptor subunits, and synaptic plasticity-associated genes). Besides the identification of these molecular mechanisms, the present study revealed that the co-administration of cocaine and caffeine induced specific metabolic changes in mPFC and NAc regions, which may contribute to the understanding of the mesocortical system functional state related to locomotor sensitization.

It is widely accepted that cocaine addiction is associated with dysfunction of the PFC, which facilitates relapse, compulsive drug-taking, and loss of inhibitory control (Allen et al. 2019; Chen et al. 2013; Goldstein and Volkow 2011; Volkow et al. 1993). Accordingly, the observed hypoactivity in mPFC and its subregions has presumably resulted as consequence of a reduced energy demand after the repeated treatment of both psychostimulants. It may be possible that the combination of both psychostimulants impairs mPFC functionality, which may contribute to the expression of the locomotor sensitization. Interestingly, reduced CO-I activity in the mPFC induced by cocaine has been previously reported, but only after higher doses and more prolonged treatment (Vélez-Hernández et al. 2014; Walker and Sevarino 1995) in comparison with those used in the present study. Thus, our results highlight the high efficacy of the combination of low doses of cocaine and caffeine at the behavioral and functional level (Prieto et al. 2015; Prieto et al. 2016).

In addition to mPFC, several studies have shown NAc as a relevant brain substrate involved in the expression of psychostimulant-induced behavioral sensitization (Churchill et al. 1999; Pierce et al. 1996). We observed increased CO-I activity only in the NAc of sensitized animals, which suggests an augmented energy demand implicating a consequent neuronal activation. These results could be related to the increased glutamatergic and dopaminergic input to the NAc from the mPFC and ventral tegmental area (VTA), respectively, broadly associated with behavioral responses after repeated cocaine

administration (Cornish and Kalivas 2001; Dos Santos et al. 2018; Scofield et al. 2016). Moreover, our data are in accordance with the study reported by Walker and Sevarino (1995), who reported that CO-I activity increased in the NAc and decreased in the mPFC after a chronic treatment of cocaine at high doses and a withdrawal period (Walker and Sevarino 1995).

Remarkably, the repeated treatment of CBD blunted not only the expression of the behavioral sensitization but also the metabolic changes observed in mPFC and NAc subregions. Chen and collaborators (2013) reported that optogenetic rescuing of the cocaine-induced mPFC hypoactivity in a rat model of compulsive drug-seeking was able to prevent the cocaine-seeking behavior and diminish craving (Chen et al. 2013). Therefore, we may speculate that the CBD treatment, which can prevent the metabolic hypoactivity of these cortical networks, might be useful to blunt the drug-seeking and psychostimulant craving. The lack of effect of CBD to prevent the IL hypoactivity was unexpected, although it may be possible that this result reflects differences among CBD brain targets expressed in each mPFC subregion. Alternatively, a distal effect of CBD modulating the activity of neurons from other brain regions involved in psychostimulant-induced behavioral sensitization (e.g., VTA) should be considered (Norris et al. 2016; Renard et al. 2016). Modulation of functionally and molecularly diverse neurons in VTA (Lammel et al. 2008) could result in a differential response of each mPFC subregion, especially of IL. It will be necessary to characterize the differential contribution of PrL and ACC cortices in comparison with IL in the mechanism of action behind the CBD therapeutic potential in psychostimulant addiction.

As in the mPFC, the functional activation of accumbal networks underlying the sensitization could be regulated after CBD treatment. In support of that, the capacity of CBD to reverse the increase in the activity of the mesolimbic DA reward system induced by amphetamine was recently reported (Renard et al. 2016).

While CBD reduced the behavioral response in sensitized animals, a non-significant effect was exerted by CBD during the pretreatment or acquisition phase, suggesting relevant differences in those neurobiological processes which are prevented by CBD. Although the mechanisms involved in this difference are not known, our data agree with previous studies reporting that CBD can reverse or prevent neuroadaptations induced by cocaine repeated administration without altering cocaine reinforcing or rewarding properties (Calpe-López et al. 2019). Moreover, it has been reported that CBD is more effective in promoting the extinction of cocaine in the conditioned place preference than blocking its acquisition (Parker et al. 2004).

Multiple targets involving the mechanism of action of CBD to prevent both behavioral and functional responses may be engaged. A previous preclinical study demonstrated that treatment with the CB1 receptor antagonist rimonabant blocked cocaine-induced hyperlocomotion and behavioral sensitization in mice (Marinho et al. 2015). Thus, it may be possible

that the CB1 receptor mediates the effect of CBD on attenuating cocaine- and caffeine-induced sensitization. It was widely accepted that CBD has very low affinity for this receptor (Pertwee, 2008); however, recent studies describe that CBD has affinity at physiological-relevant concentrations for allosteric sites of both cannabinoid CB1 (Laprairie et al., 2015) and CB2 receptors (Martinez-Pinilla et al. 2017; Tham et al. 2019), and skews biased agonism in both receptors in presence of other ligands (Navarro et al. 2018) that support the relevance of this mechanism of action. Even that, we cannot exclude that alternative mechanisms could be involved (e.g., 5-HT1A, D2, μ - and delta-opioid, α -7, or peroxisome proliferator-activated receptors; Pisanti et al. 2017; Russo et al. 2005). Among all these multiple sites of action, and in addition of a putative CB1 receptor-mediated mechanism, there is one of particular interest to our study. The equilibrative nucleotide transporter 1 (ENT1; adenosine uptake protein) is the primary mechanism of adenosine reuptake and one of the several brain targets underlying the mechanism of action of CBD (Carrier et al. 2006). ENT1 inhibitors, such as CBD, could enhance endogenous activity at adenosine receptors (Carrier et al. 2006; Noji et al. 2002). Although the inhibition of ENT1 was proposed to mediate the anti-inflammatory effect of CBD (Carrier et al. 2006), we cannot discard this brain target to explain, at least in part, our results. Actually, caffeine is an A1 and A2 receptor antagonist (Ferré 2016), and it was reported that caffeine increases cocaine locomotor activation mainly through the A2A antagonism (Filip et al. 2006). Thus, it may be possible that a competitive action could emerge between the increased levels of adenosine, evoked by CBD, and caffeine for the adenosine receptors binding site, resulting in an attenuation of caffeine action. Whether this mechanism is mediating the CBD's attenuation of sensitization remains to be elucidated. Moreover, the antioxidant and neuroprotective properties of CBD or even its anti-inflammatory action cannot be excluded of putative mechanisms of action to prevent the behavioral response and the associated metabolic changes, since preclinical studies have demonstrated that drugs of abuse induce inflammatory effects and disrupt glutamate homeostasis through their interaction with microglia and astrocytes (Bachtell et al. 2017; Calpe-López et al. 2019).

Conclusions

This study shows that CBD treatment blunted the expression of the locomotor sensitization induced by the combination of cocaine and caffeine, together with the associated metabolic changes found in the mPFC and NAc. While evidence of CBD efficacy for psychostimulant use is inconsistent, our results help to understand under which experimental conditions CBD may reduce long-lasting effects that lead to psychostimulant-induced behavioral sensitization. Moreover,

it seems that CBD could attenuate those neuroplastic events involved during the expression of sensitization, after a withdrawal period, without altering the effects of the initial repeated exposure during the pretreatment period.

Overall, this study contributes to the understanding of the CBD role on particular behavioral and functional effects induced by psychostimulants, revealing an advantageous therapeutic opportunity for psychostimulants dependence.

Acknowledgments We are grateful to Prof. Kuei Y. Tseng for his remarkable help in the analysis of the results and to María Paula Latorre for her technical assistance.

Funding Information This study was financially supported by ANII-FCE_3_2018_1_149210, Premio Concursable Junta Nacional de Drogas (Uruguay) and PEDECIBA (Uruguay). José Pedro Prieto has postgraduate fellowships from ANII (Uruguay) and CAP (Universidad de la República, Uruguay).

Compliance with Ethical Standards

All experimental procedures were conducted according to the National Animal Care Law (No. 18611) and the “Guide to the care and use of laboratory animals” (8th edition, National Academy Press, Washington DC, 2010). Furthermore, all experimental protocols had been approved by the IIBCE Animal Care Committee.

Conflict of Interest Cannabidiol was donated by Phytoplant Research (Spain). Verónica Sanchez and Xavier Nadal both work for Phytoplant Research S.L.

References

- Abin Carriquiry JA, Martínez Busi M, Galvalisi M, Minteguiaga M, Prieto JP, Scorza C (2018) Identification and quantification of cocaine and active adulterants in coca-paste seized samples: useful scientific support to health care. *Neurotox Res* 34:295–304
- Allen CP, Park K, Li A, Volkow ND, Koob GF, Pan Y, Hu XT, Du C (2019) Enhanced neuronal and blunted hemodynamic reactivity to cocaine in the prefrontal cortex following extended cocaine access: optical imaging study in anesthetized rats. *Addict Biol* 24(3):485–497
- Bachtell RK, Jones JD, Heinzerling KG, Beardsley PM, Comer SD (2017) Glial and neuroinflammatory targets for treating substance use disorders. *Drug Alcohol Depend* 180:156–170
- Broséus J, Gentile N, Esseiva P (2016) The cutting of cocaine and heroin: a critical review. *Forensic Sci Int* 262:73–83
- Calpe-López C, García-Pardo MP, Aguilar MA (2019) Cannabidiol treatment might promote resilience to cocaine and methamphetamine use disorders: a review of possible mechanisms. *Molecules* 24(14):2583
- Castaño GA (2000) Cocainas fumables en Latinoamérica. *Adicciones* 12: 541–550
- Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ (2006) Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7895–7900
- Chen BT, Yau HJ, Hatch C, Kusumoto-Yoshida I, Cho SL, Hopf FW, Bonci A (2013) Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature* 496(7445):359–362
- Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW (1999) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* 72:2397–2403
- Chye Y, Christensen E, Solowij N, Yücel M (2019) The endocannabinoid system and cannabidiol's promise for the treatment of substance use disorder. *Front Psychiatry* 10:63
- Cornish J, Kalivas P (2001) Cocaine sensitization and craving: differing roles for dopamine and glutamate in the nucleus accumbens. *J Addict Dis* 20:43–54
- Czoty PW, Stoops WW, Rush CR (2016) Evaluation of the “pipeline” for development of medications for cocaine use disorder: a review of translational preclinical, human laboratory, and clinical trial research. *Pharmacol Rev* 68(3):533–562
- Di Chiara G (1995) The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 38:95–137
- Dos Santos M, Cahill E, Bo G, Vanhoutte P, Caboche J, Giros B, Heck N (2018) Cocaine increases dopaminergic connectivity in the nucleus accumbens. *Brain Struct Funct* 223:913–923
- Evrard I, Legleye S, Cadet-Tairo A (2010) Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *Int J Drug Policy* 21(5):399–406
- Ferré S (2016) Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. *Psychopharmacology (Berlin)* 233:1963–1979
- Filip M, Frankowska M, Zaniewska M, Przegaliński E, Müller CE, Agnati L, Franco R, Roberts D, Fuxe K (2006) Involvement of adenosine A2A and dopamine receptors in the locomotor and sensitizing effects of cocaine. *Brain Res* 1077:67–80
- Fischer B, Kuganesan S, Gallasi A, Malcher-Lopes R, van den Brink W, Wood E (2015) Addressing the stimulant treatment gap: a call to investigate the therapeutic benefits potential of cannabinoids for crack-cocaine use. *Int J Drug Policy* 26(12):1177–1182
- Fukushima AR, Carvalho VM, Carvalho DG, Diaz E, Bustillos JO, Spinosa HD et al (2014) Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. *Forensic Sci Int* 243C:95–98
- Goldstein RZ, Volkow ND (2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci* 12:652–669
- Gossop M, Griffiths P, Powis B, Strang J (1992) Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine, and amphetamines. *Br J Addict* 87:1527–1536
- Hatsukami D, Fischman M (1996) Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *JAMA* 276:1580–1588
- Jeri FR (1982) The coca paste epidemic in South America: epidemiological, clinical, experimental and therapeutic observations. *Revista de la Sanidad de las Fuerzas Policiales* 43:170–179
- Jordan CJ, Cao J, Newman AH, Xi ZX (2019) Progress in agonist therapy for substance use disorders: lessons learned from methadone and buprenorphine. *Neuropharmacology* 158:107609
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57(5):760–773
- Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Denovan-Wright EM (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 172(20):4790–4805
- López Hill X, Prieto J, Meikle M, Urbanavicius J, Prunell J, Abin Carriquiry A, Umpiérrez E, Scorza C (2011) Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav Brain Res* 221:134–141
- Luján MÁ, Castro-Zavala A, Alegre-Zurano L, Valverde O (2018) Repeated Cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 143:163–175

- Luján MÁ, Cantacors L, Valverde O (2019) The pharmacological reduction of hippocampal neurogenesis attenuates the protective effects of cannabidiol on cocaine voluntary intake *Addict Biol* e12778
- Mariani JJ, Levin FR (2012) Psychostimulant treatment of cocaine dependence. *Psychiatr Clin North Am* 35(2):425–439
- Marinho EA, Oliveira-Lima AJ, Santos R, Hollais AW, Baldaia MA, Wuo-Silva R et al (2015) Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization to ethanol, morphine and cocaine in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 58:22–31
- Martínez-Pinilla E, Varani K, Reyes-Resina I, Angelats E, Vincenzi F, Ferreiro-Vera C, Oyarzabal J, Canela EI, Lanciego JL, Nadal X, Navarro G, Borea PA, Franco R (2017) Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. *Front Pharmacol* 8:744
- Muñiz J, Prieto JP, González B, Sosa M, Cadet JL, Scorza C, Urbano F, Bisagno V (2017) Cocaine and caffeine effects on the conditioned place preference test: concomitant changes on early genes within the mouse prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Front Behav Neurosci* 11:200
- Navarro G, Reyes-Resina I, Rivas-Santisteban R, Sánchez de Medina V, Morales P, Casano S, Ferreiro-Vera C, Lillo A, Aguinaga D, Jagerovic N, Nadal X, Franco R (2018) Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes. *Biochem Pharmacol* 157:148–158
- Noji T, Takayama M, Mizutani M, Okamura Y, Takai H, Karasawa A, Kusaka H (2002) KF24345, an adenosine uptake inhibitor, suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production and leukopenia via endogenous adenosine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 300(1):200–205
- Norris C, Loureiro M, Kramar C, Zunder J, Renard J, Rushlow W, Laviolette SR (2016) Cannabidiol modulates fear memory formation through interactions with serotonergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropsychopharmacology* 41(12):2839–2850
- Parker L, Burton P, Sorge R, Yakiwchuk C, Mechoulam R (2004) Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology* 175:360–366
- Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th edn. Academic press, Sydney
- Perez J (2003) Clínica de la adicción a la pasta base de cocaína. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría* 41:55–63
- Pertwee RG (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* 153:199–215
- Pierce RC, Bell K, Duffy P, Kalivas PW (1996) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* 16:1550–1560
- Pisanti S, Malfitano A, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, Abate M et al (2017) Cannabidiol: state of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol Therapeut* 175:133–150
- Prieto JP, Meikle M, López Hill X, Urbanavicius J, Abin Carriquiry A, Prunell G, Scorza MC (2012) Relevancia del adulterante activo cafeína en la acción estimulante de la pasta base de cocaína. *Rev Psiquiatr Uru* 76:35–48
- Prieto JP, Galvalisi M, López Hill X, Meikle MN, Abin Carriquiry JA, Scorza C (2015) Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am J Addict* 24:475–481
- Prieto JP, Scorza C, Serra GP, Perra V, Piras G, Galvalisi M, Abin Carriquiry JA, Valentini V (2016) Cocaine motivational value is enhanced when co-administered with caffeine: relevance of adulterants in reinforcement. *Psychopharmacol* 233:2879–2889
- Prieto JP, González B, Muñiz J, Bisagno V, Scorza C (2020) **Molecular changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex associated with the locomotor sensitization induced by coca paste seized sample.** *Psychopharmacology* doi: <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05474-3>
- Rachid F (2018) Neurostimulation techniques in the treatment of cocaine dependence: a review of the literature. *Addict Behav* 76:145–155
- Renard J, Loureiro M, Rosen LG, Zunder J, de Oliveira C, Schmid S (2016) Cannabidiol counteracts amphetamine-induced neuronal and behavioral sensitization of the mesolimbic dopamine pathway through a novel mTOR/p70S6 kinase signaling pathway. *J Neurosci* 36:5160–5169
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18(3):247–291
- Russo E, Burnett A, Hall B, Parker K (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res* 30:1037–1043
- Sabogal J, Urrego J (2012) Quantifying the chemical composition of crack-cocaine (bazuco) samples seized in Colombia during the first half of 2010. *J Public Health* 14(6):1014–1025
- Samaha A, Robinson T (2005) Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends Pharmacol Sci* 26:82–87
- Scofield M, Heinsbroek J, Gipson C, Kupchik Y, Spencer S, Smith A, Roberts-Wolfe D, Kalivas P (2016) The nucleus accumbens: mechanisms of addiction across drug classes reflect the importance of glutamate homeostasis. *Pharmacol Rev* 68:816–871
- Schwarzkopf N, Lagos P, Falconi A, Scorza C, Torterolo P (2018) Caffeine as an adulterant of coca paste seized samples: preclinical study on the rat sleep-wake cycle. *Behav Pharmacol* 29(6):519–529
- Steketee J, Kalivas P (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 334:348–365
- Tham M, Yilmaz O, Alaverdashvili M, Kelly MEM, Denovan-Wright EM, Laprairie RB (2019) Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 176:1455–1469
- Tseng KY, Amin F, Lewis BL, O'Donnell P (2006) Altered prefrontal cortical metabolic response to mesocortical activation in adult animals with a neonatal ventral hippocampal lesion. *Biol Psychiatry* 60(6):585–590
- Vélez-Hernández ME, Padilla E, Gonzalez-Lima F, Jiménez-Rivera CA (2014) Cocaine reduces cytochrome oxidase activity in the prefrontal cortex and modifies its functional connectivity with brainstem nuclei. *Brain Res* 1542:56–69
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL, Wolf AP (1993) Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 14:169–177
- Walker JR, Sevarino KA (1995) Regulation of cytochrome c oxidase subunit mRNA and enzyme activity in rat brain reward regions during withdrawal from chronic cocaine. *J Neurochem* 64(2):497–502
- Ware MA (2018) Medical cannabis research: issues and priorities. *Neuropsychopharmacology* 43:214–215
- Wenzel JM, Cheer JF (2018) Endocannabinoid regulation of reward and reinforcement through interaction with dopamine and endogenous opioid signaling. *Neuropsychopharmacology* 43:103–115
- Wong-Riley MTT (1979) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94–101

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo de Tesis se investigaron dos procesos íntimamente relacionados con el desarrollo adictivo: la sensibilización comportamental y el aprendizaje asociado a recompensa. Respecto a la sensibilización, los resultados comportamentales se encontraron de acuerdo a lo esperado y reportado previamente (Prieto y cols. 2015). Tanto la combinación de cocaína y cafeína (Coc+Caf; a dosis equivalentes a su contenido en muestras de PBC), como la muestra de PBC adulterada con cafeína, lograron expresar el fenómeno de sensibilización locomotora con un protocolo de administración corto de 3 días de pre-tratamiento. La cocaína sola y la muestra de PBC sin cafeína, por otro lado, no lograron expresar la sensibilización con dicho protocolo, a las dosis ensayadas. Estos resultados, junto con el fuerte condicionamiento generado por Coc+Caf en el modelo de CPP, resaltan el alto impacto a nivel comportamental que genera la administración simultánea de estas drogas en relación a cada una por separado, cuando se administran a las dosis y proporciones adecuadas.

En el desarrollo de esta línea de investigación, hemos demostrado repetidamente que los efectos comportamentales de PBC se reproducen de forma consistente al administrar únicamente la combinación de sus elementos activos principales, cocaína y cafeína, a dosis correspondientes con su contenido en las muestras de PBC (López-Hill y cols. 2011, Prieto y cols. 2012, Prieto y cols. 2015, Schwarzkopf y cols. 2018). Por lo tanto, a los efectos de esta discusión general, la PBC y la combinación de Coc+Caf, mantenida en esta Tesis en la proporción 2:1 presente en la PBC utilizada, se considerarán como equivalentes.

Neuroadaptaciones asociadas al efecto facilitador de la cafeína sobre la acción reforzadora de PBC

Una primera parte de este trabajo se centró en el estudio de las acciones funcionales y moleculares que acompañan la acción potenciadora de la cafeína, sobre el efecto reforzador de la cocaína presente en la PBC. Los resultados obtenidos sugieren, en su conjunto, que dicho efecto potenciador parece no estar mediado por el reclutamiento de mecanismos y vías adicionales y diferenciales, inducidas por la cafeína *per se*, sino por la facilitación y aceleración dada por la cafeína de cambios ya descritos para tratamientos crónicos de cocaína, asociados al desarrollo de la dependencia.

En este sentido, la expresión de la sensibilización locomotora inducida por Coc+Caf se acompañó de la expresión diferencial de Fra-2 en el NAc, lo que sugiere diferencias en la cascada de adaptaciones moleculares que inicia con la inducción de IEGs. Esta expresión diferencial puede involucrar mecanismos de desensibilización rápida mediada por Δ FosB o procesos de LTD en las terminales glutamatérgicas del NAc facilitados por la activación de receptores CB1 (ver Disusión parcial de RESULTADOS I). En este contexto, existen evidencias que muestran que los tratamientos largos con cocaína (14 días) son capaces de inducir un incremento del receptor CB1 en el NAc (Adamczyk y cols. 2012, Bystrowska y cols. 2018). De manera interesante, los datos del análisis de expresión génica en el NAc y mPFC luego de la sensibilización a PBC evidenciaron un incremento en los niveles de ARNm del receptor CB1 en el NAc, únicamente en el grupo que logró expresar la sensibilización, tratado con PBC con cafeína (CP-2). Frente a este resultado, sin embargo, es importante considerar que el receptor CB1 también se expresa en las terminales de interneuronas GABAérgicas en el NAc, y su activación está relacionada con distintos aspectos del desarrollo adictivo que los CB1 presentes en terminales glutamatérgicas (Martín-García y cols. 2016, Melis y Pistis 2012). Estudios con el modelo de autoadministración a cocaína demostraron que los receptores CB1 en terminales GABAérgicas participan en el control de la liberación de DA inducida por esta droga, mientras que los CB1 de las terminales glutamatérgicas son fundamentales en el control de la relación entre receptores AMPA/NMDA (Martín-García y cols. 2016). En este sentido, nuestros resultados apuntan hacia procesos de plasticidad en el NAc de naturaleza glutamatérgica, ya que se encontró un incremento también en la expresión de sinaptofisina y GLUR1 en los animales sensibilizados con CP-2. De todas formas, no puede descartarse que ambos mecanismos de plasticidad (potenciación de la señal glutamatérgica y LTD) estén ocurriendo de manera simultánea, ya que distintas subpoblaciones de MSNs proyectan hacia el pálido ventral y el VTA (Baimel y cols. 2019, Yang y cols. 2018), y se ha reportado que las adaptaciones inducidas por la cocaína en estas neuronas dependen de sus *inputs* y *outputs* específicos (Baimel y cols. 2019). También se han descrito procesos de LTP y LTD inducidos por cocaína de manera diferencial sobre las MSNs que expresan D1 y D2 respectivamente (Creed y cols. 2016). Estos procesos simultáneos potenciarían la vía de las MSNs-D1 y debilitarían la vía de MSNs-D2, lo que en conjunto resultaría en un incremento de las acciones reforzadoras y motivacionales de la cocaína (Lobo y Nestler 2011).

Los datos obtenidos son coherentes con estos mecanismos, y reflejan procesos de plasticidad específicos a mediano y largo plazo. Resulta destacable que las neuroadaptaciones mencionadas han sido descritas principalmente para tratamientos crónicos con cocaína, mientras que con los protocolos utilizados pudimos observar estos cambios bien definidos, con sólo tres días de tratamiento. Esto sugiere que los mismos pueden ser facilitados por la adulteración con cafeína. Por lo tanto, la acción potenciadora de la cafeína no sólo se expresa a nivel comportamental, como ya ha sido

demostrado en estudios previos del laboratorio, sino que también se refleja en los tiempos de inicio de adaptaciones a nivel funcional y molecular.

Una respuesta similar se observó en el CPP, sobre el cual la combinación de Coc+Caf indujo un fortalecimiento del comportamiento, y el mismo se asoció a respuestas específicas y diferenciales en el perfil de expresión de los genes analizados. El análisis génico realizado en relación al CPP, a diferencia de la sensibilización, se centró principalmente en IEGs. La expresión diferencial de algunos genes en el grupo tratado con la combinación de Coc+Caf se relacionó sobre todo a la exposición al ambiente previamente asociado con la droga y procesos de evocación de memoria. Esto coincide con los datos sobre la relevancia del NAc y mPFC en el aprendizaje asociado a recompensa, la atribución de saliencia al estímulo condicionado, y el sesgo atencional hacia el mismo (Berridge y Robinson 2016, Leeman y cols. 2014, Volkow y cols. 2019). Los cambios inducidos en estas regiones por ambos psicoestimulantes (cocaína y cafeína) son, por lo tanto, altamente dependientes del contexto.

Con estos experimentos, sumados al trabajo previo mencionado en los antecedentes de trabajo, confirmamos la acción potenciadora de la cafeína sobre varias fases claves del proceso adictivo: las acciones agudas, el consumo repetido, la motivación por la búsqueda e instauración del comportamiento del consumo, la sensibilización a acciones de la droga, y ahora también el condicionamiento asociado a recompensa. Todas estas etapas forman parte del ciclo adictivo descrito anteriormente, y pueden continuarse con la instalación de hábitos y progresar luego al uso compulsivo y adicción (ver Figura 4; Everitt 2014). El hecho de que la cafeína pueda ejercer su acción potenciadora en varias de estas etapas y procesos secuenciales, puede significar que la misma, de forma global, sea capaz de precipitar y propulsar el tránsito a través de las fases del ciclo adictivo. Esto puede tener consecuencias muy relevantes a nivel clínico, y ayudar a explicar en parte, la rápida dependencia de los consumidores de PBC.

La cafeína ejerce sus efectos, incluyendo las acciones facilitadoras descritas, mediante el antagonismo de los receptores adenosinérgicos A1 y A2A (Fredholm y cols. 1999). Por esto mismo, llama la atención que pese al gran impacto que tiene como adulterante a nivel comportamental y molecular, en ambos estudios de expresión génica realizados en esta Tesis, su efecto sobre los receptores adenosinérgicos fue menor o nulo. Es probable que las bajas dosis de cafeína utilizadas sean suficientes para potenciar la respuesta de la cocaína, pero no para alterar la expresión de este tipo de receptores. Esto sugiere que la potenciación en la sensibilización y condicionamiento inducido por la PBC adulterada con cafeína no se encuentra mediada por cambios en la abundancia de los receptores de adenosina. Resulta factible que sus acciones en la regulación de la señal DAérgica a nivel intracelular, y a través de la formación de heterómeros A1-D1 y A2A-D2, sean suficientes para potenciar los efectos de la cocaína (Ferré y Ciruela 2019, Ferré y cols. 2018b, Fisone y

cols. 2004). También vale la pena mencionar, considerando los resultados obtenidos, que se ha propuesto la existencia de heterómeros A2A-CB1 en las terminales glutamatérgicas cortico-estriatales que hacen sinapsis en las MSNs (Ferré y cols. 2010). Sumado a esto, recientemente un estudio *in vitro* comprobó que dichos heterómeros son capaces de regular la liberación de glutamato en el estriado, incluyendo el NAc (Köfalvi y cols. 2020). En este trabajo, además, la administración de un antagonista de A2A (SCH58261) contrarrestó alostéricamente la inhibición de la liberación de glutamato mediada por un agonista CB1 (Köfalvi y cols. 2020).

Las técnicas utilizadas en esta Tesis no permiten determinar si los heterómeros A2A-CB1 participan en los resultados observados. Pero aun así, nuestros datos sobre la acción de cafeína y el incremento en la expresión del receptor CB1 en el NAc, sugieren que es necesario considerar más en detalle la interacción entre el sistema adenosinérgico y sECB al estudiar la potenciación de la cafeína sobre el efecto reforzador de cocaína.

En cuanto a la transmisión DAérgica, brevemente, los resultados de los estudios de sensibilización y CPP señalan un rol preponderante del receptor D1 en el NAc, sobre los efectos inducidos por la combinación de Coc+Caf. Esto coincide con los datos reportados sobre la relevancia del receptor D1 en mediar los efectos de la cocaína en cuanto a su acción recompensante (Caine y cols. 2007), la sensibilización comportamental (Pierce y Kalivas 1997), la inducción de Fra-2 (Zhang y cols. 2002) y la expresión de IEGs en procesos de memoria (Li y cols. 2016). Nuevamente, se refuerza la idea de que los rápidos y fuertes efectos inducidos por la PBC adulterada con cafeína están mediados por mecanismos ya descritos para cocaína, pero reclutados de forma temprana, a bajas dosis y tratamientos más cortos.

Evaluación del CBD como potencial tratamiento para los efectos inducidos por PBC

Una segunda parte de esta Tesis se centró en evaluar la capacidad del CBD de atenuar el efecto potenciador de la cafeína en la sensibilización locomotora, con el fin de comenzar a indagar su potencial terapéutico para la dependencia a PBC.

Los resultados obtenidos demostraron que el pre-tratamiento con CBD fue capaz de prevenir la expresión del fenómeno de sensibilización en los animales tratados con el sucedáneo de PBC. Estos datos constituyen la primera evidencia pre-clínica que apoyaría el potencial propuesto de CBD como herramienta terapéutica para los consumidores de PBC. Los mismos adquieren particular relevancia en el contexto actual de alta demanda de asistencia y tratamientos para la dependencia a PBC (OUD 2017), junto con la exploración en marcha a nivel mundial del uso de cannabinoides para la adicción a drogas (Epstein 2019, Galaj y Xi 2019, Chye y cols. 2019). El alto perfil de seguridad de CBD (Taylor y cols. 2018), y el hecho de que ya se estén realizando

pruebas clínicas con esta sustancia (Epstein 2019), facilita la consideración traslacional de este y futuros estudios, especialmente para la disminución de la frecuencia e intensidad de las recaídas en el consumo de PBC.

La evidencia científica disponible sobre la eficacia del CBD para contrarrestar las acciones de drogas psicoestimulantes es inconsistente, con varios reportes señalando un efecto nulo sobre la sensibilización locomotora inducida por cocaína (Chye y cols. 2019, Gerdeman y cols. 2008, Luján y cols. 2018). Sin embargo, en el ensayo realizado en esta Tesis, el CBD fue efectivo en evitar la expresión de la sensibilización, asociada con efecto potenciador de la cafeína. Estos resultados pueden ayudar a comprender las condiciones experimentales bajo las cuales el CBD podría tener efectos beneficiosos para la dependencia a psicoestimulantes, y también refuerza la importancia de considerar a los adulterantes en el estudio de las acciones de drogas de abuso ilegales. Esto es muy importante, ya que a nivel pre-clínico, las drogas adictivas suelen estudiarse de forma aislada, si bien las mismas llegan al consumidor con distintos niveles de adulteración (Cole y cols. 2011, Pascale y cols. 2019). Es por esto que, a lo largo del desarrollo de esta línea de investigación, hemos hecho hincapié en la relevancia de incluir los adulterantes más frecuentes en los estudios de drogas de abuso ilegales. Como se refleja en los resultados de esta Tesis, la adulteración con cafeína es capaz de alterar los efectos de la PBC, facilitando procesos que forman parte del desarrollo adictivo. De la misma forma, el estudio de las acciones del CBD, considerando la presencia del adulterante cafeína, permitió reconocer una oportunidad terapéutica que quizás no hubiese estado disponible de haber considerado únicamente a la cocaína como componente activo principal de la PBC.

Además de evaluar el potencial del CBD sobre los efectos comportamentales de Coc+Caf, se analizó su acción sobre la actividad metabólica del NAc y mPFC asociada a la expresión de la sensibilización. De manera interesante, la sensibilización locomotora con Coc+Caf se acompañó de un incremento en la actividad metabólica en el NAc, y un descenso de la misma en la mPFC, pudiendo ambos efectos ser prevenidos con el pre-tratamiento con CBD.

Los efectos de la sensibilización con Coc+Caf en la marcación de la actividad de la enzima CO-I, como indicador endógeno de actividad metabólica neuronal, pueden dar la impresión de contradecirse con los datos de la expresión de *Fra-2*, obtenidos luego del mismo tratamiento y protocolo experimental. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la información que brinda la actividad de CO-I es muy diferente a la información basada en la expresión de IEGs como *c-fos* y *fra-2*, e incluso otros marcadores metabólicos como la 2-deoxiglucosa (Wong-Riley 1989). Mientras que los IEGs como *fra-2* se asocian a eventos evocados próximos, y reflejan la actividad neural en un rango de minutos o pocas horas, la CO-I refleja cambios a largo plazo en la capacidad metabólica neuronal, que se acumula a lo largo de varias horas a días (Hevner y cols. 1995, Wong-Riley 1989). La actividad global de la CO-I está

determinada principalmente por la abundancia de esta enzima en la mitocondria, y la expresión de la misma responde, a su vez, a los cambios en la actividad neural (Hevner y Wong-Riley 1993, Zhang y Wong-Riley 2000). De esta forma, la abundancia y actividad de la CO-I está estrechamente ligada a la demanda energética, aunque para evidenciar efectos apreciables por histoquímica son necesarios ajustes sustanciales en la actividad y cantidad de la enzima. Estos ajustes implican procesos de síntesis, degradación o modificación enzimática, por lo que requiere un tiempo mayor para consolidarse y evidenciarse que los IEGs (Hevner y Wong-Riley 1993, Wong-Riley 1989). Por esta razón, los cambios observados en el metabolismo regional cerebral por histoquímica de la CO-I, son interpretados a modo de cambios instaurados como consecuencia de protocolos o procesos particulares, más que la respuesta específica frente al estímulo previo a la colecta del tejido. Es así que, a nivel del comportamiento, se ha propuesto que los cambios en la actividad de CO-I pueden relacionarse más con diferencias en propensiones conductuales específicas generadas por una condición o tratamiento, que a comportamientos particulares (Sakata y cols. 2005). Esto aporta una dimensión muy relevante en relación a los resultados obtenidos, ya que, por ejemplo, la disminución de actividad metabólica en la mPFC generada por el tratamiento repetido con Coc+Caf puede relacionarse con una mayor propensión a comportamientos impulsivos asociados a la recompensa. Estos, a su vez, pueden facilitar y desencadenar una recaída (Perry y cols. 2011, Zilverstand y cols. 2018). Por lo tanto, los resultados de la actividad de Fra-2 y CO-I nos aportan información complementaria sobre los mecanismos detrás del mismo fenómeno, que operan en espacios temporales diferentes.

Los resultados de la actividad de CO-I en los animales sensibilizados con Coc+Caf concuerdan con lo reportado para tratamientos de sensibilización con cocaína a nivel pre-clínico (Vélez-Hernández y cols. 2014, Walker y Sevarino 1995). En particular, el aumento de CO-I en el NAc puede estar relacionado con el incremento sostenido de la señal glutamatérgica desde la mPFC que ocurre luego de la administración de la droga, asociada a la sensibilización (DosSantos y cols. 2018, Scofield y cols. 2016). Esta interpretación es apoyada por los datos de expresión génica repasados más arriba, y discutidos en el Artículo Científico 1 (Objetivo Específico 1.2), que señalan mecanismos de plasticidad glutamatérgica en el NAc luego del mismo tratamiento con PBC adulterada con cafeína.

Por otro lado, la hipofuncionalidad prefrontal inducida por cocaína se encuentra ampliamente reportada luego de tratamientos crónicos con cocaína y un período de abstinencia, tanto a nivel pre-clínico como en personas con dependencia a dicha droga (Gobin y cols. 2019, Kalivas y cols. 2005, Vélez-Hernández y cols. 2014, Zilverstand y cols. 2018). Es esperable que frente a una hipoactividad frontal disminuya la demanda metabólica de esta región, reflejado en la menor marcación de CO-I observada.

La funcionalidad reducida de la PFC inducida por el consumo repetido de drogas, se ha relacionado con el detrimento del control inhibitorio que caracteriza a la adicción (Zilverstand y cols. 2018). En el mismo sentido, la disminución del flujo sanguíneo en la PFC de roedores genera un escalado en la búsqueda de cocaína, y la instauración de un comportamiento de consumo del tipo compulsivo en el modelo de autoadministración intravenosa (Du y cols. 2018). El aumento de la transmisión DAérgica en la PFC como resultado de la administración crónica de cocaína tiene un rol importante en este fenómeno. En particular, se ha evidenciado que la activación del receptor D3 se asocia a una disminución del volumen sanguíneo cerebral en la PFC, y el subsiguiente debilitamiento del control inhibitorio (Chen y cols. 2011, Choi y cols. 2006). De manera interesante, en nuestros estudios observamos un marcado incremento en la expresión de receptores D3 en la mPFC de los animales sensibilizados con PBC con cafeína. Esto se complementa con la disminución de la actividad de CO-I observada en esta región, y sugiere que el receptor D3 puede tener un rol relevante en la potenciación del efecto reforzador de la cafeína.

El pre-tratamiento con CBD, por su parte, logró prevenir de manera significativa las alteraciones metabólicas descritas previamente, asociadas a la expresión de la sensibilización. Este resultado es muy relevante, ya que muestra que las acciones del CBD al evitar los efectos potenciadores de la cafeína a nivel comportamental, no están dados por una simple atenuación de la locomoción, sino que se asocian a un efecto protector sobre las adaptaciones metabólicas duraderas inducidas por Coc+Caf en regiones claves del circuito motivacional. Esta acción podría tener fuertes consecuencias a nivel de tratamiento, especialmente en el *craving* y el riesgo de recaídas. Esta afirmación se sustenta en un estudio de Chen y colaboradores (2013), en el cual comprueban que la estimulación optogenética de la mPFC de ratas expuestas a cocaína previene la búsqueda compulsiva de la droga, mientras que su inhibición, por el contrario, la potencia (Chen y cols. 2013). Dicho “rescate” o reversión de la hipoactividad de la PFC, es una estrategia que también se ha utilizado en humanos como tratamiento para la dependencia de sustancias. Existen reportes que indican que el uso de estimulación magnética transcraneana para estimular la PFC de personas con dependencia a cocaína, resultó en una reducción significativa del consumo y un mayor control sobre el *craving* durante la abstinencia (Bolloni y cols. 2016, Rapinesi y cols. 2016). Si bien estos ensayos en humanos son preliminares, la recuperación de la actividad de la PFC parece ser esencial en la recuperación de las personas con dependencia a psicoestimulantes, y nuestros datos pre-clínicos sugieren un potencial del CBD que podría contribuir en ese sentido.

Los mecanismos por los cuales el CBD logra prevenir la expresión de la sensibilización y las alteraciones en la actividad metabólica del NAc y mPFC son difíciles de establecer, principalmente por los múltiples sitios de acción y compleja farmacología de esta molécula. Por un lado, los datos de expresión génica obtenidos en esta Tesis sugieren

una participación importante del receptor CB1 en las acciones de la PBC adulterada con cafeína. CBD puede actuar como un modulador alostérico negativo del CB1 (Laprairie y cols. 2015), por lo que es posible que este receptor medie, al menos en parte, algunas de las acciones del CBD en la atenuación de los efectos de Coc+Caf. A su vez, además de los mecanismos ya discutidos en el Artículo Científico 3, CBD también puede actuar directamente sobre todos los complejos de la cadena de transporte de electrones, incluido el complejo IV (citocromo c oxidasa) (Busquets-García y cols. 2018, Singh y cols. 2015). La administración de CBD en ratas, tanto de forma aguda como repetida, es capaz de inducir un incremento en la actividad del complejo IV (Valvassori y cols. 2013). Sin embargo, es poco probable que esta acción tenga un rol preponderante los resultados observados, ya que la actividad de CO-I del grupo control pre-tratado con CBD no se distinguió del grupo control sin CBD. También, las acciones agudas sobre la CO-I se observaron sólo a dosis más altas (30 y 60 mg/kg frente a los 20 mg/kg utilizados aquí), y el tratamiento repetido constó de 14 días de tratamiento, mucho mayor a los 3 días del protocolo incluido en esta Tesis (Valvassori y cols. 2013). Es probable que varios mecanismos mediados por CBD estén actuando de forma simultánea en las acciones protectoras registradas. Por ejemplo, se ha propuesto que la capacidad del CBD para prevenir algunas neuroadaptaciones inducidas por psicoestimulantes, constituye uno de los mecanismos generales más importantes que subyacen a su utilidad para el tratamiento de la dependencia a este tipo de drogas (Calpe-López y cols. 2019). Esto se encuentra en sintonía con nuestros datos. Sin embargo, no podemos desconocer que el tratamiento repetido con cocaína (y con cafeína) podría generar procesos inflamatorios en el SNC (Bachi y cols. 2019, Periyasamy y cols. 2016, Sil y cols. 2019), por lo que las fuertes propiedades antiinflamatorias del CBD podrían participar de igual forma en la normalización de las alteraciones inducidas por psicoestimulantes (Batchell y cols. 2017, Calpe-López y cols. 2019). Van a ser necesarios otros estudios para identificar los mecanismos que subyacen a la acción atenuadora del CBD sobre el efecto potenciador de la Coc+Caf.

Si bien los resultados obtenidos son prometedores en relación al potencial terapéutico del CBD para atenuar algunas acciones del consumo de PBC, tanto nivel comportamental como funcional, este trabajo constituye un primer estudio inicial al respecto. Nuestros resultados promueven la investigación pre-clínica y clínica basada en CBD como tratamiento para el consumo de PBC, apoyándola como una opción factible de poseer eficacia real para las personas con dependencia a esta droga.

Tomados en conjunto, los hallazgos descritos en esta Tesis contribuyen a la comprensión de algunos mecanismos detrás de la contribución del adulterante cafeína a la rápida dependencia inducida por PBC, y propone un camino a explorar en la búsqueda de tratamientos seguros y eficaces para la dependencia a esta droga.

CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de esta Tesis permitió la obtención de las siguientes conclusiones generales:

- La cafeína, como adulterante, es capaz de facilitar y acelerar procesos comportamentales, así como neuroadaptaciones (celulares, moleculares y funcionales) en dos regiones claves del circuito motivacional, inducidas por tratamientos crónicos de cocaína. El rápido inicio e instauración de estos procesos, producto de la interacción farmacológica entre cocaína y cafeína, podría explicar en parte, la temprana y fuerte dependencia inducida por PBC.
- Los resultados obtenidos permitieron identificar el potencial terapéutico de CBD sobre un fenómeno asociado al desarrollo adictivo de la PBC.
- Los resultados de esta Tesis colaboran en la comprensión del rápido desarrollo de la adicción a PBC, y en comenzar a sentar las bases pre-clínicas para posibles ensayos clínicos con CBD como tratamiento para la dependencia en consumidores de PBC.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la presente Tesis dieron lugar a una serie de perspectivas, dentro de las que se destacan las siguientes:

- Nuestro estudio de la expresión génica asociada a la rápida sensibilización de PBC adulterada con cafeína, indicó mecanismos de plasticidad de naturaleza glutamatérgica. Sin embargo, en dicho estudio, de espectro amplio, se consideraron únicamente dos subunidades de receptores glutamatérgicos (una de receptores AMPA y otra de NMDA) dentro de la vasta diversidad receptores de glutamato, incluyendo los receptores de kainato y receptores metabotópicos. Distintas evidencias señalan que los receptores metabotrópicos de glutamato, en especial el mGluR5, tienen un rol importante en los efectos reforzadores de la cocaína (de Laat y cols. 2018, Li y cols. 2018). También se ha descrito que el tratamiento crónico con cocaína puede inducir un cambio en la composición de subunidades de los receptores ionotrópicos, alterando las propiedades de los mismos, y relacionándose con diferentes fenómenos del ciclo adictivo (Liu y cols. 2016, Smaga y cols. 2019). Nuestros resultados nos impulsan continuar con el estudio de las neuroadaptaciones asociadas al efecto potenciador de la cafeína, con un foco más específico y profundo en el sistema glutamatérgico, incluyendo distintas subunidades de los receptores ionotrópicos y a los receptores metabotrópicos.
- Habiendo observado un potencial efecto beneficioso del CBD sobre la facilitación de la cafeína a nivel comportamental, y sobre neuroadaptaciones a largo plazo en el circuito de recompensa, resulta interesante poner a prueba dicha acción en otros modelos. En particular, sería de gran interés evaluar su potencial terapéutico utilizando paradigmas comportamentales en los que ya tengamos evidencias previas de las acciones de Coc+Caf, y que permitieran, a su vez, estudiar de forma más precisa los comportamientos de búsqueda de droga, abstinencia y recaída. Un buen modelo para esto es la autoadministración intravenosa. Previamente hemos demostrado que la cafeína es capaz de potenciar la motivación por la búsqueda de droga, y también retrasar la extinción de la búsqueda durante la abstinencia (Prieto y cols. 2016). Sería interesante ver si el CBD puede evitar la acción potenciadora de la cafeína también en estos procesos.

- Es importante ahondar en los mecanismos detrás del efecto del CBD sobre la sensibilización inducida por Coc+Caf, para comprender el alcance de sus acciones protectoras. Como se describió anteriormente, uno de los mecanismos propuestos del potencial terapéutico del CBD para la dependencia a drogas es a través de su capacidad antiinflamatoria. Nos proponemos, por lo tanto, comenzar con el estudio del rol de este mecanismo en los efectos observados en nuestros experimentos. Para esto se realizará una caracterización de las vías de inflamación inducidas por la sensibilización de Coc+Caf, mediante el uso de RT2 Profiler PCR Arrays, y se evaluará el efecto del pre-tratamiento con CBD en las mismas. Cabe mencionar que estos experimentos se encuentran programados dentro de un Proyecto Fondo Clemente Estable modalidad II, por lo que los mismos constituyen la perspectiva más próxima a ser abordada por nuestro grupo de trabajo.

REFERENCIAS

- Abín-Carriquiry JA, Martínez-Busi M, Galvalisi M, Minteguiaga M, Prieto JP, Scorza C. (2018) Identification and quantification of cocaine and active adulterants in coca-paste seized samples: useful scientific support to health care. *Neurotoxicity Research*, 34:295-304
- Adamczyk P, Faron-Górecka A, Kusmider M, Dziejzicka-Wasylewska M, Papp M, Filip M. (2012) Long-lasting increase in [³H]CP55,940 binding to CB1 receptors following cocaine self-administration and its withdrawal in rats. *Brain Research*, 1451:34-43
- Anderson S, Pierce C. (2005) Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: Implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacology & Therapeutics*, 106:389– 403
- Anselme P. (2009) The effect of exposure to drugs on the processing of natural rewards. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33:314-335
- Anthony J, Warner L, Kessler R. (1994) Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: basic findings from the national comorbidity survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2:244-268
- APA, American Psychiatric Association. (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Arnold J. (2005) The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81:396-406
- Bachi K, Mani V, Kaufman A, Alie N, Goldstein R, Fayad Z, Alia-Klein N. (2019) Imaging plaque inflammation in asymptomatic cocaine addicted individuals with simultaneous positron emission tomography/magnetic resonance imaging. *World Journal of Radiology*, 11:62-73
- Bachtell R, Jones J, Heinzerling K, Beardsley P, Comer S. (2017) Glial and neuroinflammatory targets for treating substance use disorders. *Drug and Alcohol Dependence*, 180:156-170
- Baimel C, McGarry L, Carter A. (2019) The projection targets of medium spiny neurons govern cocaine-evoked synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Cell Reports*, 28:2256-2263

- Baker D, Fuchs R, Specio, Khroyan, Neisewander J. (1998) Effects of intraaccumbens administration of SCH-23390 on cocaine-induced locomotion and conditioned place preference. *Synapse*, 30:181–193
- Balik J. (2013) Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, 7:152
- Ballesteros-Yáñez I, Castillo C, Merighi S, Gessi S. (2018) The role of adenosine receptors in psychostimulant addiction. *Frontiers in Pharmacology*, 8:985
- Bardo M, Bevins R. (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153:31–43
- Barrenechea C, Mautone M, Triaca J, Míguez E, Pouy A, Blanco A, Vivas P, Rossi G. (2007) Programa nacional de atención a usuarios problemáticos de drogas. Montevideo: Ediciones Ministerio de Salud Pública-Junta Nacional de Drogas.
- Beaulieu M, Gainetdinov R (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63:182–217
- Bechara A, Berridge B, Bickel W, Morón J, Williams S, Stein J. (2019) A neurobehavioral approach to addiction: implications for the opioid epidemic and the psychology of addiction. *Psychological Science in the Public Interest*, 20:96-127
- Bedingfield J, King D, Holloway F. (1998) Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 61:291-296
- Bennet H, Semba K. (1998) Immunohistochemical localization of caffeine-induced c-Fos protein expression in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 401:89-108
- Berardino B, Fesser E, Belluscio L, Gianatiempo O, Pregi N, Cánepa E. (2019) Effects of cocaine base paste on anxiety-like behavior and immediate-early gene expression in nucleus accumbens and medial prefrontal cortex of female mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 236:3525-3539
- Berridge K, Kringelbach M. (2015) Pleasure systems in the brain. *Neuron*, 86:646–664
- Berridge K, Robinson T, Aldridge W. (2009) Dissecting components of reward: "liking", "wanting", and learning. *Current Opinion in Pharmacology*, 9:65-73
- Berridge K, Robinson T. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*, 28:309-369
- Berridge K, Robinson T. (2016) Liking, wanting and the incentive-sensitization theory of addiction. *American Psychologist*, 71:670–679

- Berridge K. (2017) Is Addiction a Brain Disease? *Neuroethics*, 10:29–33
- Bickel W, Mellis A, Snider S, Athamneh L, Stein J, Pope D. (2018). 21st century neurobehavioral theories of decision making in addiction: review and evaluation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 164:4–21
- Bisagno V, González B, Urbano F. (2016) Cognitive enhancers vs addictive psychostimulants: the good and bad side of dopamine on prefrontal cortical circuits. *Pharmacological Research*, 109:108-118
- Bolloni C, Panella R, Pedetti M, Frascella A, Gambelunghe C, Piccoli T, Maniaci G, Brancato A, Cannizzaro C, Diana M. (2016) Bilateral transcranial magnetic stimulation of the prefrontal cortex reduces cocaine intake: a pilot study. *Frontiers in Psychiatry*, 7:133
- Bromberg-Martin E, Matsumoto M, Hikosaka O. (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68:815-834
- Busquets-Garcia A, Bains J, Marsicano G. (2018) CB1 receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity. *Neuropsychopharmacology REVIEWS*, 43:4-20
- Bystrowska B, Frankowska M, Smaga I, Pomierny-Chamióło L, Filip M. (2018) Effects of cocaine self-administration and its extinction on the rat brain cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Neurotoxicity Research*, 34:547-558
- Caine S, Negus S, Mello N, Patel S, Bristow L, Kulagowski J, Vallone D, Saiardi A, Borrelli E. (2002). Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists. *Journal of Neuroscience*, 22:2977–2988
- Caine S, Thomsen M, Gabriel K, Berkowitz J, Gold L, Koob G, Tonegawa S, Zhang J, Xu M. (2007) Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 27:13140–13150.
- Calpe-López C, García-Pardo P, Aguilar M. (2019) Cannabidiol treatment might promote resilience to cocaine and methamphetamine use disorders: a review of possible mechanisms. *Molecules*, 24:2583
- Carboni E, Imerato A, Perezzi L, Di Chiara G. (1989) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience*, 28:653-661

- Carr D, Sesack S. (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 20: 3864–3873.
- Carrier E, Auchampach J, Hillard C. (2006) Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Science*, 103:7895-7900
- Casale J, Klein R. (1993) Illicit production of cocaine. *Forensic Science Review*, 5:95-107
- Castañó GA. (2000) Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones*, 12:541-550
- Castro D, Berridge K. (2014) Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness "liking" and "wanting". *Journal of Neuroscience*, 34:4239–4250
- Cauli O, Morelli M. (2002) Subchronic caffeine administration sensitizes rats to the motor-activating effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists. *Psychopharmacology*, 162:246-254
- Cauli O, Morelli M. (2005) Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology*, 16:63-77
- Cervo L, Samanin R. (1995) Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Research*, 673:242–250
- Chen B, Yau H, Hatch C, Kusumoto-Yoshida I, Cho S, Hopf F, Bonci A. (2013) Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature*, 496:359-362
- Chen Y, Famous K, Xu H, Choi J, Mandeville J, Schmidt H, Pierce C, Jenkins B. (2011) Cocaine self-administration leads to alterations in temporal responses to cocaine challenge in limbic and motor circuitry. *European Journal of Neuroscience*, 34:800-815
- Chichahual B, Vargas G, Duffau B, Ayala S. (2019) Cocaína base en Chile: 10 años de análisis. *Revista del Instituto de Salud Pública de Chile*, 3:24-33
- Choi J, Chen Y, Hamel E, Jenkins B. (2006) Brain hemodynamic changes mediated by dopamine receptors: Role of the cerebral microvasculature in dopamine-mediated neurovascular coupling. *Neuroimage*, 30:700-712
- Churchill L, Swanson C, Urbina M, Kalivas P. (1998) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *Journal of Neurochemistry*, 42:2397-2403

Chye Y, Christensen E, Solowij N, Yücel M. (2019) The endocannabinoid system and cannabidiol's promise for the treatment of substance use disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 10:63

Cleck J, Blendy J. (2008) Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *Journal of Clinical Investigation*, 118:454-461

Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q, Bellis M. (2010) *Cut: A Guide to Adulterants, Bulking Agents and Other Contaminants Found in Illicit Drugs*. Edición, Centre for Public Health Engagement Liverpool. Liverpool John Moores University.

Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q, Bellis M. (2011) Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Testing and Analysis*, 3:89-96

Collins G, Abbott M, Galindo K, Rush E, Rice K, France C. (2016) Discriminative stimulus effects of binary drug mixtures: studies with cocaine, MDPV, and caffeine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 359:1-10

Cornish J, Kalivas P. (2001) Cocaine sensitization and craving: differing roles for dopamine and glutamate in the nucleus accumbens. *Journal of Addictive Diseases*, 20:43-54

Covey D, Mateo Y, Sulzer D, Cheer J, Lovinger D. (2017) Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission. *Neuropharmacology*, 124:52-61

Creed M, Ntamati N, Chandra R, Lobo M, Lüscher C. (2016) Convergence of reinforcing and anhedonic cocaine effects in the ventral pallidum. *Neuron*, 92:214-226

Crombag H, Jedynak J, Redmond K, Robinson T, Hope B. (2002) Locomotor sensitization to cocaine is associated with increased Fos expression in the accumbens, but not in the caudate. *Behavioural Brain Research*, 136:455-462

Csete J, Kamarulzaman A, Kazatchkine M, Altice F, Balicki M, Buxton J, Cepeda J, Comfort M, Goosby E, Goulão J, Hart C, Kerr T, Madrazo A, Lewis S, Martin N, Mejía D, Camacho A, Mathieson D, Obot I, Ogunrombi A, Sherman S, Stone J, Vallath N, Vickerman P, Zábanský T, Beyrer C. (2016) Public health and international drug policy. *Lancet*, 387:1427–1480

D'Souza M, Duvauchelle C. (2006) Comparing nucleus accumbens and dorsal striatal dopamine responses to self-administered cocaine in naive rats. *Neuroscience Letters*, 408:146–150

Dalley J, Cardinal R, Robbins T. (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:771-784

- Daly J, Fredholm B. (1998) Caffeine - an atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 51:199-206
- De la Fuente A, Sedeño L, Schurmann S, Ellmann C, Sonzogni S, Belluscio L, García-Cordero I, Castagnaro E, Boano M, Cetkovich M, Torralva T, Cánepa E, Tagliazucchi E, Garcia A, Ibañez A. (2019) Multimodal neurocognitive markers of interoceptive tuning in smoked cocaine. *Neuropsychopharmacology*, 44:1425-1434
- de Laat B, Weerasekera A, Leurquin-Sterk G, Bormans G, Himmelreich U, Casteels C, Van Laere K. (2018) Glutamatergic biomarkers for cocaine addiction: a longitudinal study using MR spectroscopy and mGluR5 PET in self-administering rats. *Journal of Nuclear Medicine*, 59:952-959
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E. (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Current Opinion in Pharmacology*, 9:53-58
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza P. (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, 305:1014-1017
- Devinsky O, Cilio M, Cross H, Fernandez J, French J, Hill Ch, Katz R, Di Marzo V, Jutras-Aswad D, Notcutt W, Martinez J, Robson P, Rohrback B, Thiele E, Whalley B, Friedman D. (2014) Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55:791-802
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca M, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47:227-241
- Di Chiara G, Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85:5274-5278
- Di Pietro N, Black Y, Kantak K. (2006) Context-dependent prefrontal cortex regulation of cocaine self-administration and reinstatement behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*, 24:3285-3298
- Dos Santos M, Cahill E, Bo G, Vanhoutte P, Caboche J, Giros B, Heck N. (2018) Cocaine increases dopaminergic connectivity in the nucleus accumbens. *Brain Structure & Function*, 223:913-923
- Du C, Volkow N, You J, Park K, Allen C, Koob G, Pan Y. (2018) Cocaine-induced ischemia in prefrontal cortex is associated with escalation of cocaine intake in rodents. *Molecular Psychiatry*, doi:10.1038/s41380-018-0261-8

Dunning J, Parvaz M, Hajcak G, Maloney T, Alia-Klein N, Woicik P, Telang F, Wang G, Volkow N, Goldstein R. (2011) Motivated attention to cocaine and emotional cues in abstinent and current cocaine users--an ERP study. *European Journal of Neuroscience*, 33:1716-1723

ElSholy M, Brenneisen R, Jones A. (1991) Coca paste: chemical analysis and smoking experiments. *Journal of Forensic Sciences*, 36:93-103

Eltzschig H. (2009) Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology*, 111:904-915

Epstein D. (2019) Cannabidiol: not a cure-all, but a candidate for coping with cue-induced craving. *American Journal of Psychiatry*, 176:888-891

Everitt B, Robbins T. (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8:1481-1489

Everitt B, Robbins T. (2016) Drug addiction: updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annual Review of Psychology*, 67:23-50

Everitt B. (2014) Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories – indications for novel treatments of addiction. *European Journal of Neuroscience*, 40:2163–2182

Evrard I, Legleye S, Cadet-Tairou A. (2010) Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy*, 21:399-406

Fattore L, Spano M, Deiana S, Melis V, Cossu G, Fadda P, Fratta W. (2007) An endocannabinoid mechanism in relapse to drug seeking: a review of animal studies and clinical perspectives. *Brain Research Reviews*, 53:1-16

Ferrando R, Bocchino S, Barrachina A, Ferro A, Rodríguez J, Silveira A, Ventura R, Gioia A, López A, Langhain M, Cardoso A, Zurmendi P, Triaca J, Lago G. (2009). Alteraciones de la perfusión cerebral en consumidores activos de pasta base de cocaína. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 73:51-62

Ferré S, Bonaventura J, Zhu W, Hatcher-Solis C, Taura J, Quiroz C, Cai N, Moreno E, Casadó-Anguera V, Kravitz A, Thompson K, Tomasi D, Navarro G, Cordero A, Pardo L, Lluís C, Dessauer C, Volkow N, Casadó V, Ciruela F, Logothetis D, Zwillig D. (2018a) Essential control of the function of the striatopallidal neuron by pre-coupled complexes of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramers and adenylyl cyclase. *Frontiers in Pharmacology*, 9:243

Ferré S, Ciruela F. (2019) Functional and neuroprotective role of striatal adenosine A2A receptor heterotetramers. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 9:89-97

Ferré S, Díaz-Ríos M, Salamone J, Prediger R. **(2018b)** New developments on the adenosine mechanisms of the central effects of caffeine and their implications for neuropsychiatric disorders. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 8:121-131

Ferré S, Lluís C, Justinova Z, Quiroz C, Orru M, Navarro G, Canela E, Franco R, Goldberg S. **(2010)** Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *British Journal of Pharmacology*, 160:443-53

Ferré S. **(2008)** An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Neurochemistry*, 105:1067–1079

Ferré S. **(2010)** Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Alzheimer's Diseases*, 20:35-49

Filip M, Gołda A, Zaniewska M, McCreary A, Nowak E, Kolasiewicz W, Przegaliński E. **(2006)** Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. *Pharmacology Reports*, 58:806-19

Fischer B, Kuganesan S, Gallassi A, Malcher-Lopes R, van den Brink W, Wood E. **(2015)** Addressing the stimulant treatment gap: A call to investigate the therapeutic benefits potential of cannabinoids for crack-cocaine use. *International Journal of Drug Policy*, 26: 1177-82

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. **(2004)** Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:857-872

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. **(2004)** Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:857-872

Fitzgerald M, Mackie K, Pickel V. **(2019)** Ultrastructural localization of cannabinoid CB1 and mGluR5 receptors in the prefrontal cortex and amygdala. *Journal of Comparative Neurology*, 527:2730-2741

Flagel S, Watson S, Akil H, Robinson T. **(2008)** Individual differences in the attribution of incentive salience to a reward-related cue: influence on cocaine sensitization. *Behavioural Brain Research*, 186:48-56

Floresco S. **(2014)** The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annual Review of Psychology*, 66:25-52

Folleta V. **(1996)** Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. *Immunology and Cell Biology*, 74:121-133

Franklin T, Druhan J. (2000) Expression of Fos-related antigens in the nucleus accumbens and associated regions following exposure to cocaine-paired environment. *European Journal of Neuroscience*, 12:2097-2106

Fredholm B, Battig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau E. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51:83-133

Fredholm B. (1995) Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacology and Toxicology*, 76:93-101

Fredholm B. (2010) Adenosine receptors as drug targets. *Experimental Cell Research*, 316:1284-1288

Freisthler B, Gruenewald P, Johnson F, Treno A, Lascaia E. (2005) An exploratory study examining the spatial dynamics of illicit drug availability and rates of drug use. *Journal of Drug Education*, 35:15–27

Fritz M, El Rawas R, Salti A, Klement S, Bardo M, Kemmler G, Dechant G, Saria A, Zernig G. (2011) Reversal of cocaine-conditioned place preference and mesocorticolimbic Zif268 expression by social interaction in rats. *Addiction Biology*, 16:273–284

Fukushima A, Carvalho V, Carvalho D, Diaz E, Bustillos J, Spinosa H, Chasin A. (2014) Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. *Forensic Science International*, 243:95–98

Galaj E, Xi Z. (2019) Potential of cannabinoid receptor ligands as treatment for substance use disorders. *CNS Drugs*, 33:1001-1030

Galéra C, Rossi G, Meneghetti X, Choca F, Salmi L, Bouvard M, Viola L. (2013) Síntomas psiquiátricos asociados al consumo de pasta base de cocaína en niños y adolescentes: un estudio exploratorio en Montevideo, Uruguay. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 51:263-270

Galvalisi M, Prieto JP, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. (2017) 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*, 31:90-98

Gao W, Krimer L, Goldman-Rakic P. (2001) Presynaptic regulation of recurrent excitation by D1 receptors in prefrontal circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:295-300

Gasior M, Jaszyna M, Peters J, goldberg S. (2000) Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically

exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295:1101-1111

Gerdeman G, Schechter J, French E. (2008) Context-specific reversal of cocaine sensitization by the CB1 cannabinoid receptor antagonist rimonabant. *Neuropsychopharmacology*, 33:2747-59

Girault J. (2012) Integrating neurotransmission in striatal medium spiny neurons. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970:407-429

Gobin C, Shallcross J, Schwendt M. (2019) Neurobiological substrates of persistent working memory deficits and cocaine-seeking in the prelimbic cortex of rats with a history of extended access to cocaine self-administration. *Neurobiology of Learning and Memory*, 161:92-105

Goeders N, Smith J. (1993) Intracranial cocaine self-administration into the medial prefrontal cortex increases dopamine turnover in the nucleus accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265:592–600

Goldman-Rakic P, Muly E, Williams G. (2000) D1 receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Research Reviews*, 31:295-301

Goldstein R, Volkow N. (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, 159:1642-1652

Goldstein R, Volkow N. (2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nature Reviews Neuroscience*, 12:652-669

Gonzalez-Cuevas G, Martin-Fardon R, Kerr T, Stouffer D, Parsons L, Hammell D, Banks S, Stinchcomb A, Weiss F. (2018) Unique treatment potential of cannabidiol for the prevention of relapse to drug use: preclinical proof of principle. *Neuropsychopharmacology*, 43:2036-2045

Gossop M, Griffiths P, Powis B, Strang J. (1992) Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. *British Journal of Addiction*, 87:1527-1536

Gourley S, Taylor J. (2016) Going and stopping: dichotomies in behavioral control by the prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 19:656-664

Gouveia K, Hurst J. (2017) Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. *Scientific Reports*, 7:44999

Grabus S, Martin B, Brown S, Damaj M. (2006) Nicotine place preference in the mouse: influences of prior handling, dose and strain and attenuation by nicotinic receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*, 184:456-463

Grace J, Malloy P. (2001) Frontal Systems Behavior Scale (FrSBe): professional manual. Lutz, FL: Psychological Assessment Resources

Green T, Schenk S. (2002) Dopaminergic mechanism for caffeine-produced cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, 26:422-430

Hatsukami D, Fischman M. (1996) Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *Journal of the American Medical Association*, 276:1580-1588

Hervig M, Thomsen M, Kalló I, Mikkelsen J. (2016) Acute phencyclidine administration induces c-Fos-immunoreactivity in interneurons in cortical and subcortical regions. *Neuroscience*, 334:13-25

Hevner R, Liu S, Wong-Riley M. (1995) A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical, densitometric and biochemical studies. *Neuroscience*, 65:313-342

Hevner R, Wong-Riley M. (1993) Mitochondrial and nuclear gene expression for cytochrome oxidase subunits are disproportionately regulated by functional activity in neurons. *Journal of Neuroscience*, 13:1805-1819

Horger B, Wellman P, Morien A, Davies B, Schenk S. (1991) Caffeine exposure sensitizes rats to the reinforcement effects of cocaine. *NeuroReports*, 53:53-56

Huang Y, Simpson E, Kellendonk C, Kandel E. (2004) Genetic evidence for the bidirectional modulation of synaptic plasticity in the prefrontal cortex by D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:3236-3241

Hynes M, Raverta, C, Chasin A, Duffau B, Barboza F, Scorza C, Cumsille F. (2016). Análisis de la caracterización química de cocaínas fumables: Compendio subregional. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD) - Observatorio Interamericano de Drogas (OID). Organización de los Estados Americanos (OEA).

Ikegami A, Duvauchelle C. (2004) Nucleus accumbens and medial prefrontal cortex dopaminergic response to self-administered cocaine in naive rats. *Neuroscience Letters*, 354:205–208

Ito R, Dalley J, Howes S, Robbins T, Everitt B. (2000) Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *Journal of Neuroscience*, 20:7489-7495

- Ito R, Dalley J, Robbins T, Everitt B. (2002) Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behaviour under the control of a drug-associated cue. *Journal of Neuroscience*, 22:6247-6253
- Janero D, Makriyannis A. (2007) Targeted modulators of the endogenous cannabinoid system: future medications to treat addiction disorders and obesity. *Current Psychiatry Reports*, 9:365-373
- Jaworski J, Jones D. (2006) The role of CART in the reward/reinforcing properties of psychostimulants. *Peptides*, 27:1993–2004
- Jeri F, Sanchez C, del Pozo T, Fernández M, Carbajal C. (1978) Further experience with the syndromes produced by coca paste smoking. *Bulletin on Narcotics*, 30:1-11
- Jeri F. (1984) Coca-paste smoking in some Latin American countries: a severe and unabated form of addiction. *Bulletin on Narcotics*, 36:15-31
- Johansson B, Lindström, Fredholm B. (1994) Differences in the regional and cellular localization of c-fos messenger RNA induced by amphetamine, cocaine and caffeine in the rat. *Neuroscience*, 59:837-49
- Kalivas P, Duffy P, DuMars L, Skinner C. (1988) Neurochemical and behavioral effects of acute and daily cocaine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 245:485-492
- Kalivas P, Duffy P. (1993) Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *Journal of Neuroscience*, 13:266-275
- Kalivas P, Stewart J. (1991) Dopamine transmission in drug- and stress-induced behavioral sensitization. *Brain Research Reviews*, 16:223-244
- Kalivas P, Volkow N. (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, 162:1404-1413
- Kalivas P. (2004) Recent understanding in the mechanisms of addiction. *Current Psychiatry Reports*, 6:347-351
- Kalivas P. (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 10:561–572
- Kalivas PW, Volkow N, Seamans J. (2005) Unmanageable motivation in addiction: minireview. A pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron*, 45:647–650

- Kapitán M, Farro I, Negrin A, Lujambio M, Zócalo Y, Pan M, Langhain M, Florio L, Pascale A, García V, Moreira G, Ferrando R, Bia D. (2014) El consumo crónico de clorhidrato y/o pasta base de cocaína asocia envejecimiento arterial prematuro y aumento del riesgo cardiovascular. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 29:299-310
- Kauer J, Malenka R. (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 8:844-858
- Khoddam R, Cho J, Jackson N, Leventhal A. (2018) Diminished alternative reinforcement as a mechanism linking conduct problems and substance use in adolescence: a longitudinal examination. *Addiction*, 113:1139-1148
- Kleven M, Perry B, Woolverton W, Seiden L. (1990) Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain. *Brain Research*, 532:265-270
- Klous M, Lee W, Hillebrand M, Van Den Brink W, Van Ree J, Beijnen J. (2006) Analysis of diacetylmorphine, caffeine, and degradation products after volatilization of pharmaceutical heroin for inhalation. *Journal of Analytical Toxicology*, 30:6-13
- Köfalvi A, Moreno E, Cordoní A, Cai N, Fernández-Dueñas V, Ferreira S, Guixà-González R, Sánchez-Soto M, Yano H, Casadó-Anguera V, Cunha R, Sebastião A, Ciruela F, Pardo L, Casadó V, Ferré S. (2020) Control of glutamate release by complexes of adenosine and cannabinoid receptors. *BMC Biology*, 18:9
- Koob G, LeMoal M. (2008) Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology*, 59:29-53
- Koob G, Mason B. (2016) Existing and future drugs for the treatment of the dark side of addiction. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56:299-322
- Koob G, Simon E. (2009) The neurobiology of addiction: where we have been and where we are going. *Journal of Drug Issues*, 39:115-132
- Koob G, Volkow N. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35:217-238
- Koob G, Volkow N. (2016) Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*, 3:760-773
- Kovács KJ. (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20:665-672
- Kuczenski R, Segal D, Aizenstein M. (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamafine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *Journal of Neuroscience*, 11:2703-2712

- Kuhar M, Pilotte N. (1996) Neurochemical changes in cocaine withdrawal. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 17:260-264
- Kuhar M. (2016) CART peptides and drugs of abuse: a review of recent progress. *Journal of Drug and Alcohol Research*, 5:235984
- Kuribara H. (1994) Modification by caffeine of the sensitization to methamphetamine and cocaine in terms of ambulation in mice. *Life Sciences*, 55:933-940
- Labigalini E, Rodrigues L, Da Silveira D. (1999) Therapeutic use of cannabis by crack addicts in Brazil. *Journal of Psychoactive Drugs*, 31:451-455
- Laprairie R, Bagher A, Kelly M, Denovan-Wright E. (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 172:4790-805
- Larson E, Akkentli F, Edwards S, Graham D, Simmons D, Alibhai I, Nestler E, Self D. (2010) Striatal regulation of Δ FosB, FosB, and cFos during cocaine self-administration and withdrawal. *Journal of Neurochemistry*, 115:112-122
- Larson T, O'Neill C, Palumbo M, Bachtell R. (2018) Effects of adolescent caffeine consumption on cocaine self-administration and reinstatement of cocaine seeking. *Journal of Psychopharmacology*, 00:1-13 (published online)
- Le Moine C, Bloch B. (1996) Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience*, 73:131-143
- Leeman R, Robinson C, Waters A, Sofuoglu M. (2014) A critical review of the literature on attentional bias in cocaine use disorder and suggestions for future research. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 22:469-83
- Lerner T, Honre E, Stella N, Kreitzer A. (2010) Endocannabinoid signaling mediates psychomotor activation by adenosine A2A antagonists. *Journal of Neuroscience*, 30:2160-2164
- Letts J, Sazanov L. (2017) Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24:800-808
- Li X, Peng X, Jordan C, Li J, Bi G, He Y, Yang H, Zhang H, Gardner E, Xi Z. (2018) mGluR5 antagonism inhibits cocaine reinforcement and relapse by elevation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens via a CB1 receptor mechanism. *Scientific Reports*, 8:3686

Li Y, Acerbo M, Robinson T. (2004) The induction of behavioural sensitization is associated with cocaine-induced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 20:1647-1654

Li Y, Ge S, Li N, Chen L, Zhang S, Wang J, Wu H, Wang X, Wang X. (2016) NMDA and dopamine D1 receptors within NAc-shell regulate IEG proteins expression in reward circuit during cocaine memory reconsolidation. *Neuroscience*, 315:45-69

Liu K, Steketee J. (2016) The role of adenylyl cyclase in the medial prefrontal cortex in cocaine-induced behavioral sensitization in rats. *Neuropharmacology*, 111:70-77

Liu X, Chen Y, Tong J, Reynolds A, Proudfoot S, Qi J, Penzes P, Lu Y, Liu Q. (2016) Epac signaling is required for cocaine-induced change in AMPA receptor subunit composition in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 36:4802-4815

Liu Y, Chen G, Lerner M, Brackett D, Matsumoto R. (2005) Cocaine up-regulates fra-2 and σ -1 receptor gene and protein expression in brain regions involved in addiction and reward. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314:770-779

Liu Y, Matsumoto R. (2008) Alterations in Fos-related antigen 2 and σ 1 receptor gene and protein expression are associated with the development of cocaine-induced behavioral sensitization: time course and regional distribution studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327:187-195

Lizasoain I, Moro M, Lorenzo P. (2002) Cocaína, aspectos farmacológicos. *Adicciones*, 14:57-64

Lobo M, Nestler E. (2011) The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5:41

Lodge D, Grace A. (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:5167-5172

López-Hill X, Prieto JP, Meikle M, Urbanavicius J, Prunell J, Abín-Carriquiry JA, Umpiérrez E, Scorza C. (2011) Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behavioural Brain Research*, 221:134-141

Luján M, Castro-Zavala A, Alegre-Zurano L, Valverde O. (2018) Repeated cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 143:163-175

Mahmud A, Gallant S, Sedki F, D'Cunha T, Shalev U. (2016) Effects of an acute cannabidiol treatment on cocaine self-administration and cue-induced cocaine seeking in male rats. *Journal of Psychopharmacology*, 31:96-104

Marcellino D, Ferré S, Casado V, Cortes A, Le Foll B, Mazzola C, Drago F, Saur O, Stark H, Soriano A, Barnes C, Goldberg S, Lluís C, Fuxe K, Franco R. (2008). Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *Journal of Biological Chemistry*, 283:26016-26025

Marcellino D, Roberts D, Navarro G, Filip M, Agnati L, Franco R, Fuxe K. (2007) Increase in A2A receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal. *Brain Research*, 1143:208-220

Marinho E, Oliveira-Lima A, Yokoyama T, Santos-Baldaia R, Ribeiro L, Baldaia M, da Silva R, Hollais A, Talhati F, Longo B, Berro L, Frussa-Filho R. (2017) Post-sensitization treatment with rimonabant blocks the expression of cocaine-induced behavioral sensitization and c-Fos protein in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 156:16-23

Martín A, Fernandez-Espejo E, Ferrer B, Gorriti M, Bilbao A, Navarro M, Rodriguez F, Moratalla R. (2008) Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 33:1667-1679

Martín-García E, Bourgoïn L, Cathala A, Kasanetz F, Mondesir M, Gutiérrez-Rodríguez A, Reguero L, Fiancette J, Grandes P, Spampinato U, Maldonado R, Piazza PV, Marsicano G, Deroche-Gamonet V. (2016) Differential control of cocaine self-administration by GABAergic and glutamatergic CB1 cannabinoid receptors. *Neuropsychopharmacology*, 41:2192-2205

McClung C, Nestler E. (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and Δ FosB. *Nature Neuroscience*, 6:1208-1215

McCoy M, Jayanthi S, Wulu J, Beauvais G, Ladenheim B, Martin T, Krasnova I, Hodges A, Cadet JL. (2011) Chronic methamphetamine exposure suppresses the striatal expression of members of multiple families of immediate early genes (IEGs) in the rat: normalization by an acute methamphetamine injection. *Psychopharmacology (Berl)*, 215:353-365

McDougall S, Charntikov S, Cortez AM, Amodeo D, Martinez C, Crawford C. (2009) Persistence of one-trial cocaine-induced behavioral sensitization in young rats: regional differences in Fos immunoreactivity. *Psychopharmacology (Berl)*, 203:617-628

- McFarland K, Kalivas P. (2001) The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *Journal of Neuroscience*, 21:8655-8663
- McGregor I, Atrens D, Jackson D. (1992). Cocaine facilitation of prefrontal cortex self-stimulation: a microstructural and pharmacological analysis. *Psychopharmacology (Berl)*, 106:239–247
- Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. (1998) Endocannabinoids. *European Journal of Pharmacology*, 359:1-18
- Mechoulam R, Parker L. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual Review of Psychology*, 64:21-47
- Meikle M, Urbanavicius J, Prunell G, Umpiérrez E, Abín-Carriquiry JA, Scorza C. (2009) Primer estudio pre-clínico de la acción de pasta base de cocaína en el sistema nervioso central. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 73:25-36
- Melis M, Pistis M. (2012) Hub and switches: endocannabinoid signalling in midbrain dopamine neurons. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367:3276-3285
- Meye F, Lecca S, Valentinova K, Mameli M. (2013) Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7:860
- Miller C, Marshall J. (2005) Altered Fos expression in neural pathways underlying cue-elicited drug seeking in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 21:1385–1393
- Misra A, Vadlamani N, Pontani R. (1986) Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24:761-764
- Moorman D, James M, McGlinchey E, Aston-Jones G. (2015) Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. *BrainResearch*, 1628:130-146
- Moraes M, Scorza C, Abín-Carriquiry A, Pascale A, González G, Umpiérrez 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
- Moraes M. (2014) Diez años de investigación en pasta base de cocaína en Uruguay. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 85:147-148
- Mostofsky S, Simmonds D. (2008) Response inhibition and response selection: two sides of the same coin. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 20:751-761
- Mueller D, Stewart J. (2000) Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioural Brain Research*, 115:39–47

Muñiz J, Gomez G, González B, Rivero-Echeto MC, Cadet JL, García-Rill E, Urbano F, Bisagno V (2016) Combined effects of simultaneous exposure to caffeine and cocaine in the mouse striatum. *Neurotoxicity Research*, 29:525–538

Naqvi N, Bechara A. (2010) The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making. *Brain Structure & Function*, 214:435-50

National Research Council (US) Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research (2003). Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. Washington, DC: National Academies Press.

Nehlig A, Boyet S. (2000) Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. *Brain Research*, 858:71-77

Nestler E, Barrot M, Self D. (2001) Δ FosB: A sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 20:11042-11046

Nestler E. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 2:119–128

Nestler E. (2012) Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 10:136-143

Nieh E, Vander-Weele C, Matthews G, Presbrey K, Wichmann R, Leppla C, Izadmehr E, Tye K. (2016) Inhibitory input from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area disinhibits dopamine neurons and promotes behavioral activation. *Neuron*, 90:1286-1298

Nomikos G, Spyraiki C. (1988) Cocaine-induced place conditioning: importance of route of administration and other procedural variables. *Psychopharmacology*, 94:119-125

Nona C, Hendershot C, Lê A. (2018) Behavioural sensitization to alcohol: Bridging the gap between preclinical research and human models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 173:15-26

Nutt D, King L, Phillips L. (2010) Drug harms in the UK: A multicriteria decision analysis. *Lancet*, 376:1558–1565

Nye H, Hope B, Kelz M, Iadarola M, Nestler E. (1995) Pharmacological studies of the regulation of chronic FOS-related antigen induction by cocaine in the striatum and nucleus accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275:1671-80

Nygaard S, Klambatsen A, Balouch B, Quinones-Jenab V, Jenab S. (2015) Region and context-specific intracellular responses associated with cocaine-induced conditioned place preference expression. *Neuroscience*, 287:1-8

O'Brien C, Gardner E. (2005) Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models. *Pharmacology & Therapeutics*, 108:18-58

O'Brien C. (1998) Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *Journal of Psychopharmacology*, 12:15-22

Olney J, Warlow S, Naffziger E, Berridge K. (2018) Current perspectives on incentive salience and applications to clinical disorders. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 22:59–69

ODU, Observatorio Uruguayo de Drogas. (2007) Pasta Base de Cocaína. Prácticas y gestión de riesgos en adolescentes uruguayos. ODU - Junta Nacional de Drogas. Presidencia de la República.

ODU, Observatorio Uruguayo de Drogas. (2012) 5ta encuesta nacional en hogares sobre consumo de drogas. ODU - Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República.

ODU, Observatorio Uruguayo de Drogas. (2013) Ocho diagnósticos locales sobre la problemática del consumo de drogas en Montevideo y zona metropolitana. ODU - Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República.

ODU, Observatorio Uruguayo de Drogas. (2014) Pasta base de cocaína en Uruguay. Compilación. ODU - Junta Nacional de Drogas

ODU, Observatorio Uruguayo de Drogas. (2016) VI encuesta nacional en hogares sobre consumo de drogas. ODU - Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República.

ODU, Observatorio Uruguayo de Drogas. (2017) La atención y tratamiento de usuarios problemáticos de cocaínas fumables en Uruguay: situación y perspectivas. ODU - Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República.

Park W, Bari A, Jey A, Anderson S, Spealman R, Rowlett J, Pierce R. (2002) Cocaine administered into the medial prefrontal cortex reinstates cocaine-seeking behavior by increasing AMPA receptor-mediated glutamate transmission in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 22:2916–2925

Parker L, Burton P, Sorge RE, Yakiwchuk C, Mechoulam R. (2004) Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 175:360-6

Parsons L, Hurd Y. (2015) Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 16:579-594

Pascale A, da Matta A, Giancotti N, Pose F, Hynes M. (2019) Adulterantes de las drogas y sus efectos en la salud de los usuarios: una revisión crítica. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD) - Organización de los Estados Americanos (OEA).

Pascale A, Hynes M, Cumsille F, Bares C. (2014) Consumo de pasta base de cocaína en América del Sur: revisión de los aspectos epidemiológicos y médico-toxicológicos. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas. Organización de los Estados Americanos.

Pascale A, Negrin A, Laborde A. (2010) Pasta base de cocaína: experiencia del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico. *Adicciones*, 22:227-232

Paxinos G, Watson C. (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th edition, Elsevier, Academic Press.

Peng Q, Sun X, Liu Z, Yang J, Oh K, Hu Z. (2014) Microinjection of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide into the nucleus accumbens inhibits the cocaine-induced upregulation of dopamine receptors and locomotor sensitization. *Neurochemistry International*, 75:105-111

Pérez J. (2003) Clínica de la adicción a pasta base de cocaína. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 41:55-63

Periyasamy P, Guo M, Buch S. (2016) Cocaine induces astrocytosis through ER stress-mediated activation of autophagy. *Autophagy*, 12:1310-1329

Perry J, Joseph J, Jiang Y, Zimmerman R, Kelly T, Darna M, Huettl P, Dwoskin L, Bardo M. (2011) Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: translation to prevention and treatment interventions. *Brain Research Reviews*, 65:124-149

Pertwee R. (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153:199-215

Peters J, LaLumiere R, Kalivas P. (2008) Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *Journal of Neuroscience*, 28:6046-6053

Peters K, Oleson E, Cheer J. (2020) A brain on cannabinoids: the role of dopamine release in reward seeking and addiction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a039305

Pierce C, Bell K, Duffy P, Kalivas P. (1996) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *Journal of Neuroscience*, 16: 1550-1560

Pierce C, Kalivas P. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 25:192-216

Pierce Ch, Kumaresan V. (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30:215-238

Pisanti S, Malfitano A, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, Abate M, Faggiana G, Proto M, Fiore D, Laezza C, Bifulco M. (2017) Cannabidiol: state of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology and Therapeutics*, 175:133-150

Prieto JP. (2015) Estudio pre-clínico de los factores implicados en la dependencia a pasta base de cocaína. Rol de la cafeína como principal adulterante. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/6433>

Prieto JP, Galvalisi M, López-Hill X, Meikle MN, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. (2015) Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *American Journal on Addictions*, 24:475-481

Prieto JP, Meikle M, López-Hill X, Urbanavicius J, Abin-Carriquiry A, Prunell G, Scorza M. (2012) Relevancia del adulterante activo cafeína en la acción estimulante de la pasta base de cocaína. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 76:35-48

Prieto JP, Scorza C, Serra GP, Perra V, Piras G, Galvalisi M, Abín-Carriquiry JA, Valentini V. (2016) Cocaine motivational value is enhanced when co-administered with caffeine: relevance of adulterants in reinforcement. *Psychopharmacology*, 233:2879-2889

Prud'homme M, Cata R, Jutras-Aswad D. (2015) Cannabidiol as an intervention for addictive behaviors: a systematic review of the evidence. *Substance Abuse: Research and Treatment*, 9:33-38

Puig S, Marie N, Benturquia N, Noble F. (2014) Influence of cocaine administration patterns on dopamine receptor regulation. *Psychopharmacology*, 231:3131-3137

- Puig S, Noble F, Benturquia N. (2012) Short- and long-lasting behavioral and neurochemical adaptations: relationship with patterns of cocaine administration and expectation of drug effects in rats. *Translational Psychiatry*, 2:e175
- Rapinesi C, Del Casale A, Di Pietro S, Ferri V, Piacentino D, Sani G, Raccach R, Zangen A, Ferracuti S, Vento A, Angeletti G, Brugnoli R, Kotzalidis G, Girardi P. (2016) Add-on high frequency deep transcranial magnetic stimulation (dTMS) to bilateral prefrontal cortex reduces cocaine craving in patients with cocaine use disorder. *Neuroscience Letters*, 629:43-47
- Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafai R, Khaku A, Mondello S, Gold M, Kobeissy F. (2013) An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience*, 240:204-218
- Regier P, Claxton A, Zlebnik N, Carroll M. (2014) Cocaine-, caffeine-, and stress-evoked cocaine reinstatement in high vs. low impulsive rats: treatment with allopregnanolone. *Drug and Alcohol Dependence*, 143:58-64
- Renard J, Loureiro M, Rosen L, Zunder J, de Olivera C, Schmid S. (2016) Cannabidiol counteracts amphetamine-induced neuronal and behavioral sensitization of the mesolimbic dopamine pathway through a novel mTOR/p70S6 kinase signaling pathway. *Journal of Neuroscience*, 36:5160-5169
- Renthal W, Carle T, Maze I, Covington H, Truong H, Alibhai I, Kumar A, Montgomery R, Olson E, Nestler E. (2008) Delta FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. *Journal of Neuroscience*, 28:7344-7349
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni O. (2001) Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 21:109-116
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni O. (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99:8384-8388
- Robinson A, Nestler E. (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 12:623-637
- Robinson T, Berridge K. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18:247-291
- Robinson T, Berridge K. (2008) The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*, 363:3137-3146

- Robinson T, Kolb B. (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47:33-46
- Rodriguez-Espinosa N, Fernandez-Espejo E. (2015) Effects of acute and repeated cocaine on markers for neural plasticity within the mesolimbic system in rats. *Neuropsychopharmacology*, 232:57-62
- Rosen J, Chuang E, Iadarola M. (1994) Differential induction of Fos protein and a Fos-related antigen following acute and repeated cocaine administration. *Molecular Brain Research*, 25:168-72
- Russo E, Burnett A, Hall B, Parker K. (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochemical Research*, 30:1037-1043
- Russo S, Dietz D, Dumitriu D, Morrison J, Malenka R, Nestler E. (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in Neurosciences*, 33:267-276
- Sabogal J, Urrego J. (2012) Composición química de muestras de bazuco incautado en Colombia primer semestre de 2010. *Revista de Salud Pública*, 14:1014-1025
- Saint-Preux F, Bores LR, Tulloch I, Ladenheim B, Kim R, Thanos P, Volkow N, Cadet JL. (2013) Chronic co-administration of nicotine and methamphetamine causes differential expression of immediate early genes in the dorsal striatum and nucleus accumbens. *Neuroscience*, 243:89-96
- Sakata J, Crews D, Gonzalez-Lima F. (2005) Behavioral correlates of differences in neural metabolic capacity. *Brain Research Reviews*, 48:1-15
- Sam A, Salem V, Ghatei MA. (2011) Rimonabant: From RIO to Ban. *Journal of Obesity*, 432607
- Samaha A, Robinson T. (2005) Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 26:82-87
- Savica R, Benarroch E. (2013) Dopamine receptor signaling in the forebrain: recent insights and clinical implications. *Neurology*, 83:758-767
- Schenk S, Horger B, Snow S. (1990) Caffeine preexposure sensitizes rats to the motor activating effects of cocaine. *Behavioral Pharmacology*, 1:447-451
- Schenk S, Valadez A, Horger B, Snow S, Wellman P. (1994) Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration. *Behavioural Pharmacology*, 5:153-158.

- Schenk S, Worley C, McNamara C, Valadez A. (1996) Acute and repeated exposure to caffeine: effects on reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 126:17-23
- Schultz W (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36:241-263
- Schwarzkopf N, Lagos P, Falconi A, Scorza C, Torterolo P. (2018) Caffeine as an adulterant of coca paste seized samples: preclinical study on the rat sleep-wake cycle. *Behavioral Pharmacology*, 29:519-529
- Scofield M, Heinsbroek J, Gipson C, Kupchik Y, Spencer S, Smith A, Roberts-Wolfe D, Kalivas P. (2016) The nucleus accumbens: mechanisms of addiction across drug classes reflect the importance of glutamate homeostasis. *Pharmacological Reviews*, 68:816-871
- Seeman P. (2016) Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Translational Psychiatry*, 6:e920
- Sellings L, McQuade L, Clarke P. (2006) Evidence for multiple sites within rat ventral striatum mediating cocaine-conditioned place preference and locomotor activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317:1178–1187
- Sesack S, Grace A. (2010) Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35:27-47
- Seymour C, Wagner J. (2008) Simultaneous expression of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in individual rats. *Brain Research*, 1213:57-68
- Shinohara F, Kamii H, Minami M, Kaneda K. (2017) The role of dopaminergic signaling in the medial prefrontal cortex for the expression of cocaine-induced conditioned place preference in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40:1983–1989
- Sil S, Niu F, Tom E, Liao K, Periyasamy P, Buch S. (2019) Cocaine mediated neuroinflammation: role of dysregulated autophagy in pericytes. *Molecular Neurobiology*, 56:3576-3590
- Simola N, Cauli O, Morelli M. (2006) Sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine: Influence of individual response to caffeine. *Behavioural Brain Research*, 172:72-79
- Singh N, Hroudová J, Fišar Z. (2015) Cannabinoid-induced changes in the activity of electron transport chain complexes of brain mitochondria. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56:926-931

- Sloan M, Gowin J, Ramchandani V, Hurd Y, Le Foll B. (2017) The endocannabinoid system as a target for addiction treatment: trials and tribulations. *Neuropharmacology*, 124:73-83
- Smaga I, Sanak M, Filip M. (2019) Cocaine-induced changes in the expression of NMDA receptor subunits. *Current Neuropharmacology*, 17:1039-1055
- Sociás ME, Kerr T, Wood E, Dong H, Lake S, Hayashi K, DeBeck K, Jutras-Asward D, Montaner J, Milloy M. (2017) Intentional cannabis use to reduce crack cocaine use in Canadian setting: a longitudinal analysis. *Addictive Behaviors*, 72:138-143
- Steinberg E, Boivin J, Saunders B, Witten I, Deisseroth K, Janak P. (2014) Positive reinforcement mediated by midbrain dopamine neurons requires D1 and D2 receptor activation in the nucleus accumbens. *PLOS ONE*, 9:e94771
- Steketee J, Kalivas P. (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological Reviews*, 63:348-365
- Steketee J. (2005) Cortical mechanisms of cocaine sensitization. *Critical Reviews in Neurobiology*, 17:69-86
- Strain E, Griffiths R. (1995) Caffeine dependence: fact of fiction? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 88:437-440
- Suárez H, Ramírez J, Albano G, Castelli L, Martínez E, Rossal M. (2014) Fisuras: dos estudios sobre pasta base de cocaína en Uruguay. Montevideo: Ediciones Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, UdelaR.
- Suzuki T, Okuno H, Yoshida T, Endo T, Nishina H, Iba H. (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Research*, 19:5537-5542
- Swendsen J, LeMoal M. (2011) Individual vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216:73-85
- Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I. (2002) Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *European Journal of Neuroscience*, 15:2057-2061
- Taylor L, Gidal B, Blakey G, Tayo B, Morrison G. (2018) A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled, single ascending dose, multiple dose, and food effect trial of the safety, tolerability and pharmacokinetics of highly purified cannabidiol in healthy subjects. *CNS Drugs*, 32:1053–1067

Thomas M, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC. (2001) Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nature Neuroscience*, 4:1217–1223

Toda S, Alguacil L, Kalivas P. (2003) Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry*, 87:1478-1484

Todtenkopf M, Mihalakopoulos A, Stellar J. (2002) Withdrawal duration differentially affects c-fos expression in the medial prefrontal cortex and discrete subregions of the nucleus accumbens in cocaine-sensitized rats. *Neuroscience*, 114:1061-1069

Torres G, Rivier C. (1994) Induction of c-fos in rat brain by acute cocaine and fenfluramine exposure: a comparison study. *Brain Research*, 647:1-9

Tozzi A, De Lure A, Marsili V, Romano R, Tantucci M, Di Filippo M, Costa C, Napolitano F, Mercuri N, Borsini F, Giampa C, Romana F, Picconi B, Usiello A, Calabresi P. (2012) A2A adenosine receptor antagonism enhances synaptic and motor effects of cocaine via CB1 cannabinoid receptor activation. *PLOS ONE*, 7:e38312:1-13

Triaca J, Cardeillac V, Idiarte Borda C. (2009) Características de los primeros usuarios que consultaron en el Centro de Referencia Nacional de la Red Drogas “Portal Amarillo”. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 73:37-48

Tsai H, Zhang F, Adamantidis A, Stuber G, Bonci A, Lecea L, Deisseroth K. (2009) Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*, 324:1080-1084

Tseng KY, Amin F, Lewis BL, O'Donnell P. (2006) Altered prefrontal cortical metabolic response to mesocortical activation in adult animals with a neonatal ventral hippocampal lesion. *Biological Psychiatry*, 60:585-590

Tzschentke T. (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, 12:227–462

Uhl G, Koob G, Cable J. (2019) The neurobiology of addiction. *Annales of the New York Academy of Sciences*, 1451:5-28

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. (2013) Pasta Básica de Cocaína. Cuatro décadas de historia, actualidad y desafíos. Editado por: Comisión Nacional para el Desarrollo y Vida sin Drogas (DEVIDA)/Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, Perú.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. (2019) World Drug Reporte. Disponible en: <https://wdr.unodc.org/wdr2019/>

- Unterwald E, Ho A, Rubenfeld J, Kreek MJ. (1994) Time course of the development of behavioral sensitization and dopamine receptor up-regulation during binge cocaine administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270:1387–1396
- Uslaner J, Badiani A, Day H, Watson S, Akil H, Robinson T. (2001) Environmental context modulates the ability of cocaine and amphetamine to induce c-fos mRNA expression in the neocortex, caudate nucleus, and nucleus accumbens. *Brain Research*, 920:106-16
- Vallejo-Reyes F (2019) Evaluación de la función ejecutiva en usuarios con dependencia de pasta base de cocaína mediante una batería neuropsicológica. *PSYKHE*, 28:1-17
- Van Amsterdam J, Nutt D, Phillips L, Van Den Brink W. (2015) European rating of drug harms. *Journal of Psychopharmacology*, 29:655-660
- Vanderschuren L, Kalivas P. (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151:99-120
- Vanderschuren L, Pierce R. (2010) Sensitization processes in drug addiction. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 3:179-195
- Vélez-Hernández M, Padilla E, Gonzalez-Lima F, Jiménez-Rivera C. (2014) Cocaine reduces cytochrome oxidase activity in the prefrontal cortex and modifies its functional connectivity with brainstem nuclei. *Brain Research*, 1542:56-69
- Volkow N, Fowler J, Wang G, Baler R, Telang F. (2009) Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56:3-8
- Volkow N, Michaelides M, Baler R. (2019) The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiological Reviews*, 99:2115-2140
- Volkow N, Morlaes M. (2015) The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell*, 162:712-725
- Volkow N, Poznyak V, Saxena S, Gerra G, UNODC-WHO Informal International Scientific Network. (2017) Drug use disorders: impact of a public health rather than a criminal justice approach. *World Psychiatry*, 16:213-214
- Volkow N, Wang G, Fischman M, Foltin R, Fowler J, Franceschi D, Franceschi M, Logan J, Gatley S, Wong C, Ding Y, Hitzemann R, Pappas N. (2000) Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sciences* 67:1507-1515

- Volkow N, Wang G, Fowler J, Tomasi D, Telang F. (2011) Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:15037-15042
- Volkow N, Wang G, Telang F, Fowler J, Logan J, Childress A, Jayne M, Ma Y, Wong C. (2008) Dopamine increases in striatum do not elicit craving in cocaine abusers unless they are coupled with cocaine cues. *Neuroimage*, 39:1266-1273
- Volkow N, Wang G, Telang F, Fowler J, Logan J, Childress A, Jayne M, Ma Y, Wong Ch. (2006) Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *Journal of Neuroscience*, 26:6583-6588
- Voorn P, Vanderschuren L, Groenewegen H, Robbins T, Pennartz C. (2004) Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *TRENDS in Neurosciences*, 27:468-474
- Walker J, Sevarino K. (1995) Regulation of cytochrome c oxidase subunit mRNA and enzyme activity in rat brain reward regions during withdrawal from chronic cocaine. *Journal of Neurochemistry*, 64:497-502
- Walsh R, Cummins, R. (1976) The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 83:482-504
- Wang G, Volkow N, Fowler J, Cervany P, Hitzemann R, Pappas N, Wong C, Felder C. (1999) Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sciences*, 64:775-84.
- Wassum K, Izquierdo A. (2015) The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 57:271-283
- White N. (1989) Reward or reinforcement: what's the difference? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 13:181-186
- Wise R, Bozarth M. (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychology Reviews*, 94:469–492
- Wolf M, Ferrario CR. (2010) AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35:185-211
- Wolf M. (2010) The bermuda triangle of cocaine-induced neuroadaptations. *TRENDS in Neurosciences*, 33:391-398
- Wong-Riley MTT. (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neuroscience*, 12:94-101
- Worley Ch, Valadez A, Schenk S. (1994) Reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior by cocaine and caffeine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48:217-221

- Wouters E, Walraed J, Banister S, Stove C. (2019) Insights into biased signaling at cannabinoid receptors: synthetic cannabinoid receptor agonists. *Biochemical Pharmacology*, 169:113623
- Yang H, Jong J, Tak Y, Peck J, Bateup H, Lammel S. (2018) Nucleus accumbens subnuclei regulate motivated behavior via direct inhibition and disinhibition of VTA dopamine subpopulations. *Neuron*, 97:434-449
- Yao W, Spealman R, Zhang J. (2008) Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochemistry and Pharmacology*, 75:2055–2069
- Zahm D. (1999) Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877:113-128
- Zavala A, Weber S, Rice H, Alleweireldt A, Neisewander J. (2003) Role of the prelimbic subregion of the medial prefrontal cortex in acquisition, extinction, and reinstatement of cocaine-conditioned place preference. *Brain Research*, 990:157– 164
- Zhang C, Wong-Riley M. (2000) Synthesis and degradation of cytochrome oxidase subunit mRNAs in neurons: differential bigenomic regulation by neuronal activity. *Journal of Neuroscience Research*, 60:338-344
- Zhang D, Zhang L, Lou DW, Nakabeppu Y, Zhang J, Xu M. (2002) The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression. *Journal of Neurochemistry*, 82:1453-1464
- Zilverstand A, Huang A, Alia-Klein N, Goldstein R. (2018) Neuroimaging impaired response inhibition and salience attribution in human drug addiction: a systematic review. *Neuron*, 98:886-903
- Zlebnik N, Cheer J. (2016) Beyond the CB1 Receptor: Is cannabidiol the answer for disorders of motivation? *Annual Review of Neuroscience*, 39:1-17
- Zlebnik N, Hedges V, Carroll M, Meisel R. (2014) Chronic wheel running affects cocaine-induced c-Fos expression in brain reward areas in rats. *Behavioral Brain Research*, 261:71-78
- Zou S, Kumar U. (2018) Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 19:833