

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Subárea Neurociencias

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS
CENTRALES DE LA PASTA BASE DE COCAÍNA:
ESTUDIO DEL EFECTO ESTIMULANTE Y LA
CONDUCTA AGRESIVA**

Lic. María Noel Meikle

Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Laboratorio de Biología Celular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Diciembre 2011

ÍNDICE.

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
PRESENTACIÓN DE TESIS	6
I. INTRODUCCIÓN	7
1. Pasta Base de Cocaína	7
1.1 Definición y elaboración de Pasta Base de Cocaína	7
1.2 Patrón de consumo y sintomatología.....	8
2. Adicción a drogas de abuso	9
2.1 Bases neurales en la acción de drogas de abuso: sistema dopaminérgico.....	10
2.2 Mecanismo de acción de cocaína.....	12
2.3 Vía de administración de cocaína y su implicancia en adicción	13
3. Agresión y drogas de abuso.....	14
3.1 Bases neurales de la agresión: regiones del SNC y neurotransmisores	15
4. Adulterantes en las drogas ilícitas.	17
5. Antecedentes particulares de nuestro grupo de trabajo	18
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	21
III. OBJETIVO GENERAL	21
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
VI. RESULTADOS.....	33
CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE MUESTRAS DE PBC.	
1.1. Caracterización del efecto estimulante.....	33
1.2 Caracterización de la conducta agresiva.	47
CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE PBC.	
2.1 Correlato neuroquímico de los cambios observados en el día del Test en el modelo de agresión por aislamiento.	51
2.2 Cambios neuroquímicos observados en el día Post-test en el modelo de agresión por aislamiento.....	52

VII. DISCUSIÓN	54
Efecto estimulante de las muestras de PBC y la relevancia de la cafeína.....	54
Efecto anti-agresivo y cambios neuroquímicos asociados.....	56
Efecto residual.....	60
VIII. CONCLUSIONES.....	61
IX. PERSPECTIVAS	62
X. REFERENCIAS	64
XI. TRABAJOS CIENTÍFICOS.....	74

ABREVIATURAS.

5-HIAA: Ácido 5-hidroxi-indolacético.

5-HT: Serotonina.

ANOVA: Análisis de varianza.

ATV: Área Tegmental Ventral.

CA: Campo abierto.

Caf: Cafeína.

Coc: Cocaína.

CPF: Corteza Prefrontal.

CPFlat: Corteza Prefrontal lateral.

CPFm: Corteza Prefrontal medial.

DA: Dopamina.

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético.

ED: Cuerpo Estriado Dorsal.

GC/MS: Cromatografía de gases/detector de masa.

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

HCl: Ácido Clorhídrico.

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta resolución-detector de arreglo de diodos.

HPLC-DE: Cromatografía líquida de alta resolución-detección electroquímica.

KMnO₄: Permanganato de potasio.

NA: Noradrenalina.

NAcc: Núcleo *Accumbens*.

NH₄: Amoníaco.

PBC: Pasta Base de Cocaína.

SNC: Sistema Nervioso Central.

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar a Cecilia Scorza, quien generosamente, me abrió las puertas hace ya seis años atrás. Porque además de que me permitió iniciarme en este camino de la ciencia, me dio un lugar en el Laboratorio, me transmitió sus conocimientos y me ayudó e impulsó a crecer y a desarrollarme académica y personalmente.

Al grupo del lab: Xime, Jess, Jose, Martín, Pau, Ana, Pato, Gaby, Camila y Mónica, por la ayuda académica y personal. Por apoyarme en todos los emprendimientos, dándome fuerzas y buena onda. Por el aguante en este último tramo y especialmente por los lazos creados.

A otros compañeros del Instituto: los neuroquímicos, la gente del bioterio, Lu Zubi, quienes me han ayudado en las diversas tareas académicas-experimentales, siempre con buena disposición.

A mis padres, por ser un apoyo incondicional, firme, por el empuje y el interés en favorecer mi crecimiento...A Ana por su amistad como hermana y por compartir conmigo su experiencia y su pasión por la ciencia. Al resto de mi flia: mis hermanos, cuñados y sobrinos....porque son una parte integral de mí.

A mis amigos: los de aquí porque siempre están, me acompañan y muchas veces son los pilares en los que me apoyo...especialmente a Nati, Majo, Caro, Soni...

Y a los amigos “de allá”, los que la ciencia me ha dado durante este camino, por compartir clases, charlas, salidas...y una misma pasión.

A la Vida...por darme la oportunidad de estar donde estoy, de disfrutar lo que hago y tener la dicha de estar rodeada de buenas personas.

RESUMEN.

La Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga psicoestimulante ilegal, que se consume en nuestro país desde el año 2002. Si bien algunos de los efectos subjetivos y fisiológicos son similares a los inducidos por cocaína (clorhidrato), PBC genera una gran dependencia, una serie de trastornos comportamentales tales como impulsividad/agresividad, rotura de códigos sociales y un gran deterioro cognitivo. Aún se desconocen los factores que expliquen este perfil clínico característico.

En general, se considera a la vía de administración como el principal factor que explicaría las diferencias detectadas entre los consumidores de PBC y cocaína (inhalación pulmonar vs. intra-nasal). Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado la incidencia de los componentes químicos presentes en la PBC como un factor adicional. Dado que PBC es el producto que se obtiene en las etapas tempranas en el proceso químico de extracción del alcaloide cocaína a partir de las hojas de coca, la droga contiene cocaína (base), componentes del proceso natural de manufactura de la droga (impurezas) así como compuestos químicos. Sumado a esto, la PBC se vende adulterada.

Antecedentes de nuestro grupo de trabajo, demostraron que una serie de muestras de PBC incautadas en nuestro país, contenían un porcentaje variable de cocaína base (20-70 %), otros alcaloides (trans y cis-cinamoil cocaína) en cantidades muy bajas (0.1 - 4 %) y cafeína (1-15 %) como adulterante activo. Estos datos nos llevaron a proponer la importancia de considerar la composición química de la PBC en sus acciones sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). Siendo cocaína y cafeína los principales componentes detectados en la mayoría de las muestras de PBC analizadas, la hipótesis de trabajo de la presente Tesis de Maestría postula que ambos compuestos serían los principales responsables de los efectos farmacológicos inducidos por la droga sobre el SNC.

El objetivo general del trabajo fue estudiar el papel de los componentes mayoritarios presentes en la PBC en los efectos comportamentales inducidos por la droga, en particular en su acción estimulante y sobre la conducta agresiva. Los cambios neuroquímicos inducidos por la PBC sobre el sistema dopaminérgico y serotoninérgico en regiones del circuito mesocorticolímbico también fueron estudiados.

Se caracterizó el efecto estimulante en ratas inducido por el tratamiento sistémico agudo de tres muestras de PBC representativas de una composición química diferente: PBC 1, 5 y 7. Se utilizó el campo abierto como modelo comportamental para evaluar la propiedad estimulante de la PBC. Por otra parte, se caracterizó el efecto comportamental inducido por el tratamiento sistémico agudo de una muestra de PBC (PBC 1) sobre las conductas agresivas, utilizando el paradigma de agresión por aislamiento en ratas macho. Los cambios neuroquímicos fueron evaluados mediante el

uso de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica. Todos los estudios fueron comparados con cocaína (pura) inyectada a dosis equivalentes y bajo la misma vía de administración.

El efecto estimulante inducido por las muestras PBC 1, 5, 7 y cocaína fue dosis-dependiente. La comparación con cocaína (pura) demostró que el principal responsable del efecto estimulante inducido por dichas muestras de PBC fue la cocaína (base). Sin embargo, en las muestras PBC 1 y 7, y a determinadas dosis, la cafeína indujo un efecto aditivo potenciando la acción estimulante de las mismas. Aunque de manera indirecta, se confirmó que los otros componentes (impurezas) presentes en las muestras de PBC no participaron en la acción estimulante.

Tanto PBC 1 como cocaína indujeron un bloqueo significativo en las conductas agresivas. La actividad exploratoria (*rearings*) fue aumentada de manera similar por ambas drogas. Esta respuesta conductual se asoció con una hiperactividad motora inducida por ambos psicoestimulantes. Se observó un aumento de la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica a nivel del circuito mesocorticolímbico, el cual fue similar para PBC 1 y cocaína. Este resultado indicó una vez más, que la cocaína (base) presente en PBC 1 fue la responsable de la inducción de este efecto neuroquímico. Adicionalmente, éstos resultados permitieron proponer que la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico estaría en la base del efecto anti-agresivo observado. No hubo efecto residual de ambas drogas.

Es importante mencionar que el presente trabajo de Tesis constituyó el primer abordaje neurobiológico pre-clínico en el Uruguay aportando información sobre una serie de efectos centrales de la PBC y su comparación con cocaína. Asimismo, estos datos serán la base para la profundización en el estudio de otros efectos de la PBC en el SNC.

TRABAJOS CIENTÍFICOS SURGIDOS y PASANTÍAS REALIZADAS EN EL TRANCURSO DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, constituyeron el cuerpo de datos de dos trabajos científicos publicados y un manuscrito en preparación:

Ma. Noel Meikle, Jessika Urbanavicius, Euleuterio Umpierrez, Juan Andrés Abin-Carriquiry, Giselle Prunell, María Cecilia Scorza. **Primer estudio pre-clínico de la acción de Pasta Base de Cocaína en el Sistema Nervioso Central.** *Revista de Psiquiatría del Uruguay* 73(1): 25-36, 2009.

Ximena López Hill, José Pedro Prieto, Ma. Noel Meikle, Jessika Urbanavicius, Euleuterio Umpierrez, Juan Andrés Abin-Carriquiry, Giselle Prunell, María Cecilia Scorza. **Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant.** *Behavioral Brain Research* 221(1): 134-41, 2011.

María Noel Meikle, Jessika Urbanavicius, José Pedro Prieto, Ximena López, Andrés Abin-Carriquiry, Giselle Prunell, María Cecilia Scorza. **Anti-aggressive effect induced by coca-paste seized sample on isolation-induced aggression in rats. Comparison with cocaine.** Manuscrito en preparación. 2011.

El desarrollo de esta tesis, implicó la realización de dos pasantías:

Una de ellas fue realizada en el mes de octubre del 2010 en la Universidad do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) de Porto Alegre, bajo la orientación de la Dra. Rosa de Almeida. La misma tuvo como objetivo adquirir entrenamiento en el modelo de agresión por aislamiento en ratas; modelo que luego fue implementado en nuestro laboratorio para realizar los experimentos en el marco de ésta tesis.

La segunda pasantía tuvo lugar en el Departamento de Neuroquímica del IIBCE, a cargo del Dr. Federico Dajas, durante los meses de diciembre 2010 y mayo 2011. La misma consistió en el aprendizaje de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica para el análisis de los cambios neuroquímicos inducidos por PBC y cocaína. El trabajo se desarrolló con la colaboración técnica de Gustavo Costa y el Dr. J. Andrés Abin-Carriquiry.

PRESENTACIÓN DE TESIS

La Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga de abuso ilegal cuya aparición irrumpe en nuestro país en el año 2002 asociado a una gran crisis económica (Junta Nacional de Drogas, JND 2006). En ese momento, nada se conocía sobre dicha droga llevando incluso a que se planteara a la PBC como una nueva droga de abuso. Sin embargo, algunas evidencias aportaron que el consumo de PBC se extendía por varios países de América del Sur desde hacía ya varias décadas. En particular, desde 1970 existen reportes de su uso en Perú, Bolivia, Colombia y Ecuador (Castaño 2000), demostrando así que la PBC no es una droga nueva en Latinoamérica. La eclosión de su consumo en nuestro país se produjo principalmente en individuos jóvenes y de bajo nivel socioeconómico y su correlato asociado a algunos casos de perfiles de violencia y criminalidad generó un efecto de alarma pública sin precedentes (JND 2006). Los actores involucrados en la asistencia de sus consumidores se enfrentaron repentinamente a un perfil clínico difícil de diagnosticar y a una nueva situación de tratamiento de síntomas inducidos por la droga. Por lo tanto, el desconocimiento del mecanismo de acción de la PBC a nivel del sistema nervioso central (SNC) generó la necesidad de contar con información sobre sus efectos neurobiológicos que permitieran explicar las alteraciones físicas y psíquicas observadas luego de su consumo.

En este contexto, la presente Tesis se desarrolla en el marco de una línea de investigación cuyo objetivo general es el de aportar información preclínica sobre los efectos farmacológicos inducidos por la PBC en el SNC. Así, esta tesis fue diseñada para llevar a cabo parte de éste objetivo. En particular, se incluyó el estudio del efecto estimulante inducido por diferentes muestras de PBC, así como el efecto sobre la respuesta comportamental de agresión.

En el capítulo de introducción describiremos en primer lugar la definición de PBC y las características principales de su consumo para luego presentar características generales sobre la adicción a drogas de abuso, las bases neurales de la adicción, los cambios comportamentales y neuroquímicos subyacentes así como la influencia de la vía de administración en el potencial adictivo de drogas de abuso. A su vez, presentaremos la relación entre las conductas agresivas y el consumo de drogas de abuso. Finalmente, introduciremos el concepto de los adulterantes como factor a considerar en el efecto farmacológico de las drogas de abuso y presentaremos datos de nuestro grupo de trabajo sobre el análisis de la composición química de muestras de PBC incautadas en nuestro país.

Cabe señalar que la mayoría de las evidencias estarán disponibles en relación a la cocaína considerada como droga paradigmática a comparar con los efectos estudiados para PBC.

1. PASTA BASE DE COCAÍNA.

1.1 Definición y elaboración de Pasta Base de Cocaína.

La PBC es el producto que se obtiene en alguna de las etapas tempranas en el proceso químico de extracción del alcaloide cocaína, a partir de las hojas de coca (del arbusto *Erythroxylon coca*). En este proceso existen varias etapas de purificación, las que generalmente finalizan con la obtención de la cocaína en su forma de clorhidrato, siendo el polvo blanco que se inhala (la vía intra-nasal es la más común en el consumo de cocaína). La PBC generalmente se obtiene al disolver en agua las hojas de coca secas y de tratar ésta solución con querosén o gasolina, sustancias alcalinas y luego con permanganato de potasio y finalmente ácido sulfúrico (Figura 1). Este proceso produce un polvo untuoso que puede contener un porcentaje diferente en cocaína en su forma de base mezclado con diversas sustancias químicas, entre las cuales se encuentran las impurezas (definidas como componentes del proceso natural de manufactura de la droga). Sumado a esto, la PBC se vende adulterada haciendo que la composición de la misma resulte altamente variable (Jeri 1984; ElSohly y cols. 1991; Castaño 2000; JND 2007).

Figura 1- PBC en el proceso de obtención de clorhidrato de cocaína.

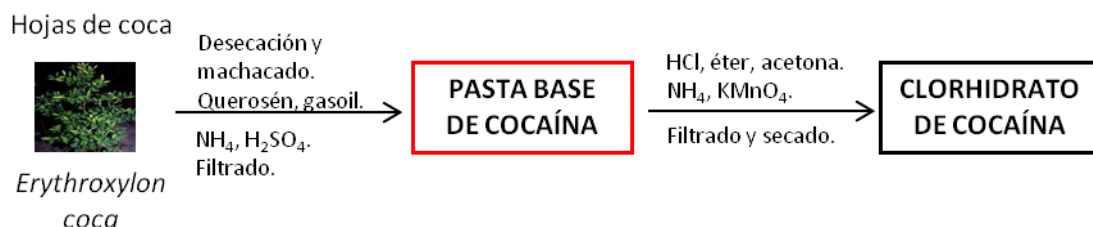


Figura 1. En el esquema se muestra que PBC es el producto previo en el proceso de elaboración y purificación de cocaína en su forma de clorhidrato a partir de las hojas de coca.

La PBC es una droga de muy bajo costo, se produce a través de procedimientos de laboratorios muy simples, es de fácil uso y posee una potente y breve acción estimulante. Estos factores favorecieron su rápida instauración y difusión en el mercado del país (Castaño 2000; JND 2006). Se vende o se consume en forma de “gota” o “lágrima”, siendo la forma de “tiza” la que se utiliza para su tráfico internacional (Figura 2). Su aspecto varía entre el color blancuzco, grisáceo al amarillento, dependiendo de la cantidad del alcaloide cocaína o adulterante que contenga.

Figura 2- Formas de PBC.



Figura 2. La foto representa una muestra de PBC en su formato de tiza (A) y gota (B).

1.2 Patrón de consumo y sintomatología.

La PBC es una forma de cocaína alcalina o básica, que posee un punto de volatilización bajo, lo cual le confiere la propiedad de ser fumada, por lo que se define como una cocaína fumable. Se consume mediante pipas o dispositivos similares como latas o inhaladores, y puede fumarse mezclada con tabaco o marihuana en forma de cigarrillo (Castaño 2000; JND 2007). Su inhalación hace que sus componentes pasen directamente a los pulmones donde se absorben a gran velocidad, produciendo un rápido efecto (euforia), muy intenso y una dependencia de extrema gravedad, características que le proporcionan un alto poder adictivo. La etapa de euforia se caracteriza por alteraciones psicomotrices (hipertonía muscular y estereotipias), aumento de la presión arterial, temperatura corporal, frecuencia respiratoria y cardíaca e hipersensibilidad sensitiva. Luego de algunos minutos esta euforia es reemplazada por una marcada ansiedad, miedo, depresión o apatía. Estos cambios no deseados (disforia) llevan a que el individuo posea un deseo incontrolable de volver a consumir, desencadenando el fenómeno de búsqueda de la droga o *craving*. Está descrito que el consumo crónico de PBC produce una disminución marcada de peso corporal, con anorexia, astenia, insomnio e irritabilidad, alteraciones cognitivas (alteraciones de memoria y concentración), conductas antisociales o asociadas a actos violentos, desinterés laboral y académico y un estado de psicosis paranoide (Organización Mundial de la Salud 1987; Castro de la Mata 1989; Navarro 1989; Pérez 2003; JND 2006).

Dado que PBC es una cocaína fumable ha sido confundida con el *crack*, el cual se clasifica como otra forma fumable de cocaína, aunque éste, a diferencia de la PBC, constituye un paso posterior al clorhidrato de cocaína. El *crack* se obtiene mezclando el clorhidrato de cocaína con sustancias alcalinas, como bicarbonato de sodio y amoníaco y finalmente agua para convertirlo a base, dando lugar a las “rocas de *crack*”. Es interesante mencionar que los síntomas clínicos que aparecen en los consumidores de *crack* son similares a los descritos para PBC (Hatsukami y Fischman 1996; Cornish y O’Brien 1996; Castaño 2000 y Castaño comunicación personal).

Algunos de los efectos subjetivos o fisiológicos producidos por PBC son similares a los observados por cocaína en su forma de clorhidrato (aumento de alerta, euforia, desinhibición, disforia) o incluso por otras sustancias de abuso, tales como anfetamina. Sin embargo, características como la rotura de códigos sociales, el deterioro cognitivo, la alta impulsividad y agresividad, así como el alto grado de dependencia distinguen un perfil clínico característico para los consumidores de PBC, a diferencia del observado para otras drogas de abuso (Jeri 1978; Castro de la Mata 1989; JND 2006). Otra de las diferencias clínicas observadas con cocaína es la aparición de síntomas y signos de intoxicación aguda y el fenómeno de tolerancia aguda y/o sensibilización que poseen los consumidores de PBC, fenómeno que también aparece en consumidores de *crack* (Castaño, comunicación personal). El rápido pasaje que se observa del uso ocasional al abuso de la droga estaría explicado, en parte, por la aparición de estos fenómenos (JND 2006).

2. ADICCIÓN A DROGAS DE ABUSO.

Desde el momento que se trabaja con una droga de abuso, debemos conocer que dependiendo de la modalidad o frecuencia de su uso, puede desencadenar la patología de la adicción. Adicción a drogas de abuso se considera un desorden compulsivo caracterizado por el consumo crónico y la búsqueda compulsiva de la droga, la pérdida del control y la aparición de un estado emocional negativo (disforia, ansiedad, irritabilidad), reflejando un síndrome de abstinencia motivacional cuando es impedido el acceso a la droga (DSM-IV 1994; Koob y Le Moal 1997; Koob y Volkow 2010). La vulnerabilidad a la recaída en los adictos puede persistir durante años, lo que implica que la adicción causa cambios a largo plazo en la función cerebral como resultado del consumo repetido de la droga, disposición genética y asociaciones ambientales con el uso de la misma (aprendizaje). De esta manera, comprender las bases de la adicción implica estudiar los mecanismos fisiológicos que desencadenan las drogas de abuso en el SNC luego de tratamientos agudos y crónicos.

A pesar de que se conoce el riesgo de desencadenar la patología de la adicción en la exposición repetida a drogas de abuso, paradójicamente un bajo porcentaje de individuos se convierten en adictos. Aún se desconocen los factores que desencadenan esta situación. Sin embargo, factores genéticos, ambientales y alteraciones en el desarrollo del SNC podrían determinar que una persona despierte la patología (Volkow y cols. 2011).

En este contexto, es interesante destacar que en nuestro país el consumo de PBC está concentrado geográfica y socioculturalmente en las zonas más vulnerables desde el punto de vista económico de la capital, haciendo que los factores ambientales influyan sustancialmente en la vulnerabilidad de los individuos para desencadenar la patología. A su vez, se ha constatado que el 60 % de los consumidores de PBC presentan signos de alta dependencia, considerándose a la PBC como la droga que genera el mayor

consumo problemático comparado con otras drogas de abuso (Observatorio Uruguayo de Drogas 2007).

2.1 Bases neurales en la acción de drogas de abuso: sistema dopaminérgico.

Actualmente se conocen varios circuitos cerebrales involucrados en la neurobiología de la adicción. A pesar de ello, el conocimiento de los sustratos neurobiológicos asociados a los efectos reforzadores de las drogas de abuso se logró a través de la identificación del sistema de motivación o recompensa en el SNC (Kalivas y Volkow 2005, Figura 3). Este sistema está conceptualizado como un mecanismo de control que determina tanto el umbral como la intensidad de la respuesta conductual frente a un estímulo determinado (Pierce y Kalivas 1997). Es así que numerosas evidencias vinculan este circuito con el inicio y el mantenimiento de respuestas conductuales tanto hacia estímulos o reforzadores naturales así como también a drogas de abuso (Koob y Bloom 1988; Le Moal y Simon 1991; Hooks y Kalivas 1995).

Como se muestra en la Figura 3, este circuito incluye una red de regiones interconectadas a través de sus proyecciones diseñada para optimizar la respuesta conductual frente a la recompensa y a asociaciones aprendidas. Una de las principales regiones involucrada en la propiedad reforzadora de drogas de abuso es el Área Tegmental Ventral (ATV, definida como núcleo A10 por Dahlström y Fuxe 1964), área que contiene entre un 60 y 65 % de neuronas dopaminérgicas (DAérgicas). Los cuerpos de las neuronas DAérgicas, que se originan en el ATV, proyectan hacia el Núcleo *Accumbens* (NAcc) conformando el sistema DAérgico mesolímbico. A su vez, se han descrito también proyecciones DAérgicas recíprocas a la corteza prefrontal (CPF) describiendo el circuito mesocortical (Carr y Sesack 2000). Ambos sistemas describen el circuito meso-cortico-límbico involucrado en el control de la emoción y el comportamiento, en la recompensa y la cognición.

Existe un consenso general en la clínica y en estudios pre-clínicos que revela que la dopamina (DA) media las propiedades reforzadoras de la cocaína. Se ha demostrado que luego del tratamiento agudo o repetido de cocaína y otras drogas psicoestimulantes (por ejemplo, anfetamina) aparece un aumento en los niveles extracelulares de DA en el NAcc, reflejando la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico (Di Chiara e Imperato 1987; Kalivas y Duffy 1990; Broderick y cols. 2004; Koob y Volkow 2010).

Figura 3- Circuito motivacional o de recompensa.

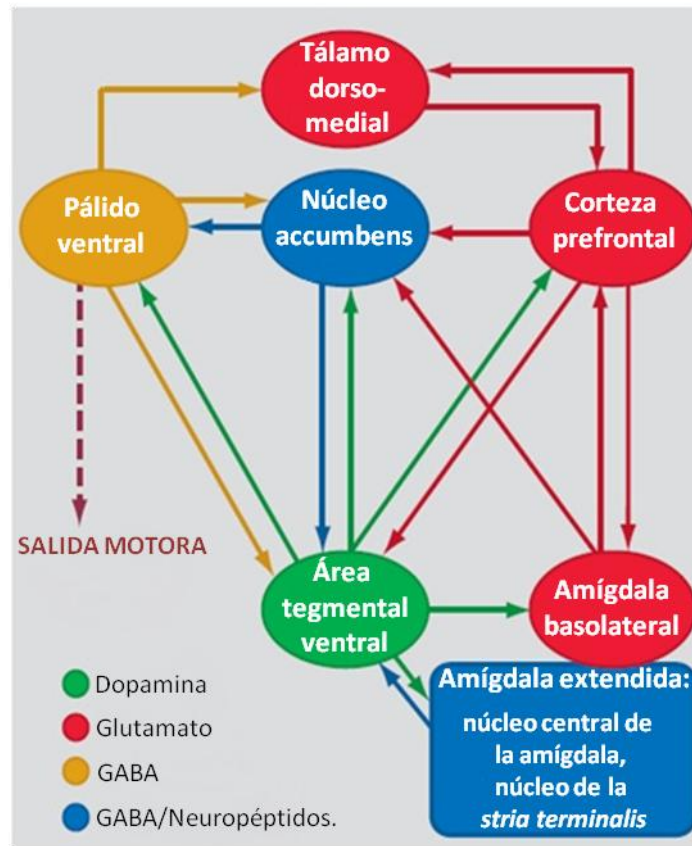


Figura 3. En el esquema se muestra la relación funcional entre las regiones que conforman el llamado circuito motivacional o de recompensa. En rojo se muestran las proyecciones glutamatérgicas, en verde se muestran las vías dopaminérgicas, en marrón la vía GABAérgica exclusivamente, mientras que en azul se muestran las proyecciones GABA y neuropeptídicas entre las distintas regiones. Modificado de Kalivas y Volkow, 2005.

No solo el sistema DAérgico participa como neurotransmisor principal en la neurobiología de la adicción a drogas de abuso. El NAcc recibe información excitatoria (glutamato) que proviene de la CPF lateral (CPF lat) y medial (CPFm), corteza entorrinal y el subículo ventral del hipocampo y amígdala basolateral, regiones pertenecientes al sistema límbico. Las neuronas corticales promueven conductas con un fin dirigido, mientras que el subículo ventral del hipocampo provee información espacial y contextual. Asimismo, la amígdala basolateral envía información sobre asociaciones condicionadas, así como información afectiva. Por otra parte, el NAcc proyecta (utilizando GABA como principal neurotransmisor) hacia el pálido ventral, región que se interconecta con divisiones del tálamo, constituyendo la salida motora de este circuito. Por lo tanto, el NAcc es una región donde se integran las motivaciones que derivan de regiones límbicas con el circuito de control motor, para regular las conductas dirigidas hacia una salida motivacional (Koob y Volkow 2010, Sesack y Grace

2010; Volkow y cols. 2011). Por otra parte, la amígdala extendida (sistema que integra a su vez varios núcleos) es una región que aporta información sobre factores de estrés, ambientales e interoceptivos y que proyecta, a través de GABA, hacia el ATV.

Por otra parte, no podemos dejar de mencionar que la DA en el SNC proviene, además del ATV, de otro grupo neuronal mesencefálico: la Sustancia Nigra compacta (SNc, definida como grupo A9 por Dahlström y Fuxe 1964). Dichas neuronas proyectan principalmente al cuerpo estriado dorsal (ED) describiendo el sistema DAérgico meso o nigroestriatal. Si bien este sistema se lo vincula estrechamente con el control del movimiento y patologías asociadas (por ejemplo la enfermedad de Parkinson), varias evidencias muestran que dicho circuito también participa en la acción estimulante y comportamientos estereotipados inducidos por drogas psicoestimulantes. De hecho, la contribución del sistema DAérgico en el NAcc y ED (sistema mesolímbico y mesoestriatal, respectivamente) ha sido estudiada ampliamente, en particular en la acción de drogas como anfetamina y cocaína. La administración sistémica de ambas drogas aumentan la liberación de DA en el NAcc y ED, acción que se ha correlacionado con el efecto estimulante de las mismas (Creese e Iversen 1974; Kelly e Iversen 1976; Cole 1978; Kuczenski y cols. 1991; Antoniou y cols. 1998).

2.2. Mecanismo de acción de cocaína.

La cocaína es una de las drogas de abuso más comunes en todo el mundo. La mayor parte de su producción se realiza en países como Perú, Colombia, Bolivia y Ecuador. Su consumo induce euforia, estado de alerta y autoconfianza. Su uso repetido puede provocar irritabilidad, cambios de personalidad, y psicosis paranoide (Goldstein y cols. 2009). El mecanismo de acción de cocaína es principalmente a través del bloqueo de la proteína transportadora de DA, facilitando así la neurotransmisión DAérgica (Ritz y cols. 1990; Brown y cols. 2001). Existe suficiente evidencia que correlaciona el efecto estimulante inducido por la cocaína y el bloqueo de la recaptación de DA (Giros y cols. 1996; Feldman y cols. 1997; Hall y cols. 2009). Sin embargo, la inhibición del transportador de DA no es una acción selectiva, dado que cocaína también bloquea los recaptadores de noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT), con el consecuente aumento de la neurotransmisión monoaminérgica. Se ha demostrado incluso, que la interacción con el transportador de catecolaminas es más potente que para el de 5-HT (Ritz y cols. 1990; Han y Gu 2006). En roedores, se ha encontrado que en las regiones NAcc y ED, la cocaína induce un aumento en la transmisión DAérgica, mientras que induce un aumento en la liberación de 5-HT tanto en la CPF como en el núcleo dorsal del Rafe, núcleo que agrupa la mayor cantidad de neuronas 5-HTérgicas del SNC (Kuczenski y cols. 1991; Müller y Huston 2006; Torregrosa y Kalivas 2007). Asimismo, la cocaína administrada en forma sistémica y aguda induce un aumento en la frecuencia de

rearings (parámetro que refleja la actividad exploratoria de los animales) sumado a la hiperactividad locomotora (Kuczenski y cols. 1991; Antoniou y cols. 1998).

Por otra parte, luego de una administración repetida, cocaína puede inducir el fenómeno de sensibilización comportamental. Dicho fenómeno se desarrolla y expresa cuando, a corto y largo plazo, se desencadenan ciertos cambios neuroanatómicos en el SNC. Dichos cambios se deberían a dos de los efectos de la cocaína los cuales se superponen: la acción del bloqueo de la recaptación de DA y la interacción entre el efecto farmacológico y el ambiente del animal. Este fenómeno está estrechamente asociado con el potencial adictivo de una droga (Robinson y Berridge 1993; Pierce y Kalivas 1997). A su vez se ha demostrado la propiedad reforzadora/adictiva de la cocaína utilizando el modelo de Condicionamiento por preferencia de lugar (CPP), así como el de auto-administración (Goeders y Smith 1986; Bedingfield y cols. 1998; Ahmed y Koob 1999; Tzschentke 2007). Ambos modelos son comúnmente utilizados para evaluar la propiedad reforzadora inducida por una droga de abuso.

2.3. Vías de administración de cocaína y su implicancia en adicción.

Existen evidencias que postulan que cuanto mayor es la velocidad con la cual una droga accede al SNC, mayor es el riesgo de abuso de dicha sustancia y aumenta su poder adictivo, aunque aún no están del todo claras las razones de este fenómeno (Samaha y Robinson 2005; Volkow y cols. 2011).

Se sabe que las diferentes vías de administración de cocaína (oral, esnifada, fumada o intravenosa) producen patrones temporales diferenciales en su absorción y por lo tanto en la obtención de su contenido plasmático (Figura 4).

Figura 4- Contenido plasmático de cocaína luego de diferentes vías de administración.

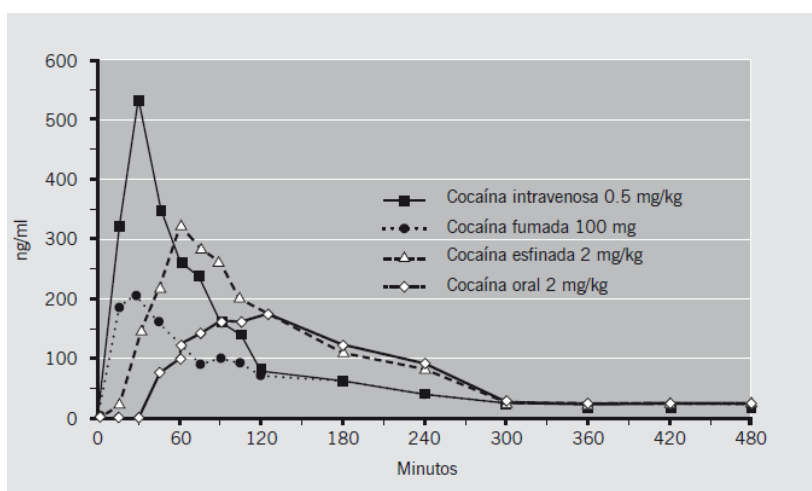


Figura 4. El gráfico representa las variaciones temporales en los niveles plasmáticos de cocaína en humanos, administrada a dosis equimolares y a través de diferentes vías. Modificado de Jones 1997.

Como se puede observar, la administración de cocaína fumada o inyectada por vía intravenosa produce un pico plasmático de cocaína a los 30 min., en comparación con el obtenido por vía nasal u oral, el cual aparece recién a los 60 min. Por otra parte, la biodisponibilidad plasmática de cocaína es mayor a través de la vía intravenosa que por la inhalación pulmonar, mientras que la administración nasal u oral presentan un perfil de absorción de cocaína similar (Jones 1997; Lizasoain y cols. 2002).

Estudios recientes han demostrado que las distintas vías administración de cocaína producen un efecto reforzador subjetivo diferente, medido en niveles equivalentes del bloqueo del transportador de dopamina. En estos estudios, Volkow y colaboradores han demostrado que cuando la cocaína entra al sistema de forma rápida (fumada o intravenosa) produce efectos subjetivos más fuertes (“high”) que cuando entra al sistema en forma más lenta (esnifada) (Volkow y cols. 2000). Estas evidencias sugieren que la velocidad con que la droga accede al cerebro es importante para generar sus efectos reforzadores (Volkow y cols. 2011).

Dada la ausencia de información científica publicada sobre las acciones de PBC en el SNC, hasta el momento se consideraba únicamente a la vía de administración como el factor fundamental que podría explicar la alta dependencia y el perfil clínico característico de los consumidores PBC.

3. AGRESIÓN Y DROGAS DE ABUSO.

Varios reportes epidemiológicos y clínicos han demostrado que el consumo de PBC se asocia generalmente con un alto grado de agresividad e impulsividad, desencadenando conductas delictivas, crímenes y violencia (JND 2006; Ferrando y cols. 2009; Triaca y cols. 2009). Sin embargo, hasta el momento, no hay reportes publicados que aporten evidencias directas de la acción de la PBC a nivel del SNC y la aparición de conductas agresivas.

La agresión es un componente normal de las conductas de los mamíferos. Para los animales representa una ventaja adaptativa para defender el territorio, pelear por recursos limitados, competir por la pareja sexual y proteger a las crías. Sin embargo, en el contexto de la conducta humana, las motivaciones, acciones y límites de los actos agresivos no son siempre claros. Las conductas agresivas inapropiadas en la forma de violencia interpersonal representan tanto una enfermedad mental como un problema social (Ferris y cols. 2008).

Varios estudios en humanos establecen una clara asociación entre el consumo de drogas de abuso y la agresividad/violencia (Miczek y Tidey 1989; Brodly 1990; Davis 1996; Brower y Price 2001). Una de las drogas de abuso frecuentemente asociadas con las conductas violentas es el alcohol, aunque no están claras las razones por las cuales algunos individuos son especialmente proclives a presentar dichas conductas (Miczek y

cols. 1992). También se ha asociado el uso de *crack* con un mayor índice de crímenes y violencia con respecto a cocaína (Hatsukami y Fishman 1996). Por otra parte, se conoce que la abstinencia a cocaína puede causar niveles elevados de ansiedad, síntomas depresivos e irritabilidad, características que podrían predisponer al individuo a la aparición de conductas violentas (Perrine y cols. 2008). Sin embargo, existen resultados contradictorios acerca de la relación droga de abuso-agresividad. Se desconoce si esta asociación se debe a un efecto farmacológico inducido por la droga, a su abstinencia y/o a la combinación del consumo y trastornos de personalidad de base en los consumidores que podría exacerbar la agresividad (Brody 1990; Hatsukami y Fischman 1996; Hoaken y Stewart 2003).

En este sentido, la relación droga de abuso-agresividad se ha comenzado a estudiar desde el punto de vista pre-clínico desde hace ya varias décadas. Se han utilizado modelos de agresión en ratones, demostrando que a dosis bajas o moderadas, el alcohol provoca una potenciación de las conductas agresivas (Miczek y cols. 1992). Por otro lado, algunos estudios reportaron que la cocaína administrada a altas dosis, tanto en forma aguda como repetida, induce un bloqueo en la aparición de las conductas agresivas. Específicamente, tanto en ratas como ratones, el tratamiento agudo con cocaína a dosis de 5-30 mg/kg bloquea la frecuencia de ataques y posturas agresivas (Miczek 1979, Darmani y cols. 1990, Long y cols. 1996; Estelles y cols. 2004) y aumenta la latencia de aparición a la primera conducta agresiva (Darmani y cols. 1990). Sin embargo, la administración repetida de cocaína, a las dosis de 0.5 a 1 mg/kg, induce un aumento en el número de ataques (Darmani y cols. 1990; Long y cols. 1996) mientras que disminuye la latencia de aparición de la primera conducta agresiva (Darmani y cols. 1990). Estas evidencias demuestran una relación directa entre la acción farmacológica de la cocaína y la aparición de conductas agresivas.

3.1. Bases neurales de la agresión: regiones del SNC y neurotransmisores.

Los circuitos neurales compuestos por interconexiones entre varias regiones tales como CPF, amígdala, hipocampo, área preóptica media, sustancia gris periacueductal, hipotálamo, corteza cingulada, corteza insular, núcleo de la *stria terminalis*, NAcc y otras, han estado implicadas en el control de las emociones. Se ha descrito que las alteraciones funcionales y estructurales en una o más de estas regiones pueden aumentar la susceptibilidad a las conductas agresivas y a la violencia. Si bien estas áreas forman parte de una red involucrada en el comportamiento agresivo la cual se mantiene constante en mamíferos, su regulación puede ser especie-específica (Davidson y cols. 2000; Raine y Yang, 2006; Miczek y cols. 2007; Nelson y Trainor 2007; Ferris y cols. 2008). Existe la necesidad de comprender los mecanismos neurales que contribuyan al comportamiento agresivo con el fin de desarrollar estrategias farmacológicas más específicas y reducir la incidencia de agresión e impulsividad.

Es importante destacar que la mayoría de las regiones involucradas en la regulación del comportamiento agresivo son también el sustrato neural que subyace a la recompensa o a las propiedades reforzadoras de las drogas de abuso (por ej., sistema mesolímbico), así como también en la fisiopatología de la sintomatología positiva de la esquizofrenia (Louilot y cols. 1986; Tidey y Miczek 1996; Cabib y cols. 2000; Miller y Cohen 2001; Berton y cols. 2006; Fuster 2007). En base a éste solapamiento, existe en la literatura el gran desafío de elucidar la especialización funcional en áreas del cerebro que participan en la expresión de diferentes componentes comportamentales.

En particular, una de las regiones más estudiadas ha sido la CPF, ya que se ha demostrado que es una región clave para la regulación de las conductas sociales y de agresión. Es así que la lesión prefrontal degenerativa o traumática predispone al comportamiento antisocial y violento o agresivo del tipo impulsivo (Miller y cols. 1997). Específicamente, estudios de neuroimagen han demostrado que pacientes agresivos con desórdenes de personalidad muestran una hipofunción en la región orbitofrontal de la CPF (Seo y cols. 2008). Por otra parte, se ha visto que individuos agresivos muestran una actividad reducida en la CPF y una actividad aumentada en el sistema límbico y en los ganglios basales. Estos datos sugieren que la disfunción en la CPF limitaría la capacidad de controlar a las regiones subcorticales, llevando a la aparición de conductas agresivas. En roedores, se ha demostrado que aquellos que presentan un alto nivel de agresión muestran un aumento en la activación de *c-fos* en neuronas piramidales corticales, principalmente en la región de la CPF medial infra-límbica, medial-orbital así como en la lateral orbital. A su vez, en éstas regiones se detectó una disminución en la activación de las células GABAérgicas posiblemente contribuyendo a la desregulación conductual (Halász y cols. 2006).

Es interesante mencionar que en personas consumidoras de PBC se ha demostrado una hipofunción en la CPF dorsolateral, orbitofrontal y también en el giro cingulado anterior (Ferrando y cols. 2009), la que podría explicar, en parte, las alteraciones comportamentales observadas en los individuos. Sin embargo, estas mismas alteraciones han sido descritas en consumidores activos de cocaína (Volkow y cols. 2000), sugiriendo que las alteraciones en la CPF están asociadas tanto a la falta de control comportamental que lleva a la compulsión por el consumo de la droga (adicción) así como también a las conductas agresivas. De todas maneras, no se conoce aún las razones que expliquen por qué algunos individuos adictos no presentan conductas agresivas y/o delictivas y viceversa.

Varios sistemas clásicos de neurotransmisores han sido involucrados en la génesis de las conductas agresivas. Sin embargo, abundante evidencia ha demostrado una asociación directa entre 5-HT y agresión (Nelson y Chiavegato 2000). De hecho, en individuos con características agresivas se han detectado niveles disminuidos de ácido 5-hidroxi-indolacético en plasma (5-HIAA, principal metabolito de la serotonina; Linnoila y Virkkunen 1992; Seo y cols. 2008). Asimismo, varios reportes han

demostrado que pacientes que muestran agresión impulsiva presentan un déficit en la transmisión 5-HTérgica en la CPF orbitofrontal y ventromedial, así como en la corteza cingulada. Como se mencionó anteriormente, estas regiones están implicadas en el control inhibitorio emocional, la toma de decisiones y las conductas compulsivas e impulsivas (Volkow y cols. 2000).

En estudios pre-clínicos, se ha demostrado que niveles disminuidos de 5-HT aumentan la agresión mientras que aumentos de 5-HT la reducen (Vergnes y cols. 1986; Molina y cols. 1987; Brunner y Hen 1997). A su vez, estrategias farmacológicas que aumentan la transmisión 5-HTérgica, tales como la administración de agonistas 5-HTérgicos de los subtipos de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}, así como la de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) han sido efectivas en reducir las conductas agresivas en roedores (Olivier y Mos 1992; de Boer y Koolhaas 2005). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual los agonistas 5-HTérgicos ejercen su acción anti-agresiva queda aún por resolverse (Miczek y cols. 2002).

Por otro lado, si bien la mayoría de los estudios se centran en la transmisión 5-HTérgica, existe evidencia pre-clínica que estudia el rol específico del sistema DAérgico en el comportamiento agresivo, aunque es menos conclusiva que la aportada para el sistema 5-HT. Manipulaciones farmacológicas de algunos receptores dopaminérgicos pueden inhibir el comportamiento agresivo (Nelson y Trainor 2005). Cambios en la neurotransmisión meso-cortico-límbica pueden asociarse con la anticipación, la ejecución y la recuperación de la agresión evaluada en roedores (Miczek y cols. 1992). Aumentos en la liberación de DA en el NAcc y en la CPF se han observado cuando los animales residentes se los enfrenta a un oponente. A su vez, en esta situación la 5-HT cortical disminuye durante y luego de la confrontación (van Erp y Miczek 2000).

Las evidencias presentadas nos sugieren que tanto el NAcc como la CPF son regiones claves en las funciones relacionadas con el control de respuestas frente a estímulos ambientales, con las conductas compulsivas-impulsivas y con la conducta de agresión. A su vez, dada la interrelación entre el sistema DAérgico y 5-HTérgico en el sistema mesocorticolímbico, es esperable que cambios en la transmisión monoaminérgica inducidas por PBC modulen las conductas agresivas.

4. ADULTERANTES EN LAS DROGAS ILÍCITAS.

El estudio del contenido y pureza de las drogas de abuso ilegales proporciona datos muy útiles con el fin de aumentar la conciencia entre sus usuarios y advertirlos del daño que pueden ocasionar el consumo de la droga y/o su abstinencia. Así, existen varias evidencias forenses que muestran que la mayoría de las drogas ilícitas se venden en forma adulterada (Evrard y cols. 2010; Cole y cols. 2011). Los adulterantes son

sustancias agregadas con el fin de aumentar el volumen de la droga, imitar o potenciar su acción. Existen adulterantes inactivos y activos. Los llamados adulterantes inactivos son utilizados con el fin de aumentar el volumen de la droga. En general no poseen un gran impacto sobre la salud del consumidor, siempre que estén agregados a bajas dosis. Los más utilizados son la lactosa, manitol, talco y polvo de ladrillo. Estas sustancias son baratas, fácilmente accesibles y generalmente legales. Los adulterantes denominados activos, pueden aumentar o imitar la acción del ingrediente principal de la droga. Ejemplos de adulterantes activos más comunes lo integran la cafeína, la cual posee propiedades estimulantes similares aunque menos potentes que la cocaína y anfetamina (Antoniou y cols. 1998), el paracetamol el cual posee propiedades analgésicas al igual que la heroína, y lidocaína y anfetamina que potencian el efecto de la cocaína (Simonsen y cols. 2003; Goldstein y cols. 2009; Evrarda y cols. 2010; Cole y cols. 2011). Otros adulterantes pueden facilitar la administración de la droga, especialmente aquellos que pueden hacer que la volatilización de la droga sea más eficiente. Por ejemplo, se ha observado que tanto la cafeína como la procaína vaporizan la heroína a una temperatura menor facilitando su consumo (Huizer 1987). Los análisis publicados sobre drogas de abuso ilegales demuestran únicamente la presencia o ausencia de adulterantes, sin aportar datos sobre su cuantificación. En estos casos muchas veces no es posible distinguir entre la simple contaminación (durante el almacenado o transporte) o la adición intencional del adulterante, dejando en evidencia la necesidad de realizar un análisis químico más completo de las drogas de abuso ilegales.

5. ANTECEDENTES PARTICULARES DE NUESTRO GRUPO DE TRABAJO.

Composición química de muestras de Pasta Base de Cocaína

Hasta nuestro conocimiento, el trabajo publicado por ElSohly y cols. era la única evidencia científica que aportaba información sobre el contenido químico de muestras de PBC provenientes de Perú y Colombia (ElSohly y cols. 1991). Estos autores demostraron que las muestras contenían un alto porcentaje de cocaína así como otros alcaloides en menor proporción tales como ecgonina, benzoilecgonina, trans y cis-cinamoil cocaína. A su vez, los autores identificaron ácido benzoico, manganeso e hidrocarburos aromáticos, similares a los presentes en la gasolina. Sin embargo, el reporte de ElSohly no menciona la presencia de adulterantes en las muestras de PBC.

Debido a la escasa evidencia publicada sobre la composición química de muestras de PBC, nuestro grupo de investigación se centró en el análisis químico de muestras del Uruguay. Las mismas fueron proporcionadas, mediante un mecanismo legal, por el Instituto Técnico Forense con la autorización de la Junta Nacional de Drogas. En particular, las muestras provinieron de incautaciones realizadas en las fechas 24/12/2007, 8/2/2008, 11/3 y 14/7/2009. Se utilizaron dichas fechas para su denominación, así como si correspondían a gotas o tizas (Tabla 1).

Tabla 1- Denominación de las muestras de PBC.

Fecha de Incautación	Denominación muestras
1) Gota 24/12/2007	PBC 1
2) Tiza 24/12/2007	PBC 2
3) Gota 08/02/2008	PBC 3
4) Tiza 08/02/2008	PBC 4
5) Tiza 11/03/2009	PBC 5
6) Tiza 11/03/2009	PBC 6
7) Gota 14/07/2009	PBC 7

El análisis cualitativo de siete muestras de PBC provenientes de distintas incautaciones (PBC 1-7) fue realizado utilizando el equipamiento institucional del Polo Tecnológico de Pando (Facultad de Química, UdelAR) en colaboración con el Sr. Eleuterio Umpiérrez. El mismo fue realizado a través de la técnica de cromatografía de gases acoplada a un detector de masa (GC/MS). En todas las muestras de PBC se detectó cocaína como principal alcaloide así como también se detectó la presencia de otros alcaloides tales como trans y cis-cinamoilcocaína y metil-ecgonina (Tabla 2). Por otra parte, cafeína fue el único adulterante encontrado en estas muestras, mientras que no se evidenció la presencia de lidocaína ni anfetamina.

Tabla 2- Análisis cualitativo de muestras de PBC.

Muestra	Alcaloides				Adulterantes		
	Cocaína Base	Trans-cinamoil cocaína	Cis-cinamoil cocaína	Metil-ecgonina	Cafeína	Lidocaína	Anfetamina
PBC 1	✓	✓	✓	✓	✓	ND	ND
PBC 2	✓	✓	✓	✓	✓	ND	ND
PBC 3	✓	✓	✓	✓	✓	ND	ND
PBC 4	✓	✓	✓	✓	✓	ND	ND
PBC 5	✓	Nd	Nd	Nd	✓	ND	ND
PBC 6	✓	Nd	Nd	Nd	✓	ND	ND
PBC 7	✓	Nd	Nd	Nd	✓	ND	ND

Tabla 2. Análisis cualitativo de las 7 muestras de PBC (PBC 1-7) realizado mediante GC/MS. Se utilizaron soluciones estándares para evaluar la presencia de alcaloides y adulterantes. ND: no detectado; Nd: No determinado.

Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de las muestras mediante el uso del equipamiento institucional del IIBCE en colaboración con Dr. Q.F. Andrés Abin-Carriquiry y la Bq. Marcela Martínez (Depto. de Neuroquímica, IIBCE). El mismo fue realizado utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

Como se puede observar en la Tabla 3, el contenido de cocaína base en las muestras de PBC varió entre un 20 y un 70 %, mientras que el contenido de cafeína estuvo en un rango de 1 a 15 %. El análisis también demostró que, en algunas muestras, los otros alcaloides trans y cis-cinamoil cocaína y metil-ecgonina se detectaron en cantidades muy bajas (0.1 - 4 %). Estos datos no se muestran en la Tabla 3 debido a que no pudieron ser analizadas la totalidad de las muestras.

Tabla 3- Análisis cuantitativo de muestras de PBC.

Muestra	% cocaína base	% cafeína base
PBC 1	68.9 ± 3.6	15.0 ± 0.1
PBC 2	67.4 ± 1.2	14.0 ± 0.2
PBC 3	59.3 ± 0.6	14.0 ± 0.1
PBC 4	59.9 ± 4.5	14.0 ± 0.5
PBC 5	68.2 ± 2.0	1.0 ± 0.5
PBC 6	50.2 ± 1.0	1.0 ± 0.5
PBC 7	20.7 ± 0.2	10.3 ± 0.5
Cocaína	89.6 ± 0.0	-
Cafeína	-	100.0 ± 0.0

Tabla 3. Análisis cuantitativo de las muestras de PBC 1-7 realizado por HPLC-DAD. Los datos están expresados como Medias ± EEM. La cuantificación de cocaína y cafeína base se realizó tomando como referencia soluciones estándares de cocaína y cafeína, respectivamente.

La información obtenida del análisis químico realizado nos permitió caracterizar algunos componentes de la composición química de muestras de PBC de nuestro país, proveyendo un análisis cuali y cuantitativo sobre el contenido de cocaína base, impurezas y adulterantes (Moraes y cols. 2010). Dado que estas muestras son las que potencialmente consumen los usuarios, también aportamos información sobre la calidad del contenido de las mismas. El análisis químico de las muestras de PBC del Uruguay reveló una similitud en su composición con los resultados descritos por ElSohly, sugiriendo que ambos tipos de muestras podrían tener un origen similar. Sin embargo, aparece cafeína como adulterante en las muestras de PBC del Uruguay, proporcionando un dato original. Siendo cocaína y cafeína dos psicoestimulantes con actividad biológica conocida, es altamente probable que ambos componentes incidan en el efecto farmacológico inducido por la PBC.

En base a todos los antecedentes mencionados, se hace evidente la necesidad de aportar información pre-clínica que aborde el estudio de los factores y mecanismos que subyacen a la alta y rápida dependencia asociada a la PBC así como aquellos que intenten explicar el perfil clínico característico que se genera luego de su consumo. Considerando la variabilidad en la composición química de la PBC y sumado al hecho de que se vende adulterada, es indudable que además de la vía de administración, la composición química de las muestras de PBC podría ser un factor relevante a considerar en las acciones farmacológicas de la droga y en el aporte de información para explicar el perfil clínico característico de sus consumidores.

Dado que hasta el momento no había evidencias acerca de las acciones farmacológicas de la PBC, es necesario comenzar con la caracterización del efecto estimulante inducido luego de su administración aguda así como evaluar la participación del sistema DAérgico y 5-HTérgico en su mecanismo de acción. Esta serie de experimentos permitirán contar con una base de información para luego profundizar en otras propiedades farmacológicas de la droga.

II. HIPÓTESIS de TRABAJO.

La hipótesis de trabajo de la presente Tesis de Maestría se basa en que la composición química de la PBC es un factor que incide en sus acciones sobre el SNC. En particular, siendo cocaína y cafeína los principales componentes detectados en la mayoría de las muestras de PBC analizadas, postulamos que ambos compuestos serían los principales responsables de los efectos farmacológicos inducidos por la droga.

III. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general del trabajo fue estudiar el papel de la cocaína y la cafeína de la PBC en los efectos comportamentales de la droga, en particular en su acción estimulante y en la conducta agresiva. Adicionalmente, se evaluaron los efectos neuroquímicos de la PBC sobre el sistema dopaminérgico y serotoninérgico en dos regiones cerebrales del circuito mesocorticolímbico.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1) CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE MUESTRAS DE PBC.

1.1. Caracterización del **efecto estimulante** en ratas inducido por la administración sistémica aguda de una serie de muestras de PBC con distinta composición química mediante el uso del modelo de Campo Abierto.

1.1.1 Selección de muestras de PBC (PBC 1, 5 y 7) y realización de curvas dosis-respuesta.

1.2. Caracterización de la **conducta de agresión** en ratas inducida por la administración sistémica aguda de una muestra de PBC (PBC 1) utilizando el modelo de agresión inducido por aislamiento. Evaluación del efecto residual.

1.2.1. Correlato comportamental de registro de locomoción de los residentes durante el modelo de agresión.

2) CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE PBC.

2.1. Determinación de los cambios neuroquímicos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF inducidos luego de la administración sistémica aguda de PBC 1. Correlato neuroquímico de los cambios observados en los animales residentes en el día del Test en el modelo de agresión por aislamiento.

2.2. Determinación de los cambios neuroquímicos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF en los animales residentes sometidos al día Post-test en el modelo de agresión por aislamiento.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Animales.

Se utilizaron ratas macho de 2-3 meses de edad, de la cepa Wistar de 250-320 gramos de peso (N= 170). Los animales fueron obtenidos del Bioterio del IIBCE, mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad (7:00 AM-7:00 PM), alimentación y agua *ad libitum*. Fueron criados y alojados en cajas de 48.0 x 37.5 x 21.0 cm en grupos de 6 animales, excepto en los experimentos de agresión en los cuales se procedió al aislamiento individual de un grupo de animales (ver Objetivo 2, ítem 2.2). Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las normas éticas establecidas y aprobadas por la Comisión de Bioética del IIBCE (Nº de protocolo 001/03/2009) y de acuerdo con la Ley Nacional Nº 18.611 de experimentación animal.

2. Drogas.

2.1. Muestras de PBC.

Para la realización de los experimentos desarrollados durante la Tesis se seleccionaron tres muestras de PBC (PBC 1, 5 y 7) de acuerdo a su contenido químico. Para la realización de los experimentos comportamentales y neuroquímicos las muestras de PBC fueron disueltas en una solución vehículo de ácido clorhídrico (HCl) al 2 % y agua destilada (grupo control). La solución fue llevada a un pH= 6.3 con hidróxido de sodio, para su correcta administración sistémica en animales.

2.2. Cocaína y cafeína.

Tanto el alcaloide de cocaína (en su forma de clorhidrato) como la cafeína fueron obtenidas de Sigma-Aldrich en estado puro (sin cortes ni adulteraciones). Para la realización de los experimentos, ambas fueron disueltas en agua destilada como vehículo (grupo control).

3. Dosis de PBC y vía de administración.

La PBC fue inyectada a dosis equivalentes de cocaína base en un rango de 1-20 mg/kg, tomando como referencia el porcentaje del alcaloide cocaína de cada una de las muestras. Este rango de dosis fue seleccionado en base a la literatura existente para cocaína evaluando sus efectos en distintos paradigmas, algunos de los cuales fueron utilizados en el transcurso de esta Tesis (Miczek y O'Donnell 1978; Miczek 1979; Darmani y cols. 1990; Kuczenski y cols. 1991; Bedingfield y cols. 1998). Esta estrategia permitió estudiar directamente el papel del alcaloide cocaína en los efectos farmacológicos inducidos por PBC e indirectamente el papel de los otros componentes (impurezas y adulterantes) presentes en las muestras de PBC. En todos los

experimentos, los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal (i.p.). El volumen de inyección fue fijado en 1 ml/kg y se corrigió cuando se administraron las dosis equivalentes de PBC.

4. Análisis estadístico.

Los datos fueron expresados como la Media $\pm$ Error Estándar de la Media (EEM). La distribución de los datos fue evaluada a través del test Kolmogorov-Smirnov. Según las comparaciones, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía de muestras independientes seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls, así como el Test *t*-Student para muestras pareadas o independientes. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad Prism 5.01. La significancia estadística fue fijada en $P < 0.05$.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1.

CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE MUESTRAS DE PBC.

1.1. *Caracterización del **efecto estimulante** en ratas inducido por la administración sistémica aguda de una serie de muestras de PBC con distinta composición química mediante el uso del modelo de Campo Abierto.*

Con el objetivo de caracterizar el efecto estimulante de la PBC y, a su vez, evaluar el papel de la cocaína (base) y cafeína en su contenido, tres muestras de PBC fueron seleccionadas como representativas de la composición química diferente obtenida en el análisis químico (ver Tabla 3). La muestra PBC 1 fue seleccionada como representativa de PBC con un alto contenido en cocaína base y cafeína (68.9 % y 15 %, respectivamente); la muestra PBC 5 fue seleccionada como representativa de un alto contenido en cocaína base (68.2 %) y bajo contenido en cafeína (1 %), mientras que la muestra PBC 7 fue elegida por su bajo contenido en cocaína base (20.7 %) y alto contenido en cafeína (10.3 %). A su vez, otros grupos experimentales fueron inyectados con cocaína y cafeína puras así como con la co-administración de cocaína + cafeína, los cuales fueron incluidos en la caracterización comportamental. Los animales control fueron inyectados con sus respectivos vehículos. Los grupos tratados así como las dosis inyectadas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4- Grupos experimentales para el estudio del efecto estimulante inducido por PBC.

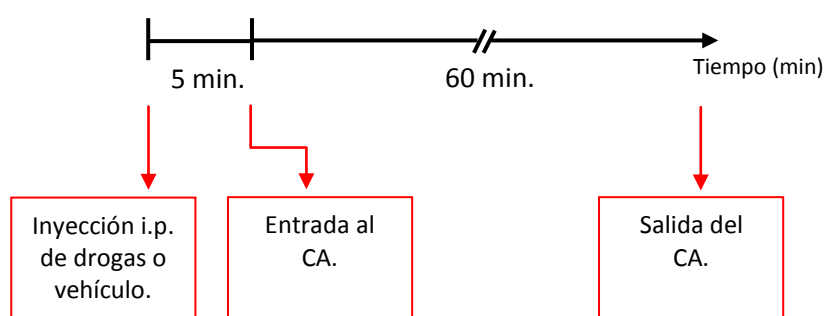
GRUPOS EXPERIMENTALES	
Tratamiento	Dosis
PBC 1	Equivalente a 1, 5, 10 y 20 mg/kg de cocaína base.
PBC 5	Equivalente a 1, 5, 10 y 20 mg/kg de cocaína base.
PBC 7	Equivalente a 1 y 5 mg/kg de cocaína base.
Cocaína	1, 5, 10 y 20 mg/kg.
Cafeína	2.5 y 4.5 mg/kg.
Cocaína + Cafeína	Coc (5 mg/kg) + Caf (2.5 mg/kg).
	Coc (20 mg/kg) + Caf (4.5 mg/kg).

Tabla 4. La tabla muestra los diferentes grupos experimentales para las muestras de PBC 1, 5 y 7, cocaína, cafeína y la co-administración de cocaína + cafeína.

Procedimiento experimental.

Los animales fueron trasladados en sus cajas desde el Bioterio al cuarto experimental, pesados y marcados 24 hs. antes del inicio del experimento, permitiendo así su aclimatación al ambiente nuevo. Las condiciones de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y ciclo de luz-oscuridad (07:00-19:00) del cuarto experimental fueron similares a las del Bioterio. Los animales fueron inyectados en forma i.p. con los diferentes tratamientos y 5 min. después fueron colocados en el modelo de Campo Abierto (CA) con el fin de registrar la actividad locomotora como un parámetro indicativo del efecto estimulante (Esquema 1). Los animales control fueron inyectados con los respectivos vehículos.

Esquema 1- Protocolo experimental para evaluar el efecto estimulante de PBC.



Esquema 1. Protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto estimulante inducido por drogas (PBC 1, 5 y 7, cocaína, cafeína, co-administración de cocaína y cafeína) y vehículo durante 60 min., utilizando el modelo de campo abierto (CA).

El CA consiste en exponer a un animal a una arena abierta y dejarlo que explore libremente por un período de tiempo. El paradigma se basa en una situación de conflicto natural entre la exploración del ambiente nuevo y la aversión que le provoca al animal los espacios abiertos y luminosos (Montgomery y Monkman 1955; Archer 1973; Lamprea y cols. 2008). La arena consiste en una superficie cuadrada (60 x 60 cm), con paredes de acrílico rojas de 40 cm de alto. Los experimentos fueron filmados mediante una cámara asociada a un software de video-seguimiento llamado Ethovision 7.0 (Noldus, The Netherlands). La actividad locomotora, medida a través de la distancia total recorrida en metros (m), fue registrada automáticamente durante 60 min.

Al finalizar cada registro, la caja fue limpiada con alcohol al 30 %, antes de colocar el siguiente animal. Los experimentos fueron realizados entre las 9:00 y las 14:00 hs. En todos los experimentos, los animales fueron *naive* al CA y utilizados una única vez.

1.2. Caracterización de la *conducta de agresión* en ratas inducida por la administración sistémica aguda de una muestra de Pasta Base de cocaína, PBC 1, utilizando el modelo de agresión inducido por aislamiento. Evaluación del efecto residual.

Para llevar a cabo estos experimentos utilizamos el modelo de agresión inducido por aislamiento en ratas macho, mediante el cual se evaluó la conducta agresiva de un animal residente, generada por territorialidad. Este modelo es una variante del paradigma residente-intruso (Olivier y Young 2002). Ambos modelos han sido muy estudiados y utilizados para elucidar la acción de drogas de abuso en agresión y/o déficits conductuales sociales (Miczek y O'Donnell 1978; White y cols. 1991; Rilke y cols. 1998; Koike y cols. 2009). Para esta serie de experimentos, se seleccionó la muestra PBC 1 con el fin de caracterizar su efecto comportamental sobre las conductas agresivas luego de un tratamiento agudo y sistémico. A su vez, con el objetivo de determinar el papel del alcaloide cocaína en el efecto inducido por PBC 1 sobre las conductas agresivas, un grupo de animales fue inyectado con cocaína y su efecto comportamental sobre la agresión también fue evaluado. El grupo control fue inyectado con los respectivos vehículos.

Procedimiento experimental.

Se utilizó el protocolo experimental de Banjaw y cols. (2006) con algunas modificaciones (Esquema 2). Los animales seleccionados como residentes, de 3 meses de edad, fueron aislados individualmente en cajas de acrílico (48.0 x 37.5 x 21.0 cm) durante 12 días. Con el fin de favorecer el desarrollo de territorialidad por condicionamiento olfativo, durante ese período no se les realizó cambio de cama, ni ninguna alteración en su alojamiento, manteniéndoles únicamente constante el libre acceso a comida y agua.

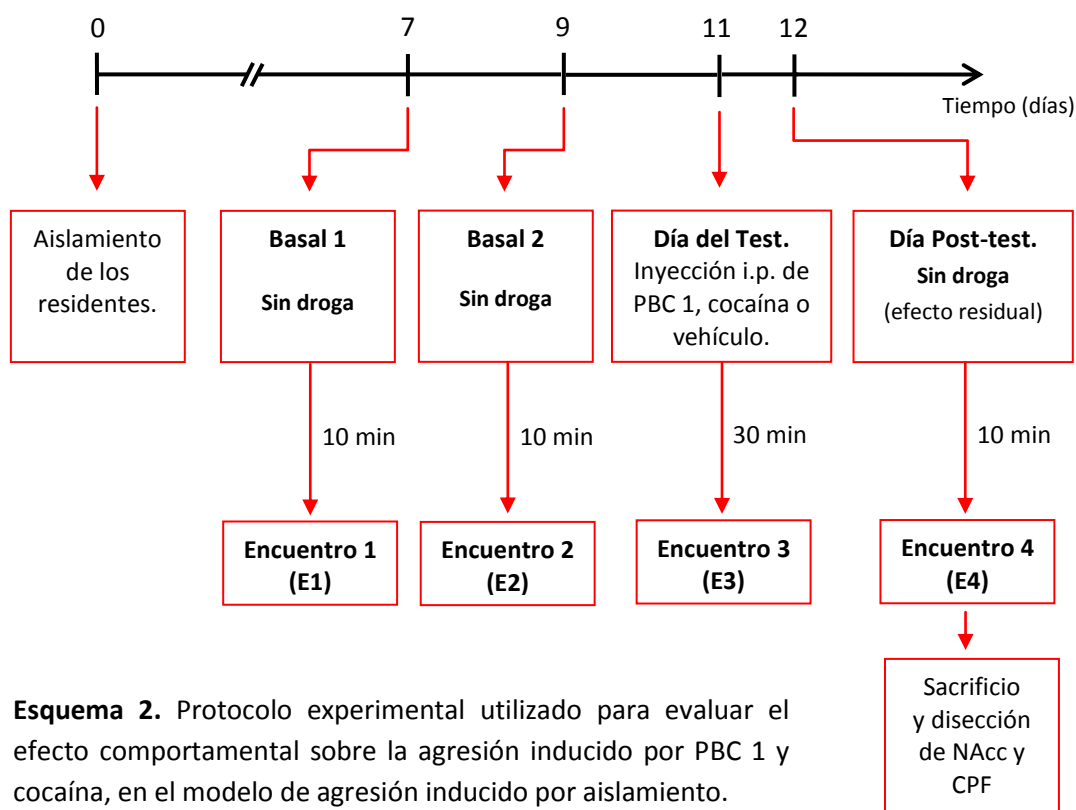
Los encuentros entre el residente y el intruso se realizaron de la siguiente manera:

- Día 7: el residente fue inmovilizado durante 1 min. y 9 min. después se introdujo un animal intruso en su caja y se registraron las diferentes conductas durante 10 min. (**Encuentro basal 1, E1**).
- Día 9: se realizó el mismo procedimiento utilizado en el E1 y se registraron las diferentes conductas durante 10 min. (**Encuentro basal 2, E2**).
- Día 11: los residentes fueron inyectados con PBC 1 a una dosis equivalente de cocaína base de 10 mg/kg, cocaína 10 mg/kg o sus respectivos vehículos. 30 min. después se realizó el encuentro con un animal intruso y se registraron las diferentes conductas durante 15 min. (**Día del Test, E3**).
- Día 12: los residentes fueron inmovilizados durante 1 min. y 9 min. después se introdujo un animal intruso en su caja y se registraron las diferentes conductas durante 10 min (**Día Post-test, E4**). Este último encuentro se

realizó con el fin de evaluar el efecto residual de las drogas sobre las conductas registradas el día del Test. Al finalizar el encuentro, los residentes fueron sacrificados y las regiones del NAcc y las CPF medial y lateral fueron disecadas (ver objetivo 2.2).

La maniobra de inmovilización de los residentes (en los días 7, 9 y 12) se realizó con el fin de someter al animal al mismo efecto estresante que puede sufrir durante la inyección de la droga o el vehículo en el día del Test. En cada uno de los encuentros y con el fin de permitir su adaptación al ambiente, los residentes e intrusos fueron trasladados al cuarto experimental 45 min. antes del inicio de cada experimento. Al finalizar cada uno de los encuentros basales, los animales fueron trasladados nuevamente al Bioterio excepto en los días del Test y Post-test. Los animales intrusos tuvieron 1 mes de edad y 50 gr menos que los residentes. Asimismo, fueron agrupados en cajas de a 5-6 animales que se limpiaron 3 veces a la semana. Durante el primer encuentro los intrusos seleccionados no poseían experiencia de lucha. Para los siguientes encuentros, no se repitió el mismo animal intruso para cada residente. Todos los encuentros fueron filmados a través de una cámara Sony. El registro de las conductas se realizó posteriormente a través del análisis de los videos. Cada video se evaluó dos veces consecutivas. Con el fin de corroborar las conductas observadas y cuantificadas, algunos videos fueron seleccionados al azar para ser evaluados por otro investigador.

Esquema 2- Protocolo experimental para evaluar el efecto de PBC 1 sobre la conducta de agresión en ratas.



Esquema 2. Protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto comportamental sobre la agresión inducido por PBC 1 y cocaína, en el modelo de agresión inducido por aislamiento.

En cada encuentro se registraron los siguientes parámetros: 1) conductas agresivas, 2) conductas no agresivas y 3) conducta exploratoria.

1) Las siguientes conductas agresivas fueron registradas en frecuencia y tiempo (Figura 5 A-E):

a) ataques, definiendo esta conducta cuando el residente ataca en el cuello o en los flancos del intruso;

b) mordidas, identificadas cuando la boca del residente está en contacto con el cuerpo del intruso, y éste emite vocalizaciones;

c) enfrentamientos, identificando esta conducta como una postura erguida, enfrentada y en posición amenazante del residente al intruso, con o sin movimientos de las patas delanteras del residente (incluye *boxing* y postura de ataque);

d) inmovilizaciones, definida como la posición que adopta el residente sobre el intruso, manteniéndolo contra el suelo sin permitir su movimiento;

e) patadas, comúnmente realizadas con las patas traseras.

Asimismo, se cuantificó la latencia de aparición de la primera conducta agresiva (en segundos).

Figura 5- Comportamiento agresivo que adopta el residente en el modelo de agresión inducido por aislamiento.

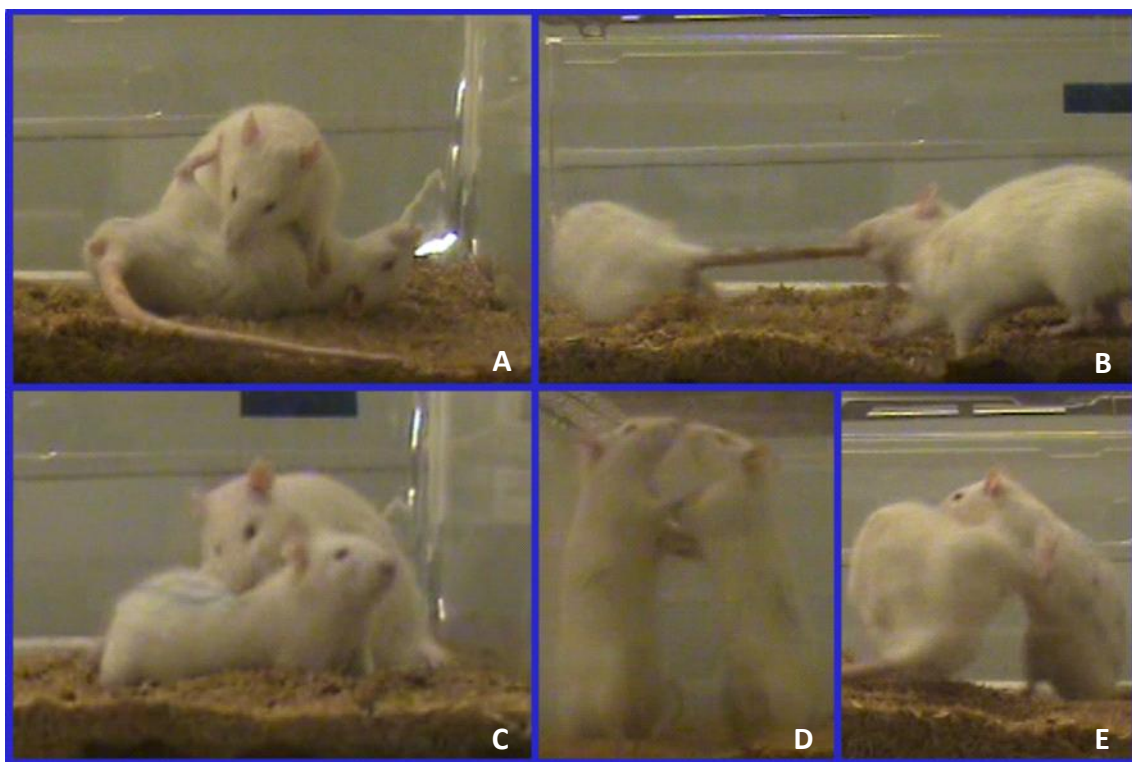


Figura 5. Conductas agresivas desplegadas por el animal residente: inmovilización (A), mordida (B), ataque (C), enfrentamiento (D) y patada (E). El animal intruso se identifica con marcador azul en el lomo.

2) Conducta no agresiva, registrada en tiempo (Figura 6 A): tiempo de investigación social, definido como olfateo corporal o anogenital.

3) Conducta exploratoria vertical o *rearings* (no dirigida al intruso) registrada como frecuencia (Figura 6 B): se define como la conducta que refleja la actividad exploratoria del residente.

Figura 6- Conducta no agresiva y de exploración desplegadas por el animal residente, en el modelo de agresión inducido por aislamiento.

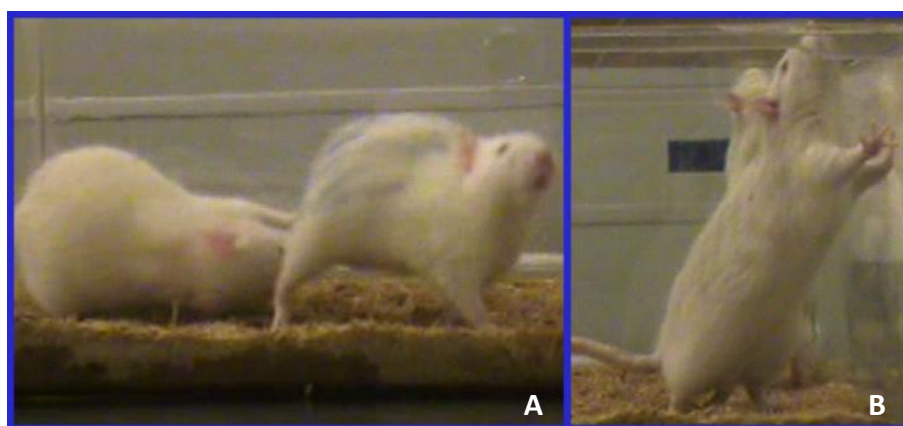


Figura 6. Conducta no agresiva y de exploración adoptada por el animal residente: tiempo de investigación social (A) y *rearings* (B). El animal intruso se identifica con marcador azul en el lomo.

Una vez finalizados los encuentros y analizados los videos, se consideró como criterio de inclusión a aquellos residentes que tuvieron al menos una conducta agresiva durante el E1 o E2. El resultado generó un grupo experimental de N=7 para cada tratamiento.

1.2.1. Correlato comportamental de registro de locomoción de los residentes durante el modelo de agresión.

El correlato comportamental de la actividad motora de los animales residentes durante el día del Test (E3) se extrajo del período comprendido entre los 25 y 40 min de actividad de animales tratados con PBC 1 (dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base), cocaína (10 mg/kg) y vehículo, registrada para el estudio del efecto estimulante durante 60 min. El período seleccionado (15 min.) coincide con el tiempo de registro de la conducta agresiva en animales residentes que fueron inyectados a las mismas dosis que las utilizadas para el estudio del efecto estimulante (ver Objetivo 1.1).

OBJETIVO ESPECÍFICO 2.

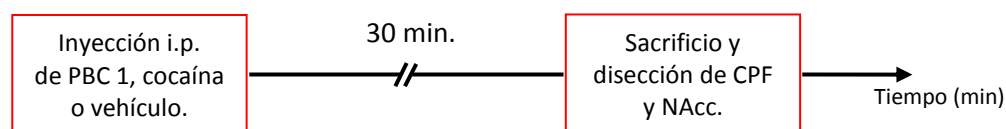
CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE PBC.

2.1. *Determinación de los cambios neuroquímicos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF inducidos luego de la administración sistémica aguda de PBC 1, como correlato neuroquímico de los cambios observados en los animales residentes en el día del Test en el modelo de agresión por aislamiento.*

Procedimiento experimental.

Para llevar a cabo esta serie de experimentos, se administró PBC 1 a una dosis equivalente de cocaína base de 10 mg/kg. De modo comparativo, otra serie de animales fueron inyectados con cocaína a una dosis de 10 mg/kg mientras que los animales control fueron inyectados con sus respectivos vehículos. Luego de 35 min. los animales fueron sacrificados por decapitación y las regiones de NAcc, CPF medial, lateral y total fueron disecadas. Las muestras de tejido se almacenaron en *freezer* a -80 °C hasta el día de su procesamiento (Esquema 3).

Esquema 3- Protocolo experimental para la evaluación del efecto neuroquímico inducido por PBC 1.



Esquema 3. Protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto neuroquímico inducido por la administración sistémica de PBC 1 y cocaína.

Cabe señalar que estos experimentos constituyeron el correlato de los cambios neuroquímicos inducido por la PBC 1 en los animales residentes durante el día del Test (E3) en el modelo de agresión por aislamiento.

Para la cuantificación de DA en el NAcc y de 5-HT en la CPF medial, lateral y total se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-DE). Las muestras de tejido fueron pesadas y posteriormente sonicadas en un volumen de ácido perclórico 0.1 M de acuerdo al peso de la muestra (300 µl para CPF y 600 µl para NAcc). El homogenato fue centrifugado a 15.000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue inyectado en el HPLC-DE.

El sistema de HPLC (PM-80 BAS, West Lafayette, IN, USA) está equipado con una columna de fase reversa C-18 (partículas de 5 µm, 150 mm × 3.4 mm; Phenomenex,

USA), un detector amperométrico (BAS LC- 4C) equipado con un electrodo de trabajo de carbón vítreo y un registrador gráfico (BAS). El flujo de la fase móvil fue fijado en 1.2 ml/min y su composición, para un volumen de 1 l, fue la siguiente: ácido cítrico (0.15 M), octilsulfato de sodio (0.6 mM), 4 % de acetonitrilo y 1.6 % tetrahidrofurano a pH 3.0. La sensibilidad del detector se ajustó según las necesidades entre 5 y 20 nA, mientras que el potencial de oxidación se fijó en 0.65 V, utilizando el electrodo de trabajo y referencia de Ag/AgCl para mantener esa medida.

La DA, 5-HT y sus principales metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) y el 5-HIAA, respectivamente, fueron calculados en nanogramos por gramo de tejido (ng/gr). La relación entre DOPAC/DA y 5-HIAA/5-HT fueron calculadas como indicadores del recambio (*turnover*) dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF medial, lateral y total, respectivamente.

2.2. Determinación de los cambios neuroquímicos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF en los animales residentes sometidos al día Post-test en el modelo de agresión por aislamiento.

Con el fin de estudiar el efecto neuroquímico residual de PBC 1, los animales residentes fueron sacrificados por decapitación inmediatamente después de finalizado el ensayo del Post-test en el modelo de agresión por aislamiento. Se disecaron las regiones de NAcc y CPF medial y lateral, las cuales fueron almacenadas en un *freezer* a -80°C hasta el día de su procesamiento. Los niveles tisulares de DA y DOPAC en el NAcc y de 5-HT y 5-HIAA en la CPF medial y lateral fueron cuantificados en condiciones similares a las descritas en el ítem 2.1 (Esquema 3).

CAPITULO I

CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE MUESTRAS DE PBC

1.1 *Caracterización del efecto estimulante en ratas inducido por la administración sistémica aguda de una serie de muestras de PBC con distinta composición química mediante el uso del modelo de Campo Abierto.*

La caracterización del efecto estimulante de las muestras de PBC seleccionadas (PBC 1, 5 y 7) se realizó en base a una curva dosis-respuesta de la actividad locomotora de los animales registrada en un período de 60 min. El efecto inducido por cada dosis de PBC fue comparado con cocaína (pura). Así, los animales fueron tratados con las muestras PBC 1 y 5 a las dosis equivalentes de 1, 5 y 10 mg/kg de cocaína base; PBC 7 fue inyectada a las dosis equivalentes de 1 y 5 mg/kg de cocaína base, mientras que cocaína fue inyectada bajo las mismas condiciones a las dosis de 1, 5 y 10 mg/kg. Los resultados se muestran en las Figuras 7-14 para cada una de las muestras de PBC. Cabe aclarar que los animales inyectados con el vehículo de PBC y el de cocaína no presentaron diferencias significativas en su actividad locomotora (49.8 ± 4.8 y 59.1 ± 8.2 , respectivamente). Por lo tanto, la actividad de ambos grupos fue unificada constituyendo el grupo control.

Como observación general la distancia recorrida de los animales a lo largo del tiempo registrado mostró una tendencia a disminuir en forma dependiente del tiempo de registro (Fig. 7-14). Este hecho refleja el proceso de habituación de los animales al campo abierto, siendo los más activos los primeros 5 min. del registro (fase exploratoria).

En la Figura 7 A-B se representa la actividad locomotora de animales tratados con PBC 1 a la dosis equivalente de 1 mg/kg de cocaína base. Como se puede observar, PBC 1 no afectó la distancia recorrida realizada por los animales respecto al grupo control. Cocaína indujo un aumento significativo en la actividad locomotora ($p < 0.05$) y se evidenció una diferencia significativa entre ambas drogas ($p < 0.05$; Fig. 7 B).

Figura 7- Actividad locomotora inducida por PBC 1 (1).

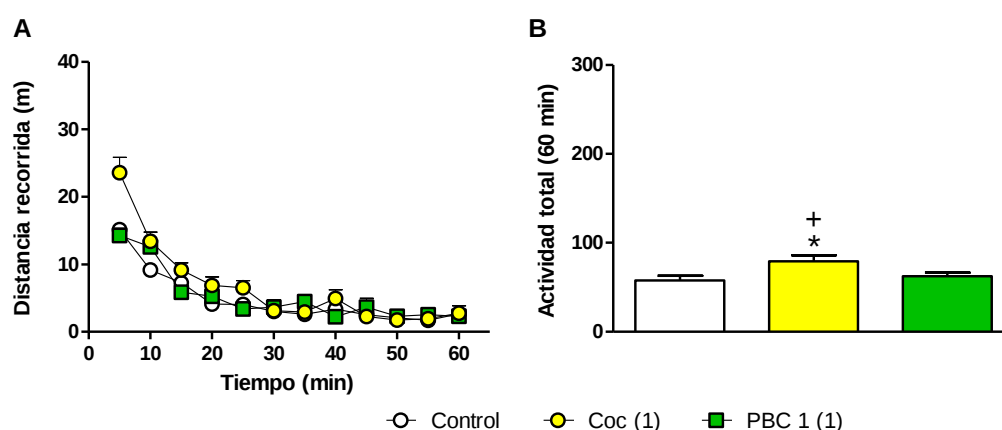


Figura 7. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 1 a la dosis equivalente de 1 mg/kg de cocaína base, cocaína 1 mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control; + = diferencia significativa PBC 1 vs cocaína. No hubo diferencias significativas entre PBC 1 y control. *, + = $p < 0.05$. N=6-7.

La actividad locomotora de animales tratados con PBC 1 a la dosis equivalente de 5 mg/kg de cocaína base se muestra en la Figura 8 A-B.

Figura 8- Efecto estimulante inducido por PBC 1 (5).

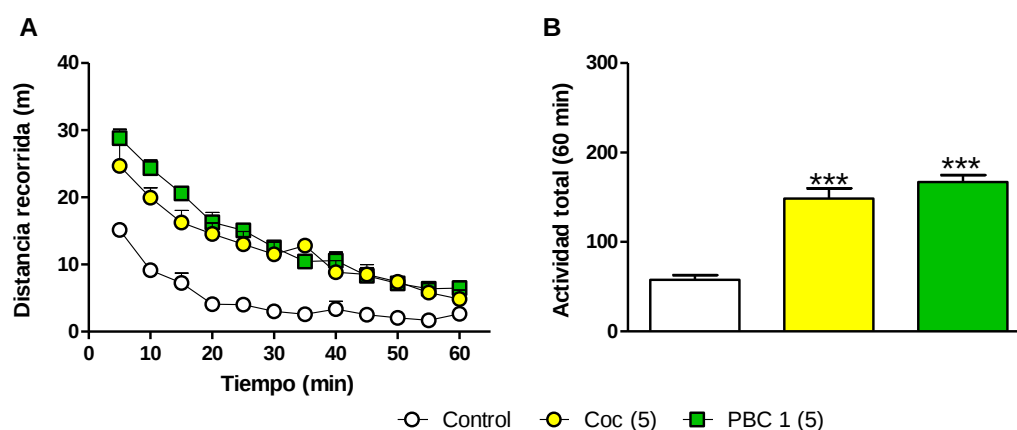


Figura 8. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 1 a la dosis equivalente de 5 mg/kg de cocaína base, cocaína 5mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control. *** = $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre PBC 1 y cocaína. N= 6-7.

PBC 1 indujo un aumento significativo en la locomoción de los animales comparado con el grupo control ($p < 0.001$), demostrando el efecto estimulante inducido por la

droga. Asimismo, el grupo tratado con cocaína (5 mg/kg) aumentó significativamente la distancia recorrida ($p < 0.001$). No se evidenciaron diferencias significativas entre ambas drogas (Fig. 8 B).

La Figura 9 A-B muestra la actividad locomotora de animales tratados con PBC 1 a la dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base.

Figura 9- Efecto estimulante inducido por PBC 1 (10).

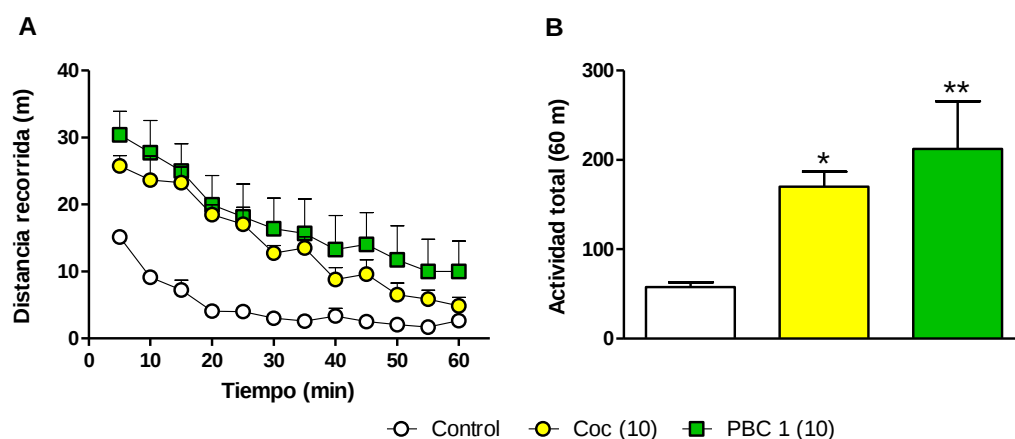


Figura 9. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 1 a la dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$. No hubo diferencias significativas entre PBC 1 y cocaína. N= 5-6.

Como se observa en la Figura 9, PBC 1 generó un efecto hiperlocomotor respecto al grupo control ($p < 0.01$). De manera similar, cocaína administrada a la dosis de 10 mg/kg aumentó en forma significativa la locomoción de los animales ($p < 0.05$) y no se observaron diferencias significativas entre ambas drogas (Fig. 9 B).

En las Figuras 10, 11 y 12 A-B se muestran los resultados de la actividad de los animales inyectados con PBC 5 a las dosis equivalentes de 1, 5 y 10 mg/kg de cocaína base, respectivamente.

El análisis estadístico reveló que la administración de PBC 5 a la dosis equivalente de 1 mg/kg de cocaína base potenció significativamente la actividad locomotora de los animales comparado con el grupo control ($p < 0.05$, Fig. 10). Este resultado pone en evidencia el efecto estimulante de la PBC 5. Sin embargo, este aumento no fue significativamente diferente al inducido por cocaína a la dosis de 1 mg/kg (Fig. 10 B).

Figura 10- Efecto estimulante inducido por PBC 5 (1).

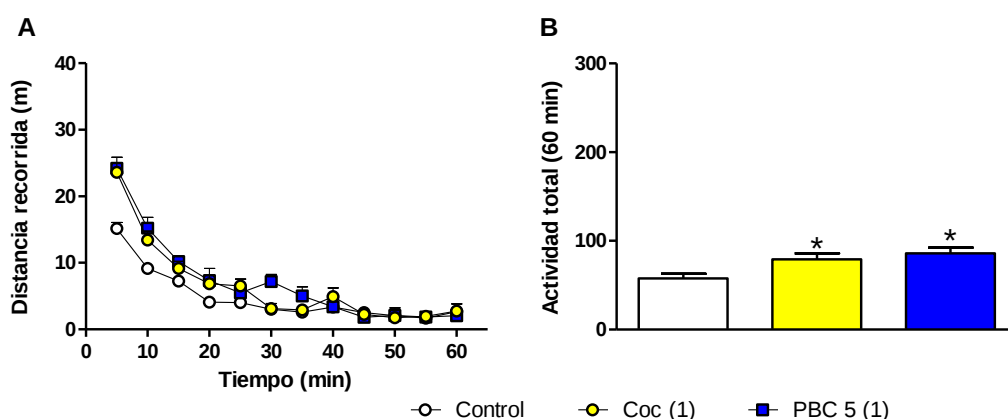


Figura 10. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 5 a la dosis equivalente de 1 mg/kg de cocaína base, cocaína 1 mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= diferencia significativa vs grupo control. *= $p < 0.05$. No hubo diferencias significativas entre PBC 5 y cocaína. N= 5-7.

La Figura 11 A-B representa la distancia recorrida de animales tratados con PBC 5 a la dosis equivalente de 5 mg/kg de cocaína base. Como se puede apreciar, PBC 5 potenció significativamente la actividad de los animales ($p < 0.01$). Este aumento no fue significativamente diferente al inducido por cocaína inyectada a la dosis de 5 mg/kg (Fig. 11 B).

Figura 11- Efecto estimulante inducido por PBC 5 (5).

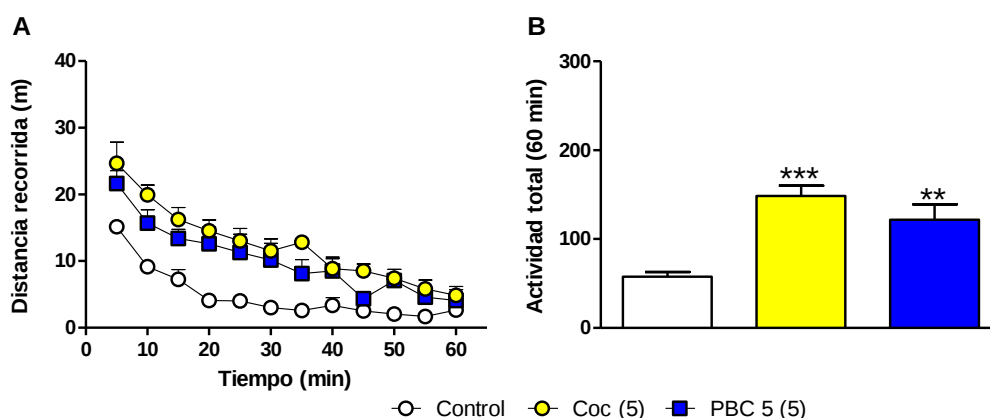


Figura 11. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 5 a la dosis equivalente de 5 mg/kg de cocaína base, cocaína 5 mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= diferencia significativa vs grupo control. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre PBC 5 y cocaína. N= 6-7.

En la Figura 12 A-B se muestra el efecto inducido por la PBC 5 inyectada a la dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base sobre la actividad locomotora.

Figura 12- Efecto estimulante inducido por PBC 5 (10).

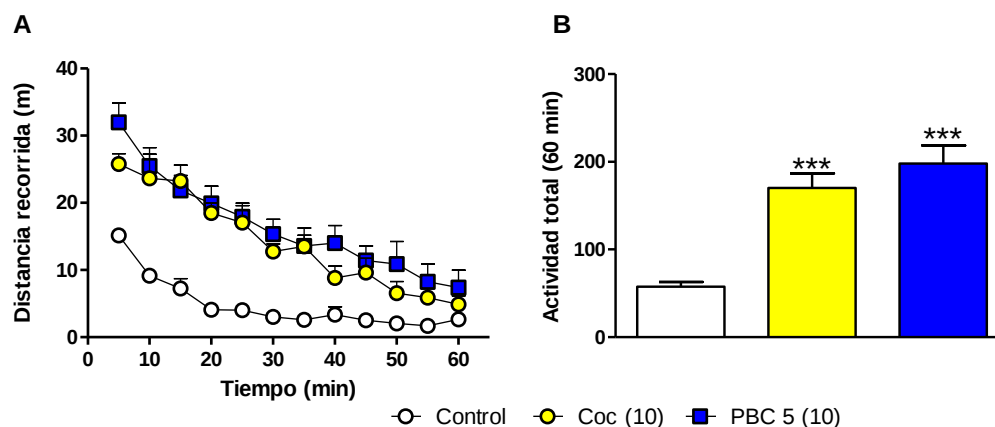


Figura 12. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 5 a la dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control. *** = $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre PBC 5 y cocaína. N= 6-7.

Al igual que lo obtenido para las dosis anteriores, PBC 5 incrementó significativamente la actividad locomotora de los animales, comparado con el grupo control ($p < 0.001$). Asimismo, cocaína indujo un efecto similar sin diferenciarse del inducido por PBC (Fig. 12 B).

En las Figuras 13 y 14 A-B se muestra el efecto inducido por la PBC 7 inyectada a la dosis equivalente de 1 y 5 mg/kg de cocaína base sobre la actividad locomotora en comparación con la inducida por cocaína 1 y 5 mg/kg.

Figura 13- Efecto estimulante inducido por PBC 7 (1).

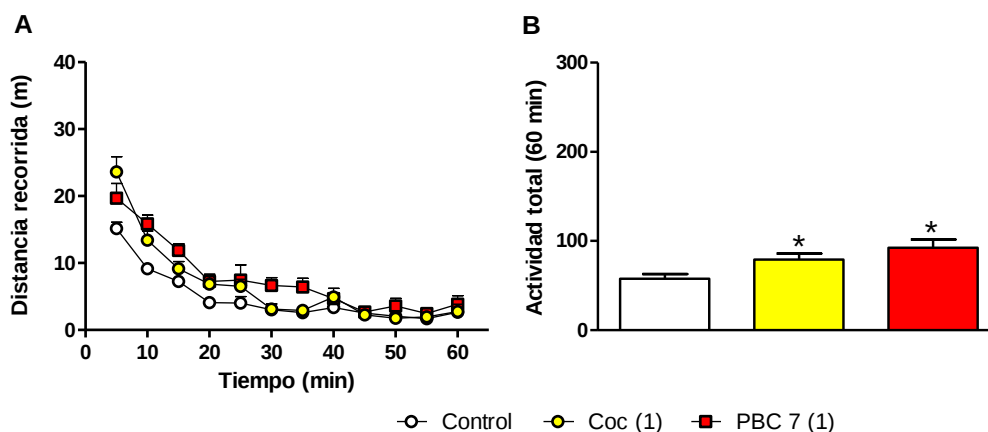


Figura 13. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 7 a la dosis equivalente de 1 mg/kg de cocaína base, cocaína 1 mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control. * = $p < 0.05$. No hubo diferencias significativas entre PBC 5 y cocaína. N=6-7.

Figura 14- Efecto estimulante inducido por PBC 7 (5).

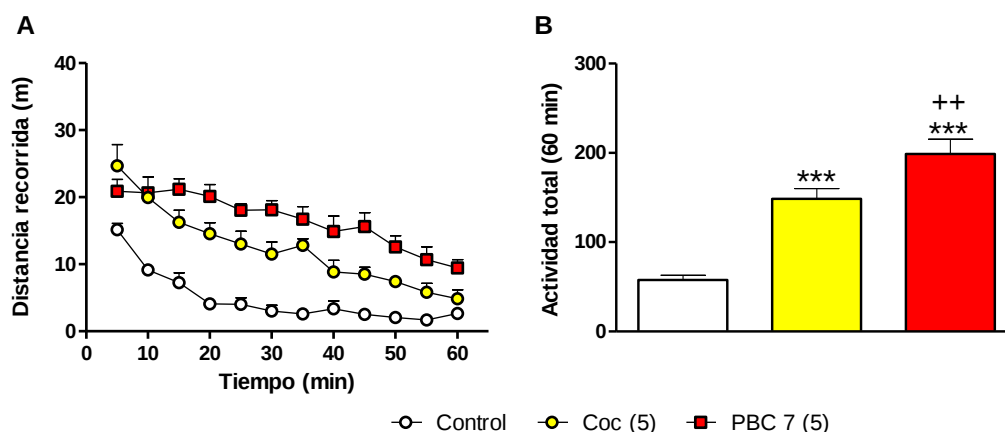


Figura 14. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 7 a la dosis equivalente de 5 mg/kg de cocaína base, cocaína 5 mg/kg o vehículo expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control; ++ = diferencia significativa entre PBC 7 vs cocaína. +++ = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. N= 6-7.

Como se puede apreciar en la Figura 13, tanto PBC 7 como cocaína aumentaron en forma significativa y similar la locomoción de los animales ($p < 0.05$). Sin embargo, de manera interesante, en la Figura 14 se puede observar que PBC 7 y cocaína indujeron un incremento en la actividad locomotora de los animales ($p < 0.001$ para ambos

grupos), siendo significativamente mayor el efecto de PBC 7 comparado con cocaína ($p < 0.01$ vs. cocaína, Fig. 14 B).

La caracterización del efecto estimulante de las muestras de PBC seleccionadas y su comparación con el efecto inducido por cocaína, permitió demostrar que el contenido de cocaína base en las muestras PBC 1, 5 y 7 fue el principal responsable en la respuesta comportamental de los animales. Sin embargo, a través de la PBC 7 se pudo evidenciar que otros componentes (impurezas y/o adulterantes) podrían participar también en el efecto estimulante, dado que presentó diferencias significativas con el grupo inyectado con cocaína.

En base a este resultado, y con el objetivo de evaluar el papel de la cafeína en el efecto estimulante inducido por PBC 7, se diseñaron la siguiente serie de experimentos.

En particular, se realizaron grupos experimentales en los cuales se co-administró una solución de cocaína y cafeína a las dosis mostradas en la Tabla 5. Cabe destacar que para el caso de la PBC 1 y 5 se incluyó una dosis mayor de 20 mg/kg en el diseño de los experimentos. Los resultados se muestran en las Figuras 15-18 A-B.

Tabla 5- Dosis de cocaína y cafeína correspondientes a las dosis equivalentes de 5 o 20 mg/kg de PBC 1, 5 y 7.

Muestra	Dosis de cocaína base (mg/kg)	Dosis de cafeína base (mg/kg)
PBC 1	5	1.08
	20	4.35
PBC 5	5	0.07
	20	0.30
PBC 7	5	2.48

Tabla 5. Dosis de cocaína y cafeína base calculadas en base a la dosis equivalente de cocaína a la cual se administró las muestras de PBC 1, 5 y 7.

Experimento 1.

La Figura 15 A-B muestra la actividad locomotora de animales co-administrados con cocaína 5 mg/kg y cafeína 2.5 mg/kg, comparado con los respectivos grupos controles.

Figura 15- Efecto estimulante inducido por cocaína (5) + cafeína (2.5).

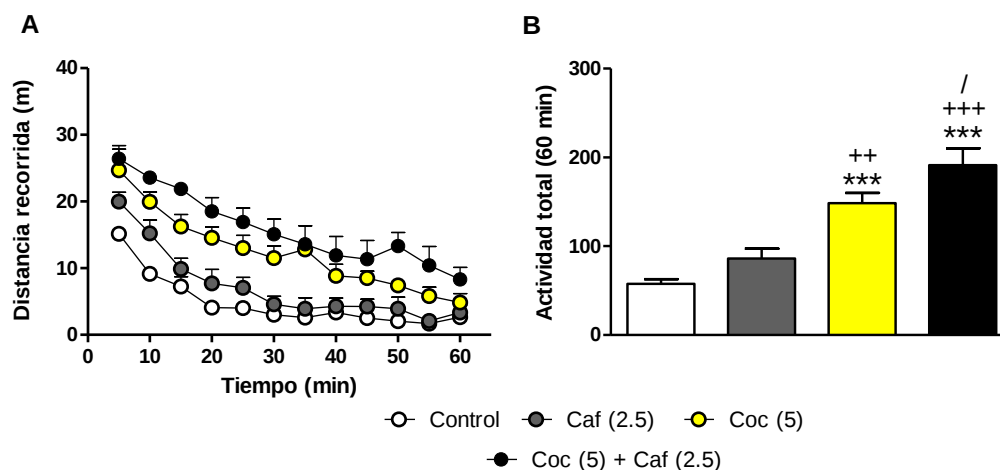


Figura 15. Actividad locomotora de animales inyectados con una solución de cocaína (5) y cafeína 2.5 (Coc + Caf), cocaína (Coc, 5 mg/kg), cafeína (Caf, 2.5 mg/kg) o vehículo, expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control; + = diferencia significativa vs cafeína; / = diferencia significativa vs cocaína. No hubo diferencias significativas entre cafeína (2.5) y el grupo control. / = $p < 0.05$; ++ = $p < 0.01$; ***, +++ = $p < 0.001$. N = 5-6.

El análisis estadístico reveló que tanto cocaína (5 mg/kg) como la co-administración de cocaína (5) y cafeína (2.5), indujeron un aumento significativo en la distancia recorrida de los animales comparados con el grupo control ($p < 0.001$ para ambos grupos). Cafeína (2.5 mg/kg) no modificó significativamente la actividad locomotora. De manera interesante, el aumento inducido por la co-administración de cocaína y cafeína resultó ser significativamente diferente al grupo inyectado con cocaína ($p < 0.05$), dejando en evidencia el papel de la cafeína en el efecto estimulante obtenido.

Con el fin de comparar el efecto estimulante de los animales inyectados con PBC 7 (5) y la co-administración de cocaína (5) y cafeína (2.5), la Tabla 6 muestra los valores medios de la actividad motora total producida por los distintos tratamientos.

Tabla 6- Incidencia de la cafeína en la actividad estimulante de la PBC 7 (5).

Tratamiento	Medias $\pm$ EEM de distancia recorrida (m) en 60 min.
Control	57.5 $\pm$ 5.3
Cafeína (2.5)	86.2 $\pm$ 10.9
Cocaína (5)	148.3 $\pm$ 11.6 ^{***++}
PBC 7 (5)	198.9 $\pm$ 16.4 ^{***+++/}
Coc (5) + Caf (2.5)	191.3 $\pm$ 19.1 ^{***+++/}

Tabla 6. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 7 equivalente a 5 mg/kg de cocaína base, cocaína 5 y cafeína 2.5 mg/kg, cocaína 5 mg/kg, cafeína 2.5 mg/kg ó vehículo en los 60 min. totales de registro. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control; += diferencia significativa vs cafeína; /= diferencia significativa vs cocaína. /= $p < 0.05$; ++ = $p < 0.01$; ***, +++ = $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre PBC 7 y Coc (5) + Caf (2.5) ni entre cafeína (2.5) y el control. N= 6-7.

Se puede apreciar que no hubo diferencias significativas entre el valor medio de la distancia recorrida total de los animales tratados con cocaína (5) y cafeína (2.5) y los tratados con PBC 7 inyectada a la dosis equivalente de 5 mg/kg de cocaína base. En su conjunto, estos resultados demostraron que la cafeína presente en la muestra de PBC 7 contribuyó sustancialmente en el efecto estimulante inducido por ésta muestra.

Experimento 2.

En base al resultado obtenido anteriormente, evaluamos la participación de la cafeína en las muestras de PBC 1 y 5 inyectadas a una dosis mayor, dado que fue evidente que a las dosis ensayadas anteriormente la incidencia de la cafeína no fue apreciable.

La Figura 16 A-B muestra la distancia recorrida de animales tratados con PBC 1 a la dosis equivalente de 20 mg/kg de cocaína base. El análisis estadístico reveló que los animales tratados con PBC 1 aumentaron significativamente su locomoción respecto al grupo control ($p < 0.001$). Cocaína también indujo un incremento significativo en la actividad de los animales ($p < 0.001$). De manera interesante, se pudo apreciar una diferencia significativa entre ambos grupos tratados ($p < 0.01$) demostrando el mismo fenómeno observado para la muestra PBC 7.

Figura 16- Efecto estimulante inducido por PBC 1 (20).

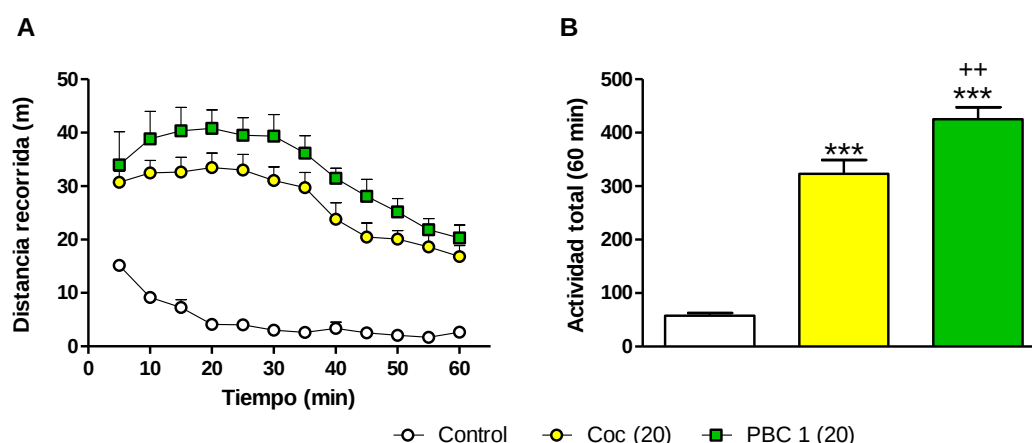


Figura 16. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 1 a la dosis equivalente de 20 mg/kg de cocaína base, cocaína 20 mg/kg o vehículo, expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control; + = diferencia significativa entre PBC 1 vs cocaína. ++ = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. N = 6-7.

Con el fin de confirmar si la diferencia entre ambas drogas se debía al componente de cafeína, se procedió a inyectar una solución combinada de cocaína y cafeína a las dosis de 20 y 4.5 mg/kg, de acuerdo a las dosis calculadas y mostradas en la Tabla 6. La Figura 17 A-B muestra el resultado obtenido.

Figura 17- Efecto estimulante inducido por cocaína (20) + cafeína (4.5).

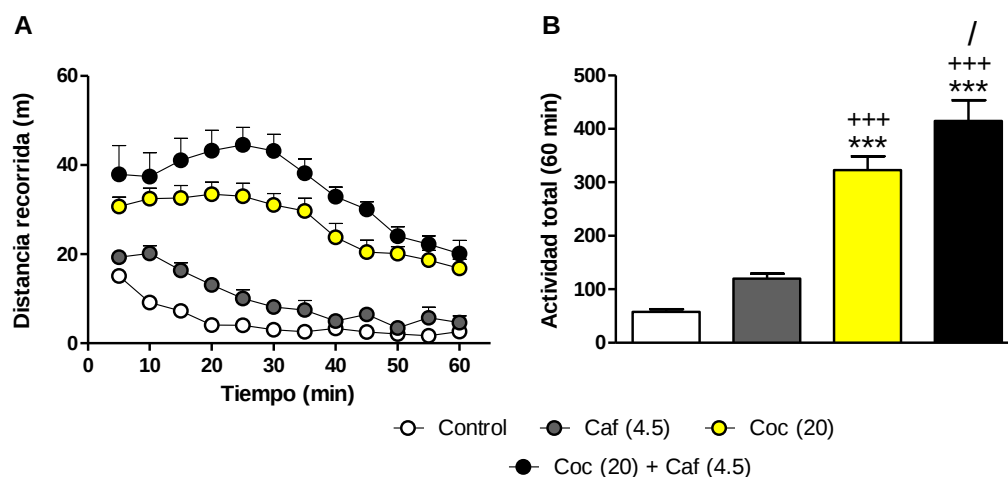


Figura 17. Actividad locomotora de animales inyectados con una solución de cocaína (20) y cafeína (4.5) mg/kg (Coc + Caf), cocaína (Coc, 20 mg/kg), cafeína (Caf, 4.5 mg/kg) o vehículo, expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control; + = diferencia significativa vs cafeína; / = diferencia significativa vs cocaína. No hubo diferencias significativas entre cafeína (2.5) y el grupo control. / = $p < 0.05$; ***, +++ = $p < 0.001$. N = 5-7.

De manera similar a los resultados obtenidos en la Figura 15, el análisis estadístico demostró que tanto cocaína (20 mg/kg) como la co-administración de cocaína (20) y cafeína (4.5) indujeron un aumento significativo en la actividad locomotora de los animales comparados con el grupo control ($p < 0.001$ para ambos grupos). Cafeína (4.5 mg/kg) tendió a aumentar la distancia recorrida aunque no resultó significativo el cambio. El aumento inducido por la co-administración de cocaína y cafeína resultó ser significativamente diferente al grupo inyectado con cocaína ($p < 0.05$), dejando en evidencia el papel de la cafeína en el efecto estimulante obtenido.

Con el fin de comparar el efecto estimulante de los animales inyectados con PBC 1 (20) y la co-administración de cocaína (20) y cafeína (4.5), la Tabla 7 muestra los valores medios de la actividad motora total producida por los distintos tratamientos.

Tabla 7- Incidencia de la cafeína en la actividad estimulante de la PBC 1 (20).

Tratamiento	Medias $\pm$ EEM de distancia recorrida (m) en 60 min.
Control	57.5 $\pm$ 5.3
Cafeína (4.5)	119.9 $\pm$ 9.1
Cocaína (20)	323.0 $\pm$ 25.8 ^{***+++}
PBC 1 (20)	425.2 $\pm$ 22.2 ^{***+++/}
Coc (20) + Caf (4.5)	414.9 $\pm$ 38.4 ^{***+++/}

Tabla 7. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 1 equivalente a 20 mg/kg de cocaína base, cocaína 20 y cafeína 4.5 mg/kg, cocaína 20 mg/kg, cafeína 4.5 mg/kg ó vehículo en los 60 min. totales de registro. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= diferencia significativa vs grupo control; += diferencia significativa vs cafeína; /= diferencia significativa vs cocaína. /= $p < 0.05$; ***, +++= $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre PBC 1 y Coc (20) + Caf (4.5) ni Cafeína (4.5) y el grupo control. N= 5-7.

No hubo diferencias significativas entre el valor medio de la distancia recorrida total de los animales tratados con cocaína (20) y cafeína (4.5) y los tratados con PBC 1 inyectada a la dosis equivalente de 20 mg/kg de cocaína base (Tabla 7), demostrando la incidencia de la cafeína en el efecto estimulante inducido por PBC 1.

Experimento 3.

Otra manera de confirmar la incidencia de la cafeína en el efecto estimulante de las muestras de PBC fue a través de la inyección de la muestra PBC 5 a la dosis equivalente de 20 mg/kg de cocaína base. Los resultados se muestran en la Figura 18 A-B. Cabe recordar que dicha muestra posee un contenido en cafeína muy bajo (ver Tabla 3).

Figura 18- Efecto estimulante inducido por PBC 5 (20).

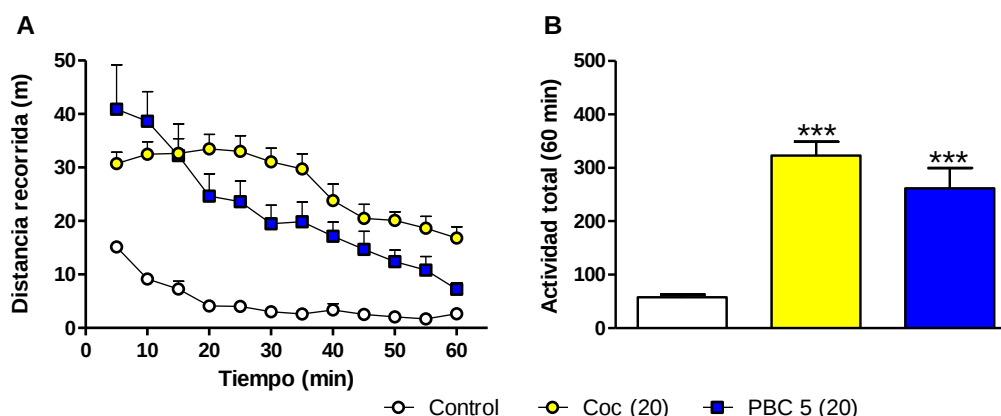


Figura 18. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 5 a la dosis equivalente a 20 mg/kg de cocaína base, cocaína 20 mg/kg o vehículo, expresada en intervalos de 10 min. (A) y en los 60 min. totales de registro (B). Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = diferencia significativa vs grupo control. *** = $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre PBC 5 y cocaína. N= 6-7.

Los resultados mostraron que PBC 5 potenció significativamente la actividad locomotora de los animales, respecto al grupo control ($p < 0.001$). Asimismo, los animales tratados con cocaína (20 mg/kg) aumentaron la actividad respecto al grupo control ($p < 0.001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre PBC 5 y cocaína. Este resultado demostró que la cafeína no incidió en el efecto estimulante inducido por la PBC 5.

Con el fin de comparar el efecto estimulante de los animales inyectados con PBC 5 (20) y la co-administración de cocaína (20) y cafeína (4.5), la Tabla 8 muestra los valores medios de la actividad motora total producida por los distintos tratamientos.

Tabla 8- Actividad locomotora total de la PBC 5 (20).

Tratamiento	Medias $\pm$ EEM de distancia recorrida (m) en 60 min.
Control	57.5 $\pm$ 5.3
Cafeína (4.5)	119.9 $\pm$ 9.1
Cocaína (20)	323.0 $\pm$ 25.8 ^{****++}
PBC 5 (20)	261.6 $\pm$ 38.2 ^{****++}
Coc (20) + Caf (4.5)	414.9 $\pm$ 38.4 ^{****++/##}

Tabla 8. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 5 equivalente a 20 mg/kg, cocaína 20 y cafeína 4.5 mg/kg, cocaína 20 mg/kg, cafeína 4.5 mg/kg ó vehículo en los 60 min. totales de registro. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= diferencia significativa vs grupo control; += diferencia significativa vs cafeína; /= diferencia significativa vs cocaína; #= diferencia significativa vs PBC 5. /= $p < 0.05$; ++, ###= $p < 0.01$; ***, +++= $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre cafeína (4.5) y el grupo control. N= 5-7.

Como se observa en la Tabla 8, hubo diferencias significativas entre el valor medio de la distancia recorrida total de los animales tratados con PBC 5 y cocaína (20) y cafeína (4.5) ($p < 0.01$), demostrando que el bajo contenido en cafeína no alcanzó a incidir en la respuesta locomotora observada luego del tratamiento con la PBC 5.

Los resultados obtenidos nos permitieron mostrar la dosis dependencia en el efecto estimulante inducido por cada una de las drogas inyectadas (Fig. 19 A-D).

Como se puede apreciar en la Figura 19 A-C, las PBC 1, 5 y 7 potenciaron la actividad locomotora de los animales a medida que se aumentó la dosis, demostrando un efecto dosis dependiente.

Asimismo cocaína mostró un perfil similar, demostrando también su dosis dependencia sobre la actividad motora (Figura 19 D).

Figura 19- Dosis-dependencia en el efecto estimulante inducido por muestras de PBC y cocaína.

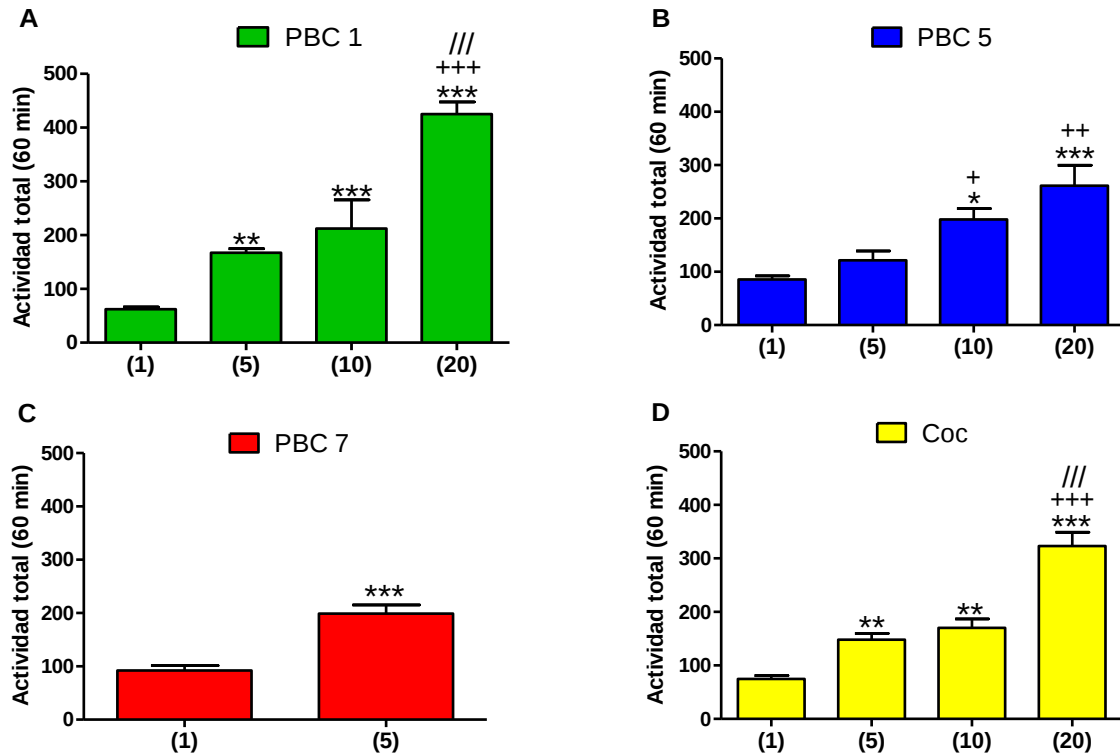


Figura 19. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 1 y 5 a la dosis equivalente de 1, 5, 10 y 20 mg/kg de cocaína base, cocaína 1, 5, 10 y 20 mg/kg, PBC 7 a la dosis equivalente de 1 y 5 o vehículo, registrada durante 60 min. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls o test *t*-Student no pareado para PBC 7. *= diferencia significativa vs 1mg/kg; += diferencia significativa vs 5 mg/kg; /= diferencia significativa vs 10 mg/kg. *, += $p < 0.05$; **, += $p < 0.01$; ***, ///= $p < 0.001$. N= 5-7.

1.2 Caracterización de la conducta de agresión en ratas inducida por la administración sistémica aguda de una muestra de PBC (PBC 1) utilizando el modelo de agresión inducido por aislamiento. Evaluación del efecto residual.

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la PBC 1 sobre la conducta agresiva, sus acciones fueron evaluadas utilizando el modelo de agresión por aislamiento. Asimismo evaluamos el efecto residual de la droga, 24 hs después de su administración. Se inyectó PBC 1 a la dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base y sus acciones fueron comparadas con las inducidas por cocaína a 10 mg/kg.

La realización de dos encuentros basales (E1 y E2, ver esquema 2) entre el animal residente y un intruso, permitió que los residentes adquirieran experiencia ganadora y así establecer un nivel basal de conductas agresivas en los residentes para evaluar el efecto farmacológico de PBC 1 y cocaína.

En las Figuras 20 y 21 se muestra el efecto farmacológico inducido por PBC 1 a la dosis equivalente a 10 mg/kg de cocaína base sobre las conductas agresivas, no agresiva y la exploración, en el día del Test. Asimismo, se comparan sus efectos con los inducidos por el grupo tratado con cocaína (10 mg/kg) y con vehículo. Cabe aclarar que los animales inyectados con el vehículo de PBC y de cocaína presentaron un patrón conductual similar por lo que fueron agrupados y se presentan en un único grupo control.

Figura 20- Efecto de PBC 1 (10) sobre el patrón de conductas agresivas: día del Test.

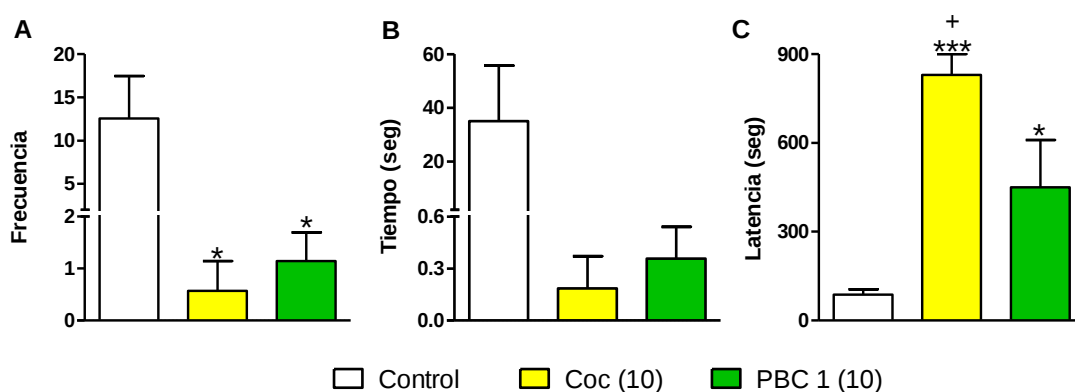


Figura 20. Frecuencia y tiempo de las conductas agresivas (A y B, respectivamente) y latencia de aparición de la primera conducta agresiva (C) de residentes inyectados con PBC 1 a una dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg o vehículo, en los 15 min de registro del día del Test. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= diferencia significativa vs grupo control; += diferencia significativa vs PBC 1. *, + = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos en el tiempo de agresión. N= 7.

El análisis estadístico reveló que los animales tratados con PBC 1 disminuyeron significativamente la frecuencia de las conductas agresivas respecto al grupo control ($p < 0.05$, Fig. 20 A). La misma respuesta se observó en los animales inyectados con cocaína. No se evidenciaron diferencias entre ambas drogas. La consecuente disminución en el tiempo de las conductas agresivas inducidas por PBC 1 y cocaína no resultó ser significativa (Fig. 20 B).

Por otra parte, PBC 1 aumentó la latencia de aparición a la primera conducta agresiva ($p < 0.05$, Fig. 20 C), mientras que cocaína indujo un efecto similar aunque fue estadísticamente diferente al observado en los animales tratados con PBC 1 ($p < 0.05$). En su conjunto, estos resultados indicaron que el tratamiento con PBC 1 y cocaína indujo un claro bloqueo de la conducta agresiva en los residentes.

La Figura 21 A-B muestra el tiempo de investigación social y la actividad exploratoria vertical (*rearings*) de los residentes tratados con PBC 1 en el día del Test, respectivamente.

Figura 21- Efecto de PBC 1 (10) sobre la conducta no agresiva y de exploración: día del Test.

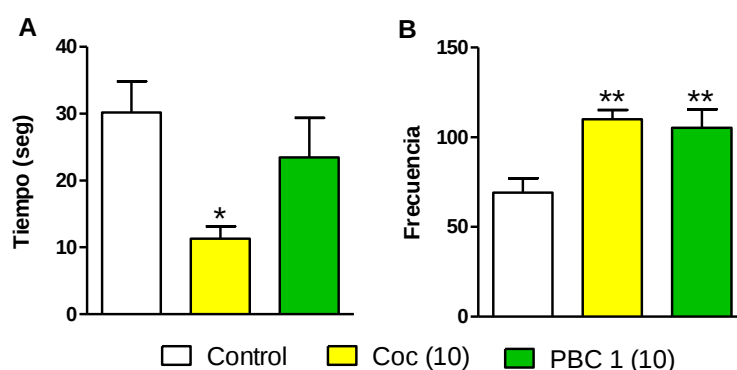


Figura 21. Tiempo de investigación social (A) y frecuencia de *rearings* (B) de animales residentes inyectados con PBC 1 a una dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg o vehículo, en los 15 min. de registro del día del Test. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= diferencia significativa vs grupo control. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$. No hubo diferencias significativas entre PBC 1 y cocaína. N= 7.

Los animales tratados con PBC 1 mostraron una leve tendencia a disminuir el tiempo de investigación social, mientras que el análisis estadístico reveló que cocaína disminuyó significativamente este parámetro respecto al grupo control ($p < 0.05$; Fig. 21 A). Por otra parte, la frecuencia de *rearings* de los residentes tratados con PBC 1 aumentó significativamente respecto al grupo control ($p < 0.01$; Fig. 21 B). Asimismo, cocaína potenció el número de *rearings* ($p < 0.01$), sin mostrar diferencias con PBC.

1.2.1. Correlato comportamental de registro de locomoción mediante el uso del modelo de Campo Abierto.

La Figura 22 muestra la actividad locomotora registrada en el período de 25 a 40 min (de un total de 60 min) de animales tratados con PBC 1 a una dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base, cocaína (10 mg/kg) o vehículo.

Figura 22- Actividad motora inducida por PBC 1 (10) registrada en un período de 15 min.

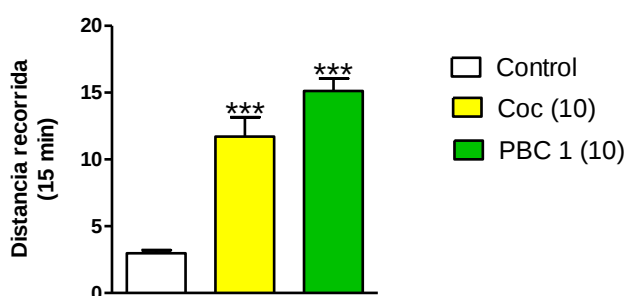


Figura 22. Actividad locomotora de animales inyectados con PBC 1 a una dosis equivalente a 10 mg/kg de cocaína base, cocaína (10 mg/kg) y vehículo en el período de 25-40 min. extraído de los 60 min. totales de registro en el campo abierto. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *=diferencia significativa vs grupo control. ***= $p < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre PBC 1 y cocaína. N= 5-6.

En concordancia con lo observado previamente (Fig. 9), PBC 1 y cocaína aumentaron de manera similar y significativa la actividad locomotora de los animales ($p < 0.001$, Fig. 22). Este resultado nos permitió establecer una relación con la activación locomotora inducida por PBC 1 y cocaína en los animales residentes en el día del Test de agresión. Así, la hiperactividad observada se relaciona con el aumento en la frecuencia de *rearings* cuantificado en los animales tratados con PBC 1 y cocaína en el día del Test.

Las Figuras 23 y 24 muestran el efecto residual de PBC 1 sobre la conducta agresiva, no agresiva y exploratoria evaluado en el día Post-test, es decir, 24 hs después de la administración de la droga. Asimismo, se comparan estos efectos con los inducidos por el pre-tratamiento con cocaína y vehículo. La Figura 23 A-C representa la frecuencia y el tiempo de las conductas agresivas, así como la latencia de aparición de la primera conducta agresiva, respectivamente, registradas en 10 min. de los residentes que fueron pre-tratados con PBC 1 o cocaína. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre el grupo pre-tratado con PBC 1 o cocaína y el grupo control para cada uno de los parámetros medidos (Fig. 23 A-C). Sin embargo, el grupo pre-tratado con cocaína tendió a aumentar la latencia de aparición de la primera conducta agresiva, aunque fue muy variable (Fig. 23 C).

Figura 23- Efecto residual de PBC 1 sobre el patrón de conductas agresivas: día Post-test.

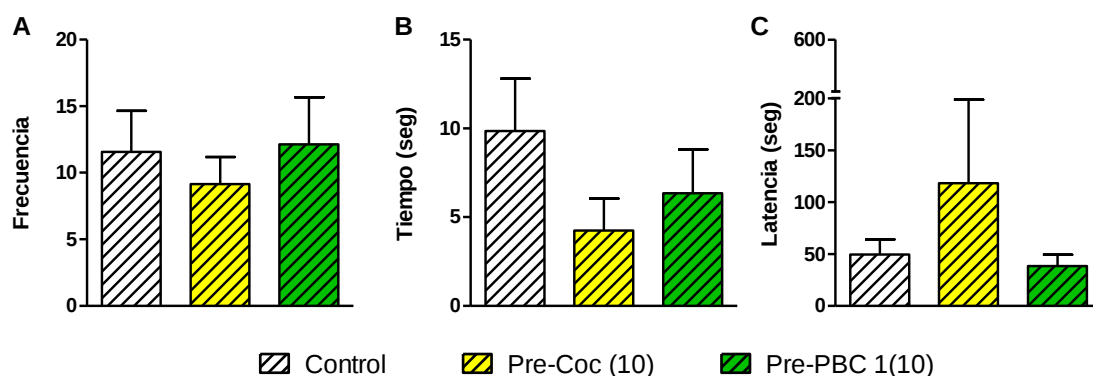


Figura 23. Frecuencia y tiempo de las conductas agresivas (A y B, respectivamente) y latencia de aparición de la primera conducta agresiva (C) de residentes inyectados el día anterior con PBC 1 a una dosis equivalente a 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg o vehículo, en los 10 min de registro del día Post-test. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. No hubo diferencias significativas entre los pre-tratamientos en los parámetros cuantificados. N= 7.

De manera similar, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre el pre-tratamiento con PBC 1 o cocaína y el grupo control en el tiempo de investigación social (Fig. 24 A) o en la frecuencia de *rearings* (Fig. 24 B).

Figura 24- Efecto residual de PBC 1 sobre la conducta no agresiva y exploratoria: día Post-test.

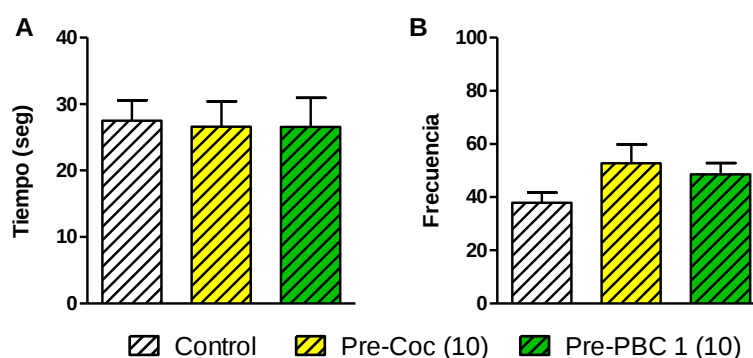


Figura 24. Tiempo de investigación social (A) y frecuencia de *rearings* (B) de residentes inyectados el día anterior con PBC 1 equivalente a 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg ó vehículo, en los 10 min de registro del día Post-test. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. No hubo diferencias significativas entre los pre-tratamientos. N=7.

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE PBC.

2.1 *Determinación de los cambios neuroquímicos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF inducidos luego de la administración sistémica aguda de PBC. Correlato neuroquímico de los cambios observados en los animales residentes en el día del Test en el modelo de agresión por aislamiento.*

Con el fin de profundizar en la caracterización de los efectos farmacológicos inducidos por la PBC 1, y así establecer un correlato neuroquímico con el día del Test de agresión, evaluamos sus acciones sobre el sistema DAérgico y 5-HTérgico en dos regiones del sistema mesocorticolímbico, NAcc y CPF. Los animales fueron tratados en forma aguda con PBC 1 a la dosis equivalente de 10 mg/kg de cocaína base y estudiamos sus efectos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF medial, lateral y total, luego de 30 min. de administrada la droga. Asimismo, sus acciones fueron comparadas con cocaína a 10 mg/kg. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9- Efecto neuroquímico de PBC 1 (10) en el NAcc y en la CPF: correlato del día del Test de agresión.

Región	Neurotransmisores y Recambio	Tratamiento		
		Control	PBC 1	Cocaína
NAcc	DA	6805 ± 846	12182 ± 948.1**	10789 ± 640.4**
	DOPAC/DA	0.63 ± 0.05	0.28 ± 0.02***	0.35 ± 0.03***
CPF medial	5-HT	570.5 ± 37.2	671.8 ± 32.6	539.0 ± 46.6
	5-HIAA/5-HT	0.71 ± 0.05	0.58 ± 0.05	0.74 ± 0.10
CPF lateral	5-HT	534.3 ± 16.1	605.5 ± 38.9	541.7 ± 67.0
	5-HIAA/5-HT	0.58 ± 0.04	0.49 ± 0.01	0.57 ± 0.07
CPF total	5-HT	980.8 ± 74.5	1123.0 ± 33.3	1169.0 ± 60.6
	5-HIAA/5-HT	0.64 ± 0.09	0.43 ± 0.02*	0.37 ± 0.009**

Tabla 9. Cuantificación mediante HPLC-DE de niveles tisulares (ng/g tejido) y recambio dopaminérgico en NAcc y serotoninérgico en CPF medial, lateral y total de animales inyectados

con PBC 1 equivalente a 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg ó vehículo. Los datos están expresados como la Media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. *= diferencia significativa vs grupo control. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. N= 3-7.

El análisis estadístico reveló que el tratamiento con PBC 1 aumentó significativamente los niveles de DA en el NAcc ($p < 0.01$; Tabla 9). Cocaína indujo el mismo efecto, mientras que no se evidenciaron diferencias entre ambas drogas. De manera consecuente, tanto PBC 1 como cocaína disminuyeron significativamente el recambio DAérgico en ésta región ($p < 0.001$). Ambos efectos neuroquímicos fueron los esperables para ambas drogas de abuso (Kuczenski y cols. 1990).

Por otra parte, los niveles de 5-HT y el recambio serotoninérgico en la CPF medial y lateral no fueron modificados significativamente por los tratamientos realizados. Este resultado nos llevó a la pregunta de si el efecto farmacológico inducido por PBC o cocaína podía haberse menospreciado por la disección específica de subregiones de la CPF medial y lateral. Así, otro grupo de animales fue inyectado con PBC 1 y cocaína bajo las mismas condiciones anteriores y fue disecada la CPF total. De manera interesante, el tratamiento con PBC 1 mostró una tendencia a aumentar los niveles de 5-HT en la CPF total, mientras que resultó ser significativa la disminución en el recambio 5-Hérgico ($p < 0.05$). Similarmente, los animales tratados con cocaína mostraron el mismo perfil observado para PBC, sin evidenciarse diferencias entre ambas drogas.

Estos resultados indican una relación entre el efecto neuroquímico inducido por PBC 1 y cocaína en el NAcc y la CPF total y la respuesta comportamental que ambas drogas indujeron en los animales residentes en el día del Test de agresión, ya que ambos grupos experimentales fueron tratados bajo las mismas condiciones farmacológicas.

2.2 Determinación de los cambios neuroquímicos sobre el sistema dopaminérgico en el NAcc y serotoninérgico en la CPF en los animales residentes sometidos al día Post-test en el modelo de agresión por aislamiento.

Con el fin de evaluar el efecto neuroquímico residual del pre-tratamiento con PBC 1 en el modelo de agresión por aislamiento, cuantificamos los niveles tisulares de DA y 5-HT y el recambio de ambos neurotransmisores en el NAcc y CPF medial y lateral, respectivamente de animales residentes luego del ensayo del día Post-test. Asimismo, las acciones fueron comparadas en animales pre-tratados con cocaína a 10 mg/kg. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10- Efecto neuroquímico residual de PBC 1 (10) en el NAcc y en la CPF: día Post-test.

Región	Neurotransmisores y Recambio	Tratamiento		
		Control	PBC 1	Cocaína
NAcc	DA	8216 ± 1135	8862 ± 913.4	7680 ± 401.4
	DOPAC/DA	0.50 ± 0.09	0.45 ± 0.06	0.50 ± 0.07
CPF medial	5-HT	508.8 ± 65.9	554.4 ± 27.4	492.7 ± 30.9
	5-HIAA/5-HT	1.18 ± 0.24	1.00 ± 0.09	0.87 ± 0.07
CPF lateral	5-HT	521.0 ± 56.5	563.0 ± 37.9	533.2 ± 36.9
	5-HIAA/5-HT	0.90 ± 0.14	0.82 ± 0.06	0.57 ± 0.05

Tabla 10. Cuantificación mediante HPLC-DE de niveles tisulares (ng/g tejido) y recambio dopaminérgico en NAcc y serotoninérgico en CPF medial y lateral de residentes inyectados el día anterior con PBC 1 equivalente a 10 mg/kg de cocaína base, cocaína 10 mg/kg ó vehículo, en el día Post-test. Los datos están expresados como la Media ± EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos en las regiones estudiadas. N= 7.

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los pre-tratamientos de PBC y cocaína y el grupo control en los niveles tisulares de DA, así como en el recambio DAérgico en el NAcc (Tabla 10). Por otra parte, tampoco hubo diferencias significativas entre los pre-tratamientos en los niveles de 5-HT y su recambio tanto en la CPF medial como lateral. De manera interesante, estos resultados se correspondieron con la ausencia de efecto residual observado en las conductas agresivas, de investigación social y de exploración durante la sesión de Post-test (Fig. 23 y 24).

Durante el desarrollo de esta tesis se obtuvieron resultados sobre la caracterización farmacológica de los efectos comportamentales y neuroquímicos inducidos por muestras de Pasta Base de Cocaína provenientes de distintas incautaciones realizadas en el Uruguay. Los datos demostraron que la cocaína base, presente en las muestras de PBC, fue en general el principal responsable de los efectos farmacológicos inducidos por la droga. Sin embargo, la presencia del adulterante activo, cafeína, colaboró e incluso potenció uno de los efectos farmacológicos estudiados (acción estimulante). Los resultados presentados constituyen la primera caracterización pre-clínica de algunas acciones de muestras de Pasta Base de nuestro país sobre el SNC.

Efecto estimulante de las muestras de PBC y la relevancia de la cafeína.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos demostraron que las muestras de PBC seleccionadas (PBC 1, 5 y 7) indujeron un efecto estimulante dosis-dependiente. Este resultado no es sorprendente dado que PBC es una droga estimulante y dicha propiedad ha sido ampliamente demostrada para otras drogas psicoestimulantes (Sahakian y cols. 1975; Kuczenski y cols. 1991; Antoniou y cols. 1998). Sin embargo, nuestros resultados constituyen la primera caracterización pre-clínica de dicha propiedad.

Los resultados comparativos con la acción estimulante inducida por cocaína inyectada a dosis equivalente con PBC revelaron que, la cocaína base presente en las muestras de PBC, fue la principal responsable de la acción estimulante de las PBC seleccionadas. Sin embargo, dependiendo de la muestra de PBC y la dosis ensayada se pudo evidenciar que la cafeína generó un efecto aditivo a la cocaína base, explicando el mayor efecto estimulante inducido por la PBC 1 y 7. La comprobación de dicha acción surgió de los experimentos en los que se co-administraron cocaína y cafeína a las dosis equivalentes a las inyectadas para cada una de las muestras de PBC (ver Tabla 5). Ambas combinaciones de cocaína y cafeína ensayadas (Coc 20 + Caf 4.5 mg/kg y Coc 5 + Caf 2.5 mg/kg) reprodujeron el mismo efecto estimulante que la PBC 1 y 7, respectivamente (Tablas 6 y 7). De esta manera quedó demostrado el efecto aditivo de la cafeína. A su vez, el hecho de que la PBC 5 (con muy bajo contenido en cafeína) no revelara diferencias significativas con la propiedad estimulante inducida por cocaína, a ninguna de las dosis administradas, apoya el papel directo de la cafeína en la propiedad estimulante inducida por la PBC 1 y 7. Asimismo, aunque de manera indirecta, se pudo demostrar que los otros componentes presentes en las muestras de PBC (impurezas) no incidieron en la acción estimulante de la droga.

Si bien estos resultados son interesantes y originales, cabe mencionar que no es sorprendente que cafeína esté presente en las muestras de PBC, ya que es uno de los

adulterantes más comunes agregados a drogas de abuso ilegales. A continuación proponemos evidencias sobre su mecanismo de acción que pudieran explicar la potenciación del efecto estimulante de PBC así como su relevancia en el poder adictivo de la misma.

Aunque es definida como la droga psicoestimulante más consumida en todo el mundo, la cafeína es mucho menos potente en términos comparativos con cocaína o anfetamina (Antoniou y cols. 1998). Han sido descritos efectos positivos de la cafeína en sus consumidores ya que aumenta la concentración, alivia la fatiga y contribuye al estado de alerta. Sin embargo, consumida a altas dosis produce ansiedad, nerviosismo, alteraciones del sueño y palpitaciones cardíacas (Fredholm y cols. 1999; Cauli y Morelli 2005; Ferré 2008). La cafeína es un antagonista no selectivo de los receptores de adenosina. La adenosina, aunque no se define como un neurotransmisor clásico, es una purina que funciona como un inhibidor general de la actividad neuronal. Se une a tres tipos de receptores metabotrópicos A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Mientras que éstos receptores se expresan en el cerebro, la afinidad de adenosina por los receptores A_{2B} y A_3 es baja y su actividad basal no se considera relevante. Se ha sugerido que bajo condiciones fisiológicas, la cafeína no ejerce sus acciones a través de dichos receptores. Cafeína se une con alta afinidad a los receptores A_1 y A_{2A} y mediaría sus acciones a través del bloqueo de los mismos. Estudios de inmunohistoquímica han demostrado una alta expresión de receptores A_1 en hipocampo, corteza y cerebelo y baja concentración en los ganglios basales. Se piensa que los efectos positivos de la cafeína se deben al bloqueo de estos receptores. En contraste, la expresión de receptores A_2 está limitada a regiones de los ganglios basales, y en particular en regiones altamente inervadas por fibras DAérgicas como son el ED y el tubérculo olfatorio (Fredholm y cols. 1999; Fisone y cols. 2004). Se ha demostrado que el efecto estimulante en roedores está mediado específicamente a través del bloqueo del receptor A_2 expresado en neuronas estriatales, reduciendo la inhibición ejercida por la adenosina endógena sobre la transmisión DAérgica (El Yacoubi y cols. 2000). Se ha demostrado además que el antagonismo de este receptor aumenta la liberación de la DA estriatal (Ferré y cols. 1997; Bedingfield y cols. 1998; Fredholm y cols. 1999; Cauli y Morelli 2005).

Algunos estudios han reportado en diversos modelos comportamentales una interacción (por adición y/o sinergismo) entre los efectos inducidos por cafeína y drogas psicoestimulantes. La cafeína administrada en forma aguda puede aumentar la locomoción inducida por bajas dosis repetidas de anfetamina, o potenciar la estereotipia inducida por cocaína y anfetamina (Poleszak y Maleck 2000; Cauli y Morelli 2005). En este sentido, la acción potenciadora de la cafeína podría explicar los resultados obtenidos en nuestros experimentos. Si bien el mecanismo de acción de la cafeína es completamente diferente al de la cocaína, el aumento de la transmisión

DAérgica inducida por ambas drogas en el circuito mesolímbico y nigroestriatal (aunque con distinta potencia), resulta en una convergencia de ambos mecanismos con un resultado común, el de la potenciación locomotora. Así, esta combinación de mecanismos podría explicar la potenciación del efecto estimulante en las PBC 1 y 7.

A pesar de ser una droga con un bajo potencial adictivo, se ha demostrado las propiedades reforzadoras de cafeína utilizando el paradigma CPP. Se observó que los animales tratados con bajas dosis de cafeína desarrollan preferencia de lugar (Bedingfield y cols. 1998; Patkina y Zvartau 1998). A su vez, algunos estudios han demostrado la contribución de cafeína al efecto reforzador de cocaína. La auto-administración combinada de cocaína y cafeína potencia la auto-administración de bajas dosis de cocaína (Schenk y cols. 1994), mientras que la co-administración de dosis bajas de cocaína y cafeína indujo un efecto aditivo en el modelo de CPP (Bedingfield y cols. 1998). Estas evidencias demuestran que la presencia de cafeína potencia el efecto reforzador de la cocaína, dato que muestra gran relevancia para explicar el poder adictivo de la PBC.

Si bien hasta el momento se consideraba a la vía de administración como el factor clave para explicar el perfil clínico característico de los consumidores de PBC, nuestro trabajo demuestra que los adulterantes en las muestras de PBC también contribuyen en el efecto farmacológico de la droga. Específicamente, demostramos que en muestras de PBC con alto contenido en cafeína y dependiendo de la dosis administrada, ésta ejerce un efecto aditivo en la acción estimulante inducida por la cocaína base. Un hallazgo muy interesante es el hecho de que cafeína es una sustancia que puede ser volatilizada (Huizer 1987; Gostic y cols. 2009). En base a este hallazgo y teniendo en cuenta la comprobación de una acción aditiva entre cocaína (base) y cafeína, sumada a una vía de administración rápida (inhalaación pulmonar), proponemos que la cafeína presente en las muestras de PBC, es un factor que podría colaborar con la gran dependencia y toxicidad generalizada que aparece en los consumidores de PBC. Será necesario realizar futuros experimentos para abordar el estudio esta hipótesis.

Sin embargo, dado que la PBC es una droga fumable, no podemos descartar que al momento de consumirla se formen productos de combustión que puedan tener acción sobre el SNC (Lizasoain y cols. 2002; Moraes y cols. 2010) y colaborar así en el perfil clínico de los consumidores. De todas maneras, serían muy difíciles de determinar, dado que los productos de pirólisis varían con las condiciones de temperatura a las que se quema la PBC para ser volatilizada (Gostic y cols. 2009).

Efecto anti-agresivo inducido por PBC 1 y cambios neuroquímicos asociados.

Dos de los modelos más utilizados para evaluar el efecto de drogas de abuso en las conductas agresivas son el de inducción de agresión por aislamiento social y el de residente-intruso (Olivier y Mos 1992; Olivier y Young 2002). En estos modelos

generalmente se utilizan ratones macho, dado que presentan un patrón conductual más agresivo que las ratas. Por otro lado, existe variabilidad en los procedimientos experimentales, los que generalmente utilizan entre 4-6 semanas de aislamiento de los animales y/o la presencia de una hembra para lograr altos niveles de agresividad en los animales residentes (Miczek 1979; Darmani y cols. 1991; Banjaw y cols. 2006; de Almeida y cols. 2010). Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos implementado el modelo de agresión por aislamiento en ratas adaptado a nuestras posibilidades. Utilizamos únicamente una semana de aislamiento de los residentes y en ausencia de una hembra. Los resultados demostraron que siete días de aislamiento y dos encuentros basales previos al día del Test, fueron suficientes para establecer un nivel basal de conductas agresivas, los cuales nos permitieron evidenciar cambios en las respuestas conductuales bajo el efecto de las drogas. De manera interesante, nuestros resultados concuerdan con datos ya establecidos en la literatura en los cuales se demostró que la administración sistémica aguda y en altas dosis de cocaína, genera un bloqueo significativo de la conducta agresiva de residentes (Miczek 1979; Darmani y cols. 1990; Long y cols. 1996; Estelles y cols. 2004). Esta evidencia indica la reproducibilidad del resultado a pesar de las modificaciones impuestas en nuestro protocolo.

La administración aguda de PBC 1 indujo una respuesta conductual similar a la producida por cocaína. Este resultado sugiere que la cocaína base presente en esta muestra de PBC es la principal responsable de la acción antiagresiva observada. La cafeína presente en la PBC 1 no parecería aportar al efecto antiagresivo. Sin embargo, en la literatura algunas evidencias establecen una relación entre la cafeína y el aumento en la agresión. Está descrito que ratones *knock-out* para el subtipo de receptor A_{2A} presentan un aumento de conductas agresivas frente a un intruso en el modelo residente-intruso. Por otra parte, dosis bajas de cafeína en un tratamiento agudo (2.5-5 mg/kg) potencian moderadamente las conductas agresivas (Ledent y cols. 1997; Wilson y cols. 2000). Basados en estos hallazgos es necesario realizar otro diseño experimental que nos permita evidenciar el papel de la cafeína en los efectos de la PBC en relación a la conducta agresiva.

El bloqueo de la agresión se reflejó en una disminución en la frecuencia y tiempo de las conductas agresivas así como en un aumento en la latencia de aparición de la primera conducta agresiva de los residentes. Sin embargo, en éste último parámetro se observó una diferencia significativa entre ambas drogas. Este hecho podría explicarse por la mayor variabilidad que aparece en el grupo de residentes inyectados con PBC, siendo más homogéneo el grupo de cocaína en relación a los animales que no mostraron conductas agresivas.

A diferencia de lo reportado por otros autores, el efecto que obtuvimos con cocaína no fue específico sobre las conductas agresivas de los residentes ya que la droga también redujo el tiempo de interacción social (en relación al intruso) mientras que aumentó la

actividad exploratoria. En este sentido, cabe mencionar que la disminución en la interacción social con el intruso se la ha relacionado con un aumento en la ansiedad de los animales (Blanchard y Blanchard 1999; Estelles y cols. 2004). Este hecho, sumado a que la interacción social es parte del repertorio conductual inicial de los residentes frente al intruso para comenzar a desplegar las conductas ofensivas (Koolhaas y cols. 1980; Banjaw y cols. 2006), indicaría que, la disminución en el tiempo de interacción social podría contribuir a la reducción en la aparición de las conductas agresivas. Por otra parte, algunos autores han demostrado que cocaína administrada a dosis altas (10-20 mg/kg) y en tratamientos agudos, induce un efecto ansiogénico en el modelo de Laberinto en cruz elevado (Rogerio y Takahashi 1992; Yang y cols. 1992). Este efecto estaría en concordancia con la observación de que una disminución en la ansiedad (efecto ansiolítico) podría favorecer a la expresión de conductas agresivas. De hecho, esta evidencia ha quedado demostrada en ratas hembras lactantes y en una cepa de ratas con baja ansiedad denominada “low anxiety-related behavior” (LAB) (Ferreira y cols. 2002; Neumann y cols. 2010). A pesar de estas evidencias, sería necesario realizar un experimento en el que se evaluara el grado de ansiedad que poseen animales residentes inyectados con cocaína o PBC luego de haber sido sometidos al protocolo de agresión inducido por aislamiento.

Por otra parte, el aumento en la actividad exploratoria (*rearings*) observada en los residentes tratados con PBC 1 y cocaína estuvo en concordancia con el aumento en la locomoción registrada en otro grupo de animales tratados bajo las mismas condiciones. Es posible que el estado hiperactivo de los residentes haya predominado sobre las otras conductas agresivas y de interacción social impidiendo que éstas se expresen.

El efecto estimulante estuvo en relación con el aumento en los niveles tisulares de DA y con la concomitante disminución del recambio DAérgico en el NAcc de animales tratados con PBC 1 y cocaína, parámetros cuantificados en otro grupo de animales tratados bajo las mismas condiciones (ver Tabla 9). Los cambios neuroquímicos sobre el sistema DAérgico resultaron los esperados de acuerdo al mecanismo de acción de drogas estimulantes como la cocaína. De hecho, el aumento en la transmisión DAérgica se ha correlacionado ampliamente con el efecto estimulante y reforzador inducido por la droga (Kuczenski y cols. 1991; Feldman y cols. 1997; Torregrosa y Kalivas 2007). PBC 1 indujo la misma modificación que cocaína, sugiriendo nuevamente que la cocaína base, presente en esta muestra, sería la responsable principal de dicho cambio neuroquímico. Este resultado constituye, a su vez, la caracterización pre-clínica del cambio neuroquímico más típico de una droga de abuso.

Varias evidencias implican la vía DAérgica mesocorticolímbica en la conductas agresivas (Miczek y cols. 2002; Miczek y Fish 2005). Existen trabajos que muestran que el antagonista selectivo del receptor DAérgico D₂, haloperidol, o antipsicóticos atípicos

(risperidona, clozapina) con afinidad por receptores DAérgicos, han sido utilizados efectivamente por décadas, e incluso actualmente, para tratar a pacientes agresivos, especialmente aquellos que padecen psicosis (Nelson y Trainor 2007). En modelos pre-clínicos, antagonistas de receptores DAérgicos D_1 y D_2 también han demostrado efectos anti-agresivos en modelos animales de agresión. Por otro lado, se ha descrito que animales residentes entrenados para confrontar a un intruso, poseen un aumento de DA en el NAcc previo al momento de la contienda y luego de finalizada la misma (van Erp y Miczek 2000; Ferrari y cols. 2003) demostrando que un aumento en la transmisión DAérgica estaría en la base de las conductas agresivas.

Nuestra estrategia experimental, permitió establecer una relación entre el bloqueo de la agresión observada en los residentes tratados con PBC 1 y cocaína y el aumento de DA que generan ambas drogas en el NAcc. Estos datos apoyan la participación del sistema DAérgico en la conducta agresiva, aunque paradójicamente a lo descrito, una sobre-activación del circuito mesocorticolímbico estaría afectando el despliegue agresivo bloqueando la respuesta. Esta discrepancia pone de manifiesto la necesidad de profundizar en el estudio del papel de la DA en la agresión.

A diferencia de la DA, el papel de la 5-HT en la agresión está bien caracterizado. Una amplia evidencia sostiene que el aumento de 5-HT a nivel central se relaciona con una disminución de las conductas agresivas (Molina y cols. 1987; Brunner y Hen 1997; van Erp y Miczek 2000). Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de acción de cocaína implica un bloqueo de la proteína transportadora de 5-HT, efecto que se corresponde con un aumento en la neurotransmisión 5-HTérgica y su concomitante disminución en el recambio del neurotransmisor (Ritz y cols. 1990; Müller y Huston 2006). Nuestros resultados muestran que la administración de PBC 1 y cocaína tendió a aumentar los niveles de 5-HT en la CPF total y a disminuir el recambio 5-HTérgico. Estos cambios neuroquímicos se corresponderían con el bloqueo de las conductas agresivas observado en los residentes.

Es importante mencionar, que los cambios en el sistema 5-HTérgico no fueron significativamente evidentes en las secciones de la CPF medial y lateral luego del tratamiento con PBC 1 y cocaína. Parece indudable que la funcionalidad de la CPF se modifica cuando se diseca en sub-secciones, siendo necesario el estudio de la CPF total para determinar los cambios neuroquímicos inducidos por PBC 1 y cocaína. Hasta nuestro conocimiento, en la literatura no había suficiente información que asociara el bloqueo del patrón agresivo inducido por cocaína en ratas macho con el aumento de la actividad locomotora y del sistema DAérgico y 5-HTérgico en regiones que integran el circuito mesocorticolímbico. En este sentido, nuestros datos aportan información a la tan compleja relación droga de abuso-conducta agresiva, y en particular, aportamos datos originales sobre las acciones de PBC en esta respuesta conductual. Finalmente, no hay que perder de vista que la asociación entre PBC y el patrón de agresividad en sus consumidores se evidencia generalmente luego del consumo repetido y de la

abstinencia a la droga. Será necesario realizar futuros experimentos para abordar este estudio.

Efecto residual en el día Post-test.

La evaluación de las conductas agresivas en el día del Post-test permitió evidenciar que el pre-tratamiento de PBC 1 y cocaína no generó un efecto residual, confirmando así que los cambios conductuales observados el día del Test fueron producto exclusivamente del efecto farmacológico de ambas drogas. A su vez, la ausencia de efecto residual está de acuerdo con la cinética de la cocaína ya que se ha demostrado que la vida media de la cocaína es de 40 a 60 min en animales tratados a altas dosis en forma subcutánea (Nayak y cols. 1975).

La evaluación neuroquímica realizada en los residentes inmediatamente después de finalizado el Post-test, demostró que el cambio neuroquímico en el sistema DAérgico en el NAcc inducido por las drogas no se mantuvo a las 24 hs. de evaluación. Es decir, no hubo efecto residual sobre el sistema DAérgico por parte de ambas drogas. En forma indirecta, esta evaluación nos permitió confirmar que los cambios neuroquímicos sobre el sistema DAérgico estuvieron en la base de la propiedad anti-agresiva inducida por ambas drogas. Sin embargo, es importante mencionar que no se han podido obtener las mismas conclusiones para el sistema 5-HTérgico. Las regiones de la CPF medial y lateral en los animales residentes luego de realizado el Post-test no nos permiten determinar si hubo o no efecto residual de las drogas. No contamos con un correlato exacto del efecto de las drogas luego de la sesión del Test, dado que con el tratamiento agudo no se evidenciaron diferencias significativas en los niveles tisulares de 5-HT en dichas regiones. Será necesaria la disección de la CPF total para demostrar si existe efecto residual de las drogas a nivel neuroquímico.

Finalmente, la similitud en los valores de DA y 5-HT de los grupos controles mostrados en las Tablas 9 y 10, sugieren que la neurotransmisión monoaminérgica basal no fue modificada por los encuentros de agresión. Aunque de manera indirecta, estos resultados apoyan el correlato neuroquímico mostrado para los animales residentes en el día del Test.

VIII. CONCLUSIONES.

- Se caracterizó, desde el punto de vista pre-clínico, la propiedad estimulante aguda de muestras de PBC con distinta composición química. La misma resultó ser dependiente de la dosis.
- El efecto estimulante dependió principalmente del contenido en cocaína base en las muestras. Sin embargo, la presencia de cafeína en determinadas muestras demostró un efecto aditivo generando una potenciación del efecto estimulante. Indirectamente, se descartó la participación de las impurezas en el efecto estimulante obtenido. Si bien la vía de administración es un factor clave a considerar en el perfil característico de los consumidores de la PBC, la presencia de cafeína en las muestras de PBC parece ser relevante en el efecto estimulante inducido por la droga.
- PBC 1 indujo un bloqueo del patrón agresivo de los animales, conjuntamente con un aumento de la actividad exploratoria. Esta respuesta conductual se relacionó con un estado hiperactivo así como con cambios en la neurotransmisión DAérgica y 5-HTérgica en el circuito mesocorticolímbico. Estos datos confirman la participación de éste circuito en la modulación de las conductas agresivas. Asimismo, dado que estas acciones fueron similares a las inducidas por cocaína, se sugiere que la cocaína base en la muestra de PBC 1 fue la principal responsable de sus efectos conductuales y neuroquímicos.
- No hubo efecto residual de PBC 1 y cocaína, confirmando que los cambios conductuales en el día del Test fueron desencadenados específicamente por ambas drogas. A su vez, estos resultados apoyan la hipótesis de que una sobre-activación del sistema DAérgico subyacería a la conducta anti-agresiva.
- En su conjunto, los datos presentados en el desarrollo de esta Tesis constituyen el primer trabajo pre-clínico realizado sobre los efectos farmacológicos de PBC a nivel del Sistema Nervioso Central. Asimismo, estos datos serán la base a partir de la cual se profundizará en otros efectos de la PBC sobre el SNC.

IX. PERSPECTIVAS.

- Es necesario realizar un análisis químico cuantitativo de un mayor número de muestras de PBC del Uruguay. Este análisis permitirá conocer si existe un patrón determinado en la composición química de las muestras que circulan en nuestro país.
- Es necesaria la realización de futuros experimentos para la evaluación de la interacción ente cocaína y cafeína sobre el efecto estimulante en muestras de PBC volatilizadas. Este estudio combinará los factores de la vía de administración y la composición química para testear la potenciación del efecto estimulante de la PBC. A su vez, este experimento sentará las bases para proponer que la cafeína puede ser responsable del mayor efecto reforzador/adictivo de la PBC. Una vez comprobado, deberán realizarse estudios utilizando un modelo específico para evaluar el potencial reforzador de la PBC (por ejemplo CPP).
- Se estudiará si PBC con distintas composiciones químicas es capaz de desencadenar el fenómeno de sensibilización comportamental. Estos experimentos proporcionarán información sobre el poder adictivo de la PBC.
- Será necesario realizar protocolos que impliquen tratamientos repetidos y a bajas dosis para evidenciar aumentos de la agresión bajo el efecto de PBC (con y sin cafeína) y compararlos con los inducidos por cocaína. A su vez, incorporar en el protocolo de agresión un período de abstinencia a la droga, nos permitirá evaluar su participación en la aparición de conductas agresivas, profundizando el estudio de la relación drogas de abuso-agresión.

FINANCIACIÓN.

Beca de Maestría otorgada por la ANII (BE_POS_2009_567) de Agosto 2009-Julio 2011.

Proyecto Fondo Sectorial de Salud, FSS 1_1613, ANII.

PEDECIBA (alícuota 2009 y 2010).

X. REFERENCIAS

- Ahmed SH y Koob GF. 1999. Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. *Psychopharmacology*, **146**: 303-312.
- Antoniou K, Kafetzopoulou E, Papadopoulou-Daifotis Z, Hyphantis T, Marselos M. 1998. D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **23**: 189-196.
- Archer J. 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior*, **21**: 205-235.
- Banjaw MY, Miczek K, Schmidt WJ. 2006. Repeated *Catha edulis* oral administration enhances the baseline aggressive behavior in isolated rats. *Journal of Neural Transmission*, **113**: 543-556.
- Bedingfield JB, King DA, Holloway FA. 1998. Cocaine and Caffeine: Conditioned Place Preference, Locomotor activity and additivity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **61** (3): 291-296.
- Berton O, McClung CA, DiLeone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. 2006. Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science*, **311**(5762): 864-8.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. 1999. Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **23**: 981-991.
- Broderick P, Hopea O, Okonjia C, Rahn D, Zhou Y. 2004. Clozapine and cocaine effects on dopamine and serotonin release in nucleus accumbens during psychostimulant behavior and withdrawal. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **28**: 157-171.
- Brody SL. 1990. Violence associated with acute cocaine use in patients admitted to a medical emergency department. *National Institute on Drug Abuse Research Monograph Series*, **103**: 44-59.
- Brower MC y Price BH. 2001. Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **71**(6): 720-6.
- Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE. 2001. Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **296**(3):762-7.

- Brunner D y Hen R. 1997. Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Annual New York Academy of Science*, **836**: 81-105.
- Cabib S, D'Amato FR, Puglisi-Allegra S, Maestriperi D. 2000. Behavioral and mesocorticolimbic dopamine responses to non aggressive social interactions depend on previous social experiences and on the opponent's sex. *Behavioral Brain Research*, **112**(1-2): 13-22.
- Carr DB y Sesack SR. 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.
- Castaño GA. 2000. Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones*, **12** (4): 541-550.
- Castaño GA. Comunicación personal: “Perspectivas para el desarrollo de la investigación sobre cocaínas fumables. Efectos Neuro-psico-bio-farmacológicos de las Cocaínas fumables”.
- Castro de la Mata R. 1989. Aspectos farmacológicos de la pasta básica de cocaína. En: F. R. León, Castro de la Mata (ed). *Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario*. Centro de Información y Educación para la Prevención del Abuso de Drogas (CEDRO). <http://www.cedro.org.pe>
- Cauli O y Morelli M. 2005. Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology*, **16**(2): 63–77.
- Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syedc Q, Bellisa M. 2011. Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Test and Analysis*, **3**: 89-96.
- Cole SO. 1978. Brain mechanisms of amphetamine-induced anorexia, locomotion, and stereotypy: a review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **2**: 89-100.
- Cornish JW. y O'Brien CP. 1996. Crack cocaine abuse: an epidemic with many public health consequences. *Annual Review of Public Health*, **17**: 259-73.
- Creese I e Iversen SD. 1974. The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behavior in the rat. *Psychopharmacologia*, **39**(4): 345-57.
- Dahlström A y Fuxe K. 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta physiologica Scandinavica, Supplementum*, **62**: 1-55.
- Darmani NA, Hadfield MG, Carter WH, Martin BR. 1990. Acute and chronic effects of cocaine on isolation-induced aggression in mice. *Psychopharmacology*, **102**: 37-40.
- Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL. 2000. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation-a possible prelude to violence. *Science*, **289**(5479): 591-4.

- Davis WM. 1996. Psychopharmacologic violence associated with cocaine abuse: kindling of a limbic dyscontrol syndrome?. *Progress in Neuropsychopharmacology of Biology and Psychiatry*, **20**(8): 1273-300.
- de Almeida RM, Saft DM, Rosa MM, Miczek KA. 2010. Flunitrazepam in combination with alcohol engenders high levels of aggression in mice and rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **95**(3): 292-7.
- de Boer SF y Koolhaas JM. 2005. 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: A pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *European Journal of Pharmacology*, **526**: 125–139.
- Di Chiara G e Imperato A. 1987. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats (amphetamine/cocaine/ethanol/nicotine/opiates). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 5274–8.
- DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 1994. Substance-related disorders.
- El Yacoubi M, Ledent C, Ménard J-F, Parmentier M, Costentin J. 2000. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British Journal of Pharmacology*, **29**: 1465-73.
- Elsohly MA, Brenneisen R, Jones AB. 1991. Coca Paste: Chemical Analysis and Smoking Experiments. *Journal of Forensic Sciences*, **36**: 93-103.
- Estelles J, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro J. 2004. Social behavioural profile of cocaine in isolated and grouped male mice. *Drug and Alcohol Dependence*, **76**: 115-123.
- Evrard I, Legleyeb S, Cadet-Taïroua A. 2010. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy*, **21**: 399-406.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. 1997. Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates. American Psychological Association.
- 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.
- Ferrari PF, Van Erp AMM, Tornatzky W, Miczek KA. 2003. Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *European Journal of Neuroscience*, **17**: 371-378.

- Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. 1997. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in Neuroscience*, **20**(10): 482-7.
- Ferré S. 2008. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Neurochemistry*, **105**(4): 1067-79.
- Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N, Fernández-Guasti A. 2002. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology and Behavior*, **77**: 197-204.
- Ferris CF, Stolberg T, Kulkarni P, Murugavel M, Blanchard R, Blanchard DC, Febo M, Brevard M, Simon NG. 2008. Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neuroscience*, **9**: 111.
- Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. 2004. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**: 857-72.
- Fredholm BB, Battig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. 1999. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **51**(1): 83-133.
- Fuster R. 2007. The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe. Philadelphia-New York, Lipincott-Raven.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, **379**(6566): 606-12.
- Goeders NE y Smith JE. 1986. Reinforcing properties of cocaine in the medial prefrontal cortex: Primary action on presynaptic dopaminergic terminals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **25** (1): 191-199.
- Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM. 2009. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity-A Review. *Disease-a-month: DM*, **55**: 6-38.
- Gostic T, Klemenc S, Stefane B. 2009. A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Science International*, **187**: 19-28.
- Halász J, Tóth M, Kalló I, Liposits Z, Haller J. 2006. The activation of prefrontal cortical neurons in aggression-A double labeling study. *Behavioural Brain Research*, **175**: 166–175.
- Hall FS, Li XF, Randall-Thompson J, Sora I, Murphy DL, Lesch KP, Caron M, Uhl GR. 2009. Cocaine-conditioned locomotion in dopamine transporter, norepinephrine transporter and 5-HT transporter knockout mice. *Neuroscience*, **162**(4): 870-80.

Han DD y Gu HH. 2006. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacology*, **3**: 6:6.

Hatsukami DK. y Fischman MW. 1996. Crack cocaine and Cocaine hydrochloride, are the differences myth or reality?. *The Journal of the American Medical Association*, **276** (19): 1580-1588.

Hoaken PN y Stewart SH. 2003. Drugs of abuse and the elicitation of human aggressive behavior. *Addictive Behaviors* **28**: 1533–1554.

Hooks MS y Kalivas PW. 1995. The role of mesoaccumbens-pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation. *Neuroscience*, **64** (3): 587-597.

Huizer H. 1987. Analytical studies on illicit heroin. Efficacy of volatilization during heroin smoking. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* **9**: 203-211.

Jeri FR. 1978. El síndrome de la pasta de coca. En: *Revista de la Sanidad del Ministerio del interior*, **39**: 1-18.

Jeri FR. 1984. Coca-paste smoking in some Latin American countries: a severe and unabated form of addiction. *Bulletin on narcotics*, **36**(2): 15-31.

Jones RT 1997. Pharmacokinetics of cocaine: considerations when accessing cocaine use by urinalysis. *NIDA Research Monography*, **175**: 221-34.

Junta Nacional de Drogas (JND) 2006. Pasta Base de Cocaína: prácticas y gestión de riesgos en adolescentes uruguayos, Edición, Junta Nacional de Drogas. Presidencia de la República. <http://www.infodrogas.gub.uy>

Junta Nacional de Drogas (JND) 2007. Drogas más información menos riesgos. 6ª Edición, Junta Nacional de Drogas. Presidencia de la República. <http://www.infodrogas.gub.uy>

Kalivas P y Duffy P. 1990. Effect of Acute and Daily Cocaine Treatment on Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens. *SYNAPSE*, **5**: 48-58.

Kalivas PW y Volkow ND. 2005. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *The American journal of psychiatry*, **162**: 1403–1413.

Kelly PH e Iversen SD. 1976. Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. *European Journal of Pharmacology*, **40**(1): 45-56.

Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K. 2009. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behavioral Brain Research*, **202**(1): 114-21.

- Koob GF y Bloom FE. 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* **242**: 715–723.
- Koob GF y Le Moal M. 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, **278** (5335): 52-58.
- Koob GF y Volkow ND. 2010. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology REVIEWS*, **35**: 217–238.
- Koolhaas JM, Schuurman T, Wiepkema PR. 1980. The organization of intraspecific agonistic behaviour in the rat. *Progress in Neurobiology*, **15**: 247-268.
- Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML. 1991. Amphetamine, Cocaine, and Fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *The Journal of Neuroscience*, **11**(9): 2703-2712.
- Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S. 2008. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **41**: 135-140.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann AN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2a} receptor. *Letters to Nature*, **388**: 674-678.
- Le Moal M y Simon H. 1991. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological reviews*, **71**(1):155-234. *Life Science*, **67**(12): 1507-15.
- Linnoila VM y Virkkunen M. 1992. Aggression, suicidality, and serotonin. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **53**: 46-51.
- Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P. 2002. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones*, **14** (1): 57-64.
- Long SF, Wilson MC, Sufka KJ, Davis WM. 1996. The effects of cocaine and nandrolone co-administration on aggression in male rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **20**: 839-856.
- Louilot A, Le Moal M, Simon H. 1986. Differential reactivity of dopaminergic neurons in the nucleus accumbens in response to different behavioral situations. An in vivo voltammetric study in free moving rats. *Brain Research*, **397**(2): 395-400.
- Miczek KA y Fish EW. 2002. Dopamine, Glutamate, and Aggression. En: *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*, capítulo 11. Edited by: W. J. Schmidt and M. E. A. Reith © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

- Miczek KA y O'Donnell J. 1978. Intruder-evoked aggression in isolated and non isolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology*, **57**: 47-55.
- Miczek KA y Tidey JW. 1989. Amphetamines: aggressive and social behavior. *NIDA Research Monography*, **94**: 68-100.
- Miczek KA, 1979. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-Amphetamine and Cocaine. *Psychopharmacology*, **60**: 253-259.
- Miczek KA, de Almeida RMM, Kravitz EA, Rissman EF, de Boer SF, Raine A. 2007. Neurobiology of Escalated Aggression and Violence. *The Journal of Neuroscience*, **27**(44): 11803–11806.
- Miczek KA, Fish EW, de Bold JF, de Almeida RMM. 2002. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and g-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology*, **163**: 434-458.
- Miczek KA, Weerts EM, Tornatzky W, DeBold JF, Vatn TM. 1992. Alcohol and "bursts" of aggressive behavior: ethological analysis of individual differences in rats. *Psychopharmacology*, **107**: 551-563.
- Miller BL, Darby A, Benson DF, Cummings JL, Miller MH. 1997. Aggressive, socially disruptive and antisocial behavior associated with fronto-temporal dementia. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, **170**: 150-4.
- Miller EK y Cohen JD. 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review in Neuroscience*, **24**: 167-202.
- Molina V, Ciesielski L, Gobaille S, Isel F, Mandel P. 1987. Inhibition of mouse killing behavior by serotonin-mimetic drugs: effects of partial alterations of serotonin neurotransmission. *Pharmacology, Biochemical and Behavior*, **27**(1): 123-31.
- Montgomery KC y Monkman JA. 1955. The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of comparative and physiological psychology*, **48**: 132-136.
- Moraes M, Scorza C, Abin-Carriquiry JA, 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**(2): 100-104.
- Müller CP y Huston JP. 2006. Determining the region-specific contributions of 5-HT receptors to the psychostimulant effects of cocaine. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **27** (2): 105-112.
- Navarro R. 1989. Aspectos clínicos de la dependencia a la pasta básica de cocaína. En: León FR, Castro de la Mata R, editores. Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario. CEDRO. <http://www.cedro.org.pe>

Nayak PK, Misra AI, Mule SJ. 1975. Physiological disposition and biotransformation of [³H]cocaine in acutely and chronically treated rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **196**(3): 556-569.

Nelson RJ y Chiavegatto S. 2000. Aggression in Knockout Mice. *ILAR Journal Online issue*, **41**(3).

Nelson RJ y Trainor BC. 2007. Neural mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience*, **8** (7): 536-546.

Neumann I, Veenema A, Beiderbeck D. 2010. Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **4** (12): 1-16.

Observatorio Uruguayo de drogas. "Informe 2007: Situación y tendencias del consumo de drogas en Uruguay". Publicado por la Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República. <http://www.infodrogas.gub.uy/LOUD/index.htm>

Oliver B y Mos J. 1992. Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry*, **16**: 847-870.

Olivier B y Young LJ. 2002. Animal models of aggression. *En: The Fifth Generation of progress*, Cap. 118.

Organización Mundial de la Salud. 1987. Adverse health consequences of cocaine abuse. Edited by Arif A., Formerly, Senior medical Officer. Division of Mental Health. Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/publications/es>

Patkina NA, Zvartau EE. 1998. Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **8**(4): 287-91.

Pérez J. 2003. Clínica de la adicción a la pasta base de cocaína. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, **4**(1):55-63.

Perrine SA, Sheikh IS, Nwaneshiudu C, Schroeder JA, Unterwald EM. 2008. Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety- and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology*, **54**(2): 355-364.

Pierce RC y Kalivas PW. 1997. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews* **25**: 192-216.

Poleszak E y Malec D. 2000. Influence of adenosine receptor agonists and antagonists on amphetamine-induced stereotypy in rats. *Polish journal of pharmacology*, **52**: 423-429.

- Raine A y Yang Y. 2006. Neural foundations to moral reasoning and antisocial behavior. *Social cognitive and affective neuroscience*, **1**(3): 203-13.
- Rilke O, Freier D, Jahkel M, Oehler J. 1998. Dynamic alterations of serotonergic metabolism and receptors during social isolation of low- and high-active mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **59**: 891–896.
- Ritz MC, Cone EJ, Kuhar MJ. 1990. Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Science*, **46** (9): 635-45.
- Robinson TE y Berridge KC. 1993. The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, **18**: 247-291.
- Rogério R y Takahashi RN. 1992. Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **43**(2):631-633.
- Sahakian BJ, Robbins TW, Morgan MJ, Iversen SD. 1975. The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats. *Brain Research*, **84**(2): 195-205.
- Samaha AN y Robinson TE. 2005. Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction?. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **26** (2): 82-87.
- Schenk S, Valadez A, Horger BA, Snow S, Wellman PJ. 1994. Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration. *Behavioural Pharmacology*, **5**(2): 153-158.
- Seo D, Patrick CJ, Kennealy PJ. 2008. Role of serotonin and dopamine system interactions in the neurobiology of impulsive aggression and its comorbidity with other clinical disorders. *Aggression and Violent Behavior*, **13**: 383–395.
- Sesack S y Grace A. 2010. Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology reviews*, **35**: 27-47.
- Simonsen KW, Kaa E, Nielsen E, Rollmann D. 2003. Narcotics at street level in Denmark. A prospective investigation from 1995 to 2000. *Forensic Science International*, **131**: 162–70.
- Tidey JW y Miczek KA. 1996. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, **721**(1-2): 140-9.
- Torregrossa MM y Kalivas PW. 2007. Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **90** (2): 261-272.

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** (1): 37-48.

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

van Erp AMM y Miczek KA. 2000. Aggressive Behavior, Increased Accumbal Dopamine, and Decreased Cortical Serotonin in Rats. *The Journal of Neuroscience*, **20**(24): 9320-9325.

Vergnes M, Depaulis A, Boehrer A. 1986. Parachlorophenylalanine-induced serotonin depletion increases offensive but not defensive aggression in male rats. *Physiology and Behavioral*, **36**(4): 653-8.

Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin R, Fowler JS, Franceschi D, Franceschi M, Logan J, Gatley SJ, Wong C, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. 2000. Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Science*, **67**(12): 1507-15.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. 2011. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (37): 15037-42.

Wilson JF, Nugent NR, Baltes JE, Tokunaga S, Canic T, Young BW, Bellinger ER, Delac DT, Golston GA, Hendershot DM. 2000. Effects of low doses of caffeine on aggressive behavior of male rats. *Psychological Reports*, **86**(3):941-946.

White SM, Kucharik RF, Moyer JA. 1991. Effects of serotonergic agents on isolation-induced aggression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **39**: 729–736.

Yang XM, Gorman AL, Dunn AJ, Goeders NE. 1992. Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, **41**(3):643-50.

TRABAJO CIENTÍFICO

Primer estudio pre-clínico de la acción de pasta base de cocaína en el sistema nervioso central

Trabajos originales

Resumen

El consumo de pasta base de cocaína (PBC) constituye un serio problema en varios países de Latinoamérica, incluyendo Uruguay. Actualmente, no hay evidencias científicas publicadas sobre la acción de PBC en el sistema nervioso central (SNC) que expliquen la sintomatología que aparece en sus consumidores. La PBC es una forma fumable de cocaína. Aunque algunos de los efectos subjetivos de la PBC son similares a los observados por cocaína en su forma de clorhidrato (CC; estimulación, des-inhibición), varias características las distinguen clínicamente: rotura de códigos sociales, impulsividad, agresividad y un alto grado de dependencia. La cocaína es una potente droga estimulante del SNC. Sus propiedades adictivas en humanos se basan principalmente en su acción neurobiológica sobre el sistema mesolímbico (área tegmental ventral - núcleo accumbens; NAcc), causando un aumento en la transmisión dopaminérgica (DAérgica). Este efecto neuroquímico es esencial para que las drogas de abuso induzcan el comportamiento reforzador y así promuevan la aparición de la adicción. Con el objetivo de comenzar la caracterización de las acciones centrales de PBC, en el presente trabajo se estudia sus efectos sistémicos en agudo sobre el sistema DAérgico mesolímbico. En primer lugar, se realizó un análisis químico de la muestra de PBC (gota), que mostró un alto contenido en cocaína base (68%). Luego de la administración sistémica aguda en ratas, la PBC indujo un aumento en la transmisión DAérgica evidenciada por la estimulación locomotora y un aumento en los niveles tisulares de DA en la región del NAcc. Inyectada a dosis equimolares con CC y usando una misma vía de administración, la PBC no mostró diferencias con las acciones inducidas por CC, indicando que el contenido en cocaína base presente en la muestra de PBC podría ser la responsable de los efectos observados. Serán necesarios futuros experimentos para determinar cuál es el papel neurobiológico de los otros componentes presentes en la muestra de PBC. Los presentes resultados permitirán avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de la PBC, aportando evidencias para alcanzar un tratamiento específico y eficaz para sus consumidores.

Summary

Cocaine base paste, CBP (the acronym in Spanish for "pasta base de cocaína") consumption is a major health and social problem in several Latin-American countries, including Uruguay. Currently, there are no published scientific evidences of CBP central actions that may explain the syntonatology observed in its consumers. CBP is a cocaine-smoking form. Although subjective effects induced by CBP are shared with those of cocaine in its hydrochloride form - C-hy- (stimulation, des-inhibition), its consumers present distinctive clinical features like a breach of social codes, behavioral changes, impulsivity, aggressiveness and a greater abuse liability. Cocaine is a potent stimulant of the central nervous system (SNC). Its addictive properties in humans are mainly based on its neurobiological actions on the mesolimbic system (Ventral Tegmental Area - Nucleus Accumbens; NAcc), causing an increase in the dopaminergic (DAérgic) transmission. This neurochemical effect is essential for the behavior reinforcement of the drug, promoting addiction. In order to start the characterization of CBP central actions, in the present work we studied its systemic acute effects on the mesolimbic DAérgic system. First, a chemical analysis of a CBP sample ("gota") was performed, showing a high content in cocaine base (68%). When CBP was acutely administered to rats, it induced an increase of DAérgic transmission, evidenced by locomotor stimulation and increased DA tissue levels in the NAcc region. When injected at equimolar doses of C-hy and using the same administration route, CBP didn't show any differences with the C-hy-actions, indicating that the cocaine base present in the CBP sample might be responsible of the observed effects. Further experiments will be necessary to determine the neurobiological role of other components present in CBP sample. These data will improve the knowledge about the CBP mechanism of action, contributing to achieve an effective and specific treatment to CP consumers.

Autores

María Noel Meikle

Estudiante de Maestría, PEDECIBA-Biología. Laboratorio de Biología Celular, IIBCE.

Jessika Urbanavicius.

Estudiante de Maestría, PEDECIBA-Biología del Departamento de Neuroquímica, IIBCE. Investigadora Grado 2 del Laboratorio de Biología Celular, IIBCE.

Giselle Prunell

Doctora en Neurociencias, Investigadora Asistente del Departamento de Neuroquímica, IIBCE.

Eleuterio Umpiérrez

Encargado de Laboratorio de Análisis Orgánico de Facultad de Química-Polo Tecnológico de Pando.

Andrés Abín-Carriquiry

Estudiante de Doctorado, PEDECIBA-Química del Departamento de Neuroquímica, IIBCE. Encargado del Servicio de HPLC institucional del IIBCE.

María Cecilia Scorza

Doctora en Neurociencias, Investigadora Asistente del Laboratorio de Biología Celular, IIBCE.

Correspondencia:

María Cecilia Scorza. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, IIBCE. Laboratorio Biología Celular. Avenida Italia 3318, (+) 598 2 487 16 16
scorza@iibce.edu.uy

Palabras clave

Pasta base de cocaína
Clorhidrato de cocaína
Estimulante
Dopamina
Núcleo accumbens

Key words

Cocaine basic paste
Cocaine hydrochloride
Stimulant
Dopamine
Accumbens nucleus

Introducción

Problemática en el consumo de pasta base de cocaína

El consumo de pasta base de cocaína (PBC) aparece en varios países de Latinoamérica a partir de los años 70 y constituye un serio problema de salud pública desde hace varias décadas¹⁻⁴. Sin embargo, el consumo de PBC en Uruguay, como un problema social importante, surge recién en los últimos años, marcadamente asociado a la crisis económica del año 2002⁵. Esta situación favoreció una alta disponibilidad de PBC en el contexto de las drogas ilegales, debido a su bajo costo y dada la obtención de la misma a través de procesos de laboratorio muy simples. Estas características hicieron que el consumo de PBC tuviera una rápida instauración en el mercado generando un gran impacto en la población en general.

El consumo de PBC sostenido en el tiempo causa cuatro fases claramente distinguibles en la clínica: euforia, disforia, alucinaciones, psicosis paranoide; puede producir una severa intoxicación (donde predomina la angustia y una fuerte compulsión por consumir), psicosis prolongada o recaídas de psicosis y en algunos casos, la muerte. También se describe una devastación cada vez más intensa en los hábitos de la alimentación y de la higiene personal⁶. La marcada disminución en el peso corporal se utiliza en la clínica como marcador

de consumo activo; también aparece insomnio e irritabilidad, alteraciones cognitivas (alteraciones de memoria y concentración), conductas antisociales o asociadas a actos violentos, desinterés laboral y académico.

Si bien algunos de los efectos subjetivos inducidos por PBC (euforia, desinhibición, disforia post-consumo) son compartidos con los observados por cocaína en su forma de clorhidrato (CC), o con otras sustancias de abuso (anfetamina), algunas de las características que distinguen clínicamente el consumo de PBC del de otras sustancias de abuso, son la rotura de códigos sociales, los cambios de conducta y una gran impulsividad y agresividad²⁻⁶.

Los actores involucrados en la asistencia de los consumidores de PBC se vieron enfrentados a una nueva situación de diagnóstico y al tratamiento de síntomas inducidos por esta droga. El desconocimiento del mecanismo de acción de PBC a nivel del sistema nervioso central (SNC) generó la necesidad inmediata de contar con información sobre sus efectos neurobiológicos y las alteraciones físicas y psíquicas luego del consumo crónico.

¿Qué es la pasta base de cocaína?

La PBC, conocida también como pasta de coca, pasta base o simplemente pasta es el primer producto de extracción cruda obtenido durante el proceso de purificación y obtención del alcaloide cocaína en su forma de clorhidrato (Esquema 1).

Esquema 1 | Proceso para la obtención de clorhidrato de cocaína

Hoja de coca

Pasta base de cocaína

Clorhidrato de cocaína

Crack o cocaína base libre

Vía de administración

Fumable

Intra-nasal

Fumable

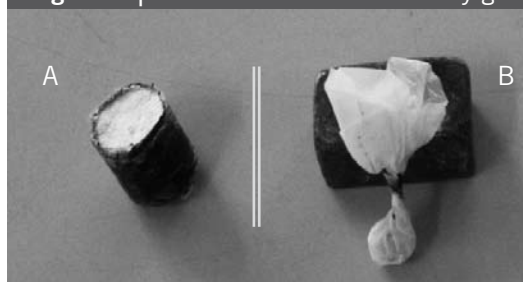
El esquema muestra que la PBC es un paso intermedio y temprano en el procesamiento de la hoja de coca para la obtención del clorhidrato de cocaína y que el crack es un paso posterior⁶. La PBC es una de las cocaínas fumables, al igual que el *crack* o también denominada como cocaína base libre, a diferencia del clorhidrato de cocaína que se consume principalmente por vía intra-nasal.

Se obtiene de la maceración de las hojas del arbusto *Erythroxylon coca* con ácido sulfúrico u otros productos químicos alcalinos, solventes orgánicos, amoníaco. La mezcla posee un color amarillento o amarronado, semisólido, conteniendo cocaína –en forma de sal y base libre–, otros alcaloides, residuos de queroseno, ácido sulfúrico (de ahí el nombre de sulfato de cocaína), además de otras impurezas⁷.

La proporción del alcaloide cocaína en muestras de PBC varía desde 40% a 70%, dependiendo del origen de la planta (las hojas de plantas provenientes de Bolivia, Perú y Ceilán contienen menos alcaloides pero una proporción superior de cocaína)⁸. La PBC se vende/consume en forma de “gota” o “lágrima”, siendo su forma “tiza” la que se utiliza en el transporte de tráfico internacional (Figura 1).

La figura muestra la PBC en sus formas de “tiza” (A) y “gota” (B) proporcionadas por el Instituto Técnico Forense del Uruguay con la autorización de la Junta Nacional de Drogas.

Figura 1 | PBC en sus formas de tiza y gota

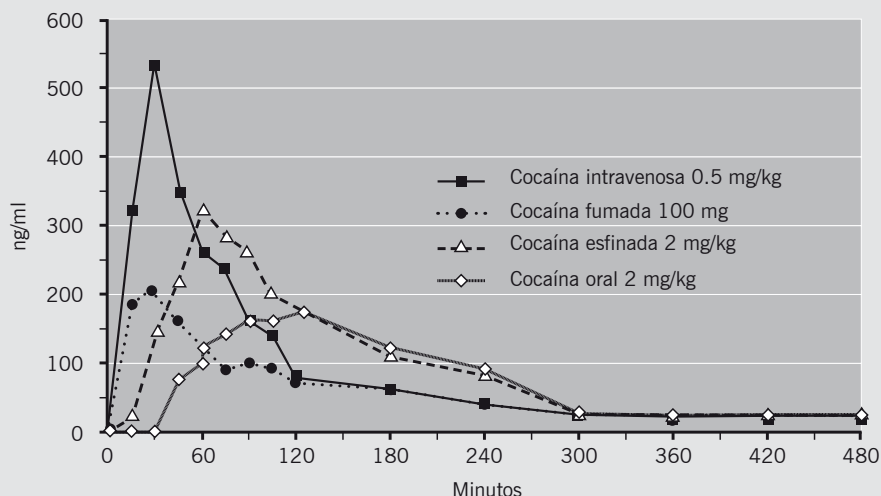


Diferentes vías de administración de cocaína

La PBC, al igual que el *crack*, es una forma fumable de cocaína (Esquema 1). Su punto de sublimación es bajo a diferencia del de CC, cuyo punto de volatilización es muy alto, lo que impide su sublimación y por lo tanto no se puede fumar dado que sería destruida por el calor⁶.

Se sabe que la cantidad de cocaína que se absorbe a nivel sistémico depende fundamentalmente de su vía de administración (Figura 2). Por lo tanto, comenzar por estudiar la acción de PBC sobre el SNC implica conocer si la vía de administración es o no un factor importante para considerar sus efectos farmacológicos. En este sentido, ya se ha publicado la velocidad con que alcanzaría la cocaína el SNC luego de diferentes vías de administración (Figura 2).

Figura 2 | Niveles plasmáticos de cocaína base libre luego de diferentes vías de administración



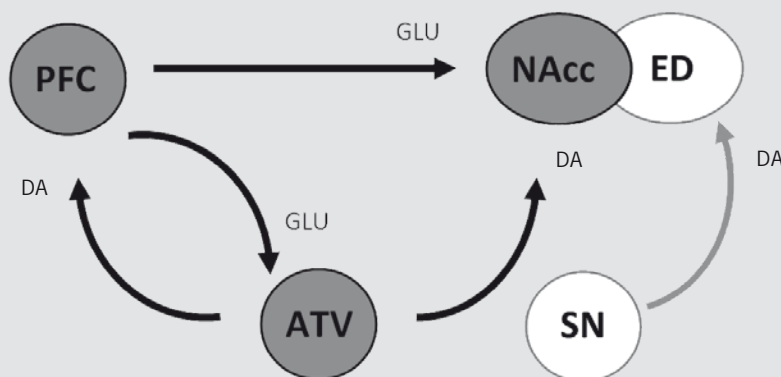
La gráfica muestra las diferencias temporales en el contenido de cocaína en plasma humano luego de su administración a dosis equimolares y por diferentes vías de administración. Modificado de Jones RT ⁹.

La Figura 2 muestra cómo la absorción de cocaína consumida por vía nasal u oral es similar, aunque más lenta cuando se fuma o después de la administración intravenosa. Bajo estas formas de administración (nasal u oral) el pico plasmático de cocaína se produce a los 60 minutos, a diferencia de los 30 minutos que demora en aparecer luego de la administración intravenosa. Las formas fumables de cocaína generan un pico plasmático rápido, a los 30 minutos aunque de más baja bio-disponibilidad en comparación con la vía intravenosa.

Factor “vía de administración” en la generación de adicción

Los circuitos neurales que subyacen y promueven la aparición del fenómeno de adicción son aquellos que median los efectos motivacionales y reforzadores de las drogas de abuso. Dichos circuitos involucran principalmente a regiones cerebrales tales como el núcleo accumbens (NAcc), así como también

al estriado dorsal (ED) y la corteza prefrontal (PFC)¹⁰⁻¹⁶. En la investigación pre-clínica sobre adicción está ampliamente aceptado que cuanto más rápido una droga de abuso alcanza el cerebro, mayor potencial adictivo posee, aunque aún se desconoce las causas^{10,17}. Una posibilidad proviene de la idea de que la adicción sea debida, en parte, a la capacidad de las drogas de abuso de reorganizar circuitos en las regiones del NAcc, ED y/o PFC. Esta reorganización se manifiesta a nivel conductual como una respuesta de sensibilización psicomotora o comportamental producida por la repetida administración de la droga; respuesta que modelaría el comportamiento de *craving* (o búsqueda de drogas) que aparece en humanos^{14,18}. Es decir, que las diferencias en las vías de administración con las que las drogas adictivas son administradas, podrían determinar su capacidad de producir sensibilización comportamental y probablemente los cambios neurobiológicos en las regiones mencionadas anteriormente¹⁰. En este sentido, estudios en roedores evidenciaron que la administración intraperitoneal de cocaína, en su forma clorhidrato, indujo cambios metabólicos (aumento en la utilización de glucosa) primeramente en estructuras relacionadas con el circuito motor nigro-estriatal (sustancia nigra, SN - ED), pero no en el sistema motivacional meso-córtico-límbico (área tegmental ventral; ATV - PFC - NAcc; Esquema 2).



Esquema de los principales circuitos que integran el sistema motivacional o de recompensa de la rata: sistema meso-córtico-límbico formado por las regiones: área tegmental ventral (ATV), corteza prefrontal (PFC) y núcleo accumbens (NAcc). El esquema incluye sistemas relacionados, tales como el nigro-estriatal formado por sustancia nigra (SN) y el estriado dorsal (ED). Se marcan también los principales neurotransmisores mediadores de las acciones de los circuitos: DA, dopamina; GLU, glutamato. Modificado de Kalivas y O'Brien¹⁶.

Sin embargo, la administración intravenosa de CC aumentó la utilización de glucosa en ambos circuitos, sugiriendo que la cocaína activaría diferentes circuitos neuronales dependiendo de la vía por la cual es administrada y que las diferencias se deben principalmente a factores farmacocinéticos¹⁷. Un desafío para la neurobiología es determinar los mecanismos por los que las distintas vías de administración inducen diferentes caminos o cascadas de eventos intracelulares que terminan en el reclutamiento de distintos circuitos neuronales y su subsecuente plasticidad¹⁰.

Mecanismo de acción de cocaína: bloqueo de la recaptación de DA

La cocaína y las anfetaminas son los psicoestimulantes del SNC más potentes

que se conocen. Comparten la propiedad de causar adicción en humanos y de activar el sistema mesolímbico aumentando la transmisión dopaminérgica en el NAcc, a través del bloqueo de la recaptación de dopamina (DA). Este efecto neuroquímico es esencial para que las drogas de abuso induzcan el comportamiento reforzador y así generar adicción^{14, 19, 20}. En roedores, además de aumentar la transmisión del sistema DAérgico en el NAcc, ambos psicoestimulantes inducen un efecto de hiperactividad locomotora, luego de una única administración, y producen el fenómeno de sensibilización comportamental luego de su administración crónica, indicativo del potencial adictivo de las drogas.

Hasta el momento únicamente existen evidencias publicadas sobre aspectos epidemiológicos y clínicos del consumo de PBC, así como algunas sobre su composición química. Sin embargo, existe escasa información científica publicada sobre las acciones neurobiológicas de esta droga, que pudieran explicar su gran potencial adictivo y el deterioro cognitivo que genera en sus usuarios luego del consumo crónico. Queda en evidencia que es necesario conocer los mecanismos subyacentes a la acción de PBC en el SNC para poder desarrollar tratamientos específicos y efectivos para sus consumidores. En este sentido, estamos llevando a cabo un estudio neurobiológico pre-clínico sobre PBC. En la línea de investigación general, planteamos que no se puede asumir a priori que las diferencias

entre PBC y CC se deban exclusivamente a las diferentes vías de administración (fumada *vs.* nasal). Proponemos, entonces, que otros componentes presentes en la muestra de PBC, diferentes al alcaloide cocaína, podrían contribuir en las acciones centrales de PBC y responder, en parte, a las diferencias clínicas encontradas con CC.

Por lo tanto, los experimentos del presente trabajo fueron diseñados para analizar químicamente la muestra de PBC y comparar los efectos inducidos por PBC con una muestra de CC pura, administrada bajo las mismas condiciones. Estos experimentos permitirán evidenciar posibles diferencias farmacológicas entre ambas formas de cocaína (base y clorhidrato). En este sentido, se caracterizarán: 1) la alteración de la transmisión DAérgica en el NAcc y 2) los cambios en la actividad locomotora en animales de experimentación, luego de la administración sistémica aguda de PBC (gota). A través de estos ensayos se estudiará dos de las propiedades más comunes de las drogas de abuso: el aumento en la transmisión DAérgica y el efecto estimulante.

Material y método

Animales

En este estudio fueron utilizadas ratas macho cepa Wistar (250-300 g) obtenidas del Bioterio del IIBCE. Fueron alojadas en grupos de 6 animales por cajas transparentes (50 x 30 x 20 cm) con comida y agua *ad libitum* en condiciones de temperatura y luz controladas (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, encendiéndose la luz a las 7:00 a. m.).

Los experimentos fueron conducidos de acuerdo con las normas éticas del Comité de Bioética del IIBCE, basados en las normativas éticas vigentes de la Ordenanza Universitaria CDC Exp. 4332/99, Diario Oficial N° 25467, Feb.21/00 UdelaR.

Muestra de PBC y de CC

Para este estudio se utilizó una muestra de PBC gota proveniente de incautaciones realizadas por la policía luego de procedimientos de allanamientos. La muestra ha sido proporcionada por el Instituto Técnico Forense (ITF) con la autorización de la Junta Nacional de Drogas (JND) y de los Juzgados penales correspondientes al lugar de la incautación de la droga. La muestra de clorhidrato de cocaína ha sido comprada en Sigma-Aldrich, con su correspondiente legalización a través del Ministerio de Salud Pública y la *Drug Enforcement Administration* (DEA).

Análisis químico de la muestra de PBC

Para la determinación de la composición química de la muestra de PBC incautada se realizó un ensayo de química húmeda, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC/MS) y posteriormente cromatografía líquida (CL y/o HPLC). Se realizó un análisis cualitativo de las muestras de PBC y secundariamente uno cuantitativo, para determinar el porcentaje del alcaloide cocaína y de las posibles sustancias adulterantes (cafeína, lidocaína).

Procedimiento experimental

Para la realización de los experimentos conductuales y neuroquímicos la muestra de PBC debió ser disuelta en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 2%, agua destilada y cantidad suficiente de hidróxido de sodio 50% hasta llevar la solución a un pH= 6.3. En cambio, la muestra de CC se disolvió rápidamente en agua destilada y fue preparada fresca el día de cada experimento.

Previo a la realización de estos experimentos, la muestra de PBC gota fue analizada químicamente para determinar su contenido en cocaína base y posibles adulterantes. El

contenido de cocaína base en la muestra de CC (89,6%) fue utilizado como referencia. Una vez terminado este análisis, la muestra de PBC fue fraccionada y mantenida a -20°C hasta su utilización.

Dosis. La dosis para la administración sistémica de PBC y CC fue de 10 mg/kg^{16, 21}. Ambas drogas fueron inyectadas por vía intraperitoneal (i. p.) en animales *naïve*. El volumen de inyección fue de 1 ml/kg. En el caso de los experimentos con dosis equimolares se inyectó una cantidad de la solución de PBC de 13,2 mg/kg, valor calculado a partir del análisis cuantitativo del contenido de cocaína base en la muestra de PBC en relación con el contenido de cocaína base en la muestra de CC. Los animales control fueron inyectados i.p. con los vehículos correspondientes de PBC y CC.

Estudios de la actividad locomotora. La actividad locomotora del animal es el parámetro que refleja el efecto estimulante de PBC y CC. Se utilizó el modelo de campo abierto u *open field*, el cual consiste en una caja cuadrada (60 x 60 cm) con paredes de acrílico rojas de 40 cm de alto. Al nivel de la base está equipado con un sistema óptico de 8 fotoceldas por lado (64 en total) que registran automáticamente la actividad locomotora del animal a través de una interfase conectada a una computadora equipada con el *software Motor Behaviour Monitor* (MBM). El número de cruces de fotoceldas registrado representa la actividad motora del animal durante el tiempo de registro²².

Los animales fueron inyectados con droga o vehículo e inmediatamente ingresados al campo abierto donde se registró su actividad durante 30 minutos. Antes del registro de la actividad, la caja se cubre con una capa uniforme de viruta y una vez finalizado el mismo se la retira y se limpia con alcohol al 30% para luego colocar el siguiente animal.

Los experimentos fueron realizados entre las 8:00 y las 13:00 horas y en cada uno de ellos los animales fueron trasladados al cuarto

de experimentación (con condiciones de luz y temperatura iguales a las del Bioterio), pesados e identificados un día antes para su adaptación al ambiente.

Cuantificación de los niveles de DA. Los cambios en los niveles tisulares de DA son indicativos del estado de la transmisión DAérgica.

Una vez terminados los experimentos comportamentales, los animales fueron sacrificados inmediatamente por decapitación. El NAcc fue disecado y posteriormente guardado a -70°C hasta el día de su procesamiento. Para la cuantificación del contenido de DA en el NAcc se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-DE)²³.

Análisis estadístico

Los datos de actividad locomotora fueron expresados como la media $\pm$ error estándar de la media (EEM) del número de cruces en función del tiempo. Los niveles tisulares de DA en el NAcc también fueron expresados como la media $\pm$ EEM, en nanogramos (ng)/gramo de tejido húmedo.

La comparación estadística de los datos obtenidos fue realizada utilizando un ANOVA de una vía de muestras independientes, seguido del *test* de comparación múltiple de medias de *Newman Keuls*. El nivel de significación fue considerado para un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Para llevar a cabo los experimentos comportamentales y neuroquímicos, primeramente se realizó el análisis químico de la muestra de PBC con el fin de determinar el contenido del alcaloide cocaína, además de la presencia de otras sustancias. En la Tabla 1 se muestra los resultados del análisis cuantitativo y cualitativo de la muestra de PBC gota.

Tabla 1 | Análisis cuati y cualitativo de la muestra de PBC, teniendo como referencia la muestra de CC

Muestras	Cocaína base	Ecgonina	Trans-cinamoil ecgonina	Cis-cinamoil ecgonina	Sustancias adyulterantes	
					Cafeína	Lidocaína
PBC gota	68,1 ± 3%	+	+	+	15,0 ± 0%	-
Clorhidrato de cocaína	89,6 ± 0%	-	-	-	-	-

El análisis cuantitativo de la muestra de PBC gota evidenció que la media del contenido de cocaína base estuvo en un 68% y cafeína en un 15%. El análisis cualitativo demostró la presencia (+) de sustancias como ecgonina, trans-cinamoil ecgonina, cis-cinamoil ecgonina, mientras que no se detectó (-) lidocaína como sustancia adyulterante adicional a cafeína. El análisis se hizo por triplicado.

El análisis cualitativo de la muestra de PBC demostró la presencia de cocaína y otros compuestos relacionados con su metabolismo, tales como ecgonina, trans-cinamoil ecgonina y cis-cinamoil ecgonina. Como sustancia adyulterante se detectó cafeína pero no lidocaína. El contenido de cocaína base fue de un 68,1% (calculado a partir del contenido en cocaína base de la muestra de CC), mientras que el de cafeína fue de un 15%.

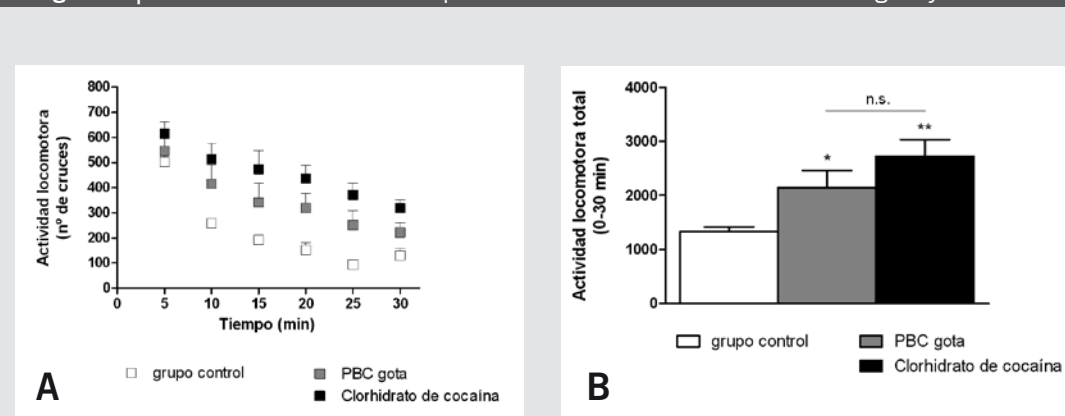
Efecto comportamental y neuroquímico inducido por PBC gota y CC (10 mg/kg)

La actividad locomotora de los animales inyectados con vehículo de PBC fue similar

a la de los inyectados con el vehículo de CC (1.333,1 ± 236,2 vs 1.140,0 ± 278,4; $p > 0.05$). Por lo tanto, se utilizó como grupo control a los animales inyectados con el vehículo de PBC para comparar los efectos observados en los demás tratamientos.

La Figura 3 muestra la actividad motora inducida por la administración sistémica de la dosis de 10 mg/kg de PBC gota y CC. Como es de esperar para las drogas estimulantes, PBC gota indujo un aumento significativo de la actividad locomotora de los animales comparado con el grupo control ($p < 0.05$), evidenciando un efecto estimulante. Similarmente, CC produjo un efecto de hiperactividad ($p < 0.01$; Figura 3A). La comparación entre ambos tratamientos reflejó que la actividad

Figura 3 | Actividad motora inducida por la administración sistémica de PBC gota y CC



Actividad locomotora inducida por PBC y clorhidrato de cocaína (A) en función del tiempo a la dosis de 10 mg/kg. Los datos están expresados como la media ± EEM del número de cruces registrados en el campo abierto durante 30 minutos. En (B) se muestra la actividad locomotora total de PBC gota comparando con la inducida por clorhidrato de cocaína. ANOVA de una vía seguido por el test de Newman Keuls. * = vs control. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$. No hubo diferencias entre PBC vs CC ($p > 0.05$). n.s. = no significativo. N=5-6.

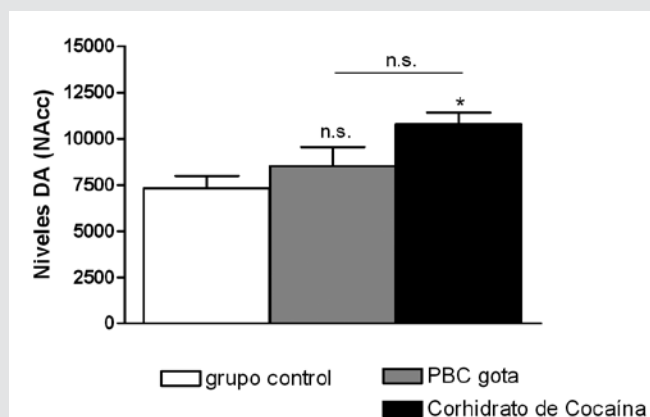
locomotora inducida por CC tuvo una tendencia a ser mayor a la inducida por PBC ($p > 0.05$; Figura 3B).

La Figura 4 muestra el efecto de PBC gota y CC sobre los niveles tisulares de DA en el NAcc. Únicamente CC indujo un aumento significativo en los niveles de DA en el NAcc ($p < 0.05$) comparado con el grupo control; sin embargo, no alcanzó significancia estadística comparado con el grupo de PBC ($p > 0.05$).

Efecto comportamental y neuroquímico inducido por PBC gota y CC a dosis equimolar

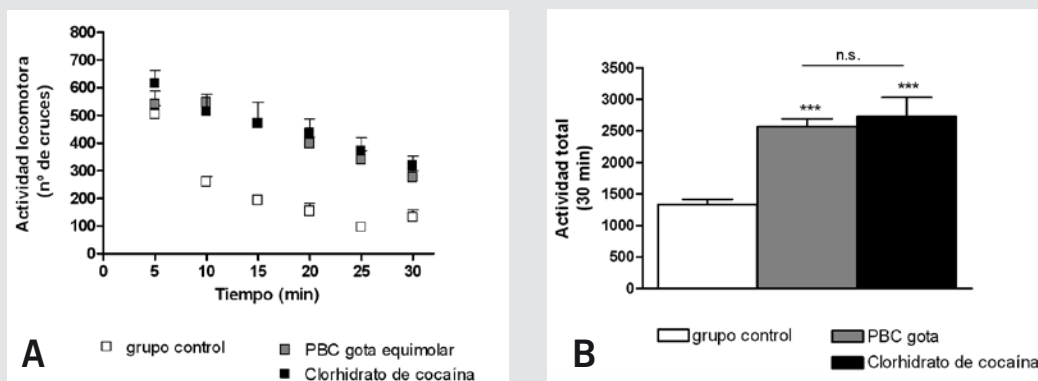
La Figura 5 muestra la locomoción inducida por PBC gota a una dosis equimolar (13,8 mg/kg) con respecto a la dosis de CC (tomando como referencia la dosis de 10 mg/kg). Podemos observar cómo PBC gota indujo un aumento significativo en la actividad locomotora de los animales ($p < 0.001$) de forma similar a CC ($p < 0.001$; Figuras 5A y B).

Figura 4 | Efecto de PBC gota y CC sobre los niveles tisulares de DA en el NAcc



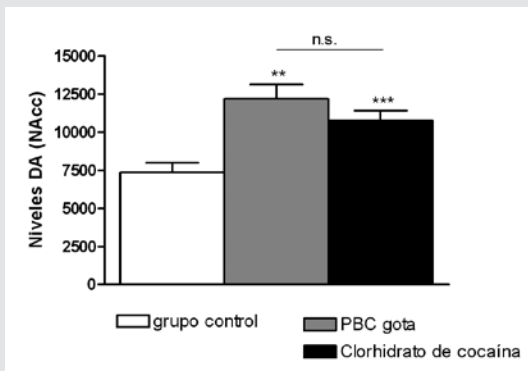
Niveles tisulares de DA en el NAcc inducido por PBC gota y clorhidrato de cocaína a la dosis de 10 mg/kg. Los datos están expresados como la media $\pm$ EEM de los niveles tisulares de DA (ng/gr de tejido) ANOVA de una vía seguido por el test de Newman Keuls. * = vs control; * = $p < 0.05$. No hubo diferencias entre PBC vs control y PBC vs CC ($p > 0.05$). n.s. = no significativo. N=5-6.

Figura 5 | Locomoción inducida por PBC gota y CC



Actividad locomotora inducida por PBC y clorhidrato de cocaína (A) en función del tiempo a una dosis equimolar de PBC con clorhidrato de cocaína (dosis referencia 10 mg/kg). Los datos están expresados como la media $\pm$ EEM del número de cruces registrados en el campo abierto durante 30 minutos. En (B) se muestra el efecto comparativo entre PBC y clorhidrato de cocaína. ANOVA de una vía seguido por el test de Newman Keuls. * = vs control; *** = $p < 0.001$. No hubo diferencias entre PBC vs CC ($p > 0.05$). n.s. = no significativo. N=5-6.

Figura 6 | Niveles tisulares de DA en el NAcc inducido por PBC gota y clorhidrato de cocaína a dosis equimolares



Los datos están expresados como la media $\pm$ EEM de los niveles tisulares de DA. ANOVA de una vía seguido por el test de Newman Keuls. * = vs control; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. No hubo diferencias entre PBC vs CC ($p > 0.05$). N=5-6.

Por otro lado y a diferencia de lo observado en la Figura 4, PBC gota inyectada a una dosis equimolar logró inducir un aumento significativo en los niveles tisulares de DA en el NAcc ($p < 0.01$), sin mostrar diferencia significativa con CC ($p > 0.05$; Figura 6).

Discusión

El cuerpo de resultados presentados en este trabajo forma parte del primer estudio pre-clínico en Uruguay y Latinoamérica, caracterizando los efectos comportamentales y neuroquímicos de una muestra de PBC. Además, este estudio permitió identificar el contenido químico de una muestra de PBC gota, que eventualmente podría llegar a individuos consumidores.

Los experimentos realizados permitieron, en primer lugar, evidenciar el efecto estimulante de la muestra de PBC estudiada. Aun más, este efecto se vio igualado a la hiperactividad inducida por la muestra de CC luego de la inyección de PBC a una dosis equimolar en contenido de cocaína base. Este resultado indica fuertemente que el contenido en cocaína en la muestra de PBC estaría en la base de la respuesta comportamental de estimulación locomotora observada en los animales.

En segundo lugar, PBC a la dosis de 10 mg/kg (no equimolar) no modificó los niveles tisulares de DA en el NAcc, efecto que sí se

observó en los animales inyectados con CC a la misma dosis. Sin embargo, luego de la dosis equimolar de PBC se produjo un aumento significativo en la transmisión DAérgica en esa región. Al igual que para el efecto estimulante, este resultado demuestra que el contenido de cocaína presente en la muestra de PBC tendría un papel preponderante en el cambio neuroquímico inducido por la droga.

Hasta nuestro conocimiento existe un único trabajo científico publicado, que reporta el contenido químico de muestras de PBC provenientes de Colombia y Perú. En dicho estudio, a través de la metodología de GC-Masa, se identificaron sustancias en diferentes fracciones: en la fracción de alcaloides se observó cocaína como principal alcaloide, ecgonina metil ester, tropacocaine, cis-cinamoilcocaína, trans-cinamoil cocaína, etc., y residuos de manganeso y plomo. En la fracción de hidrocarburos se identificaron compuestos tales como etilbenceno, xileno⁷. Consideramos dicho trabajo una importante referencia, dado que el análisis químico realizado en la muestra de PBC gota de la incautación proporcionada por el ITF, demostró la presencia de otros compuestos, aparte de cocaína: ecgonina, trans-cinamoil ecgonina y cis-cinamoil ecgonina, de forma similar a lo descrito por Elsohly⁷. Destacamos que apareció cafeína como principal adulterante y no lidocaína, como esperábamos, dado que es el principal adulterante utilizado para “cortar” drogas como cocaína. Futuros experimentos nos

permitirán cuantificar dichos compuestos así como, también, residuos de ácidos y solventes orgánicos necesarios para el procesamiento de la extracción de la cocaína.

En este estudio pudimos comprobar que, con la misma vía de administración e igual contenido en cocaína base, PBC gota indujo un efecto estimulante y neuroquímico similar al de CC. No es extraño que el alcaloide cocaína esté en la base de los efectos centrales de PBC, dado que su contenido alcanza valores tan altos como un 68%. Si bien hasta el momento no se pudo cuantificar el contenido de los otros compuestos presentes en muestras de PBC, no descartamos que estos u otros aún sin determinar, puedan ser responsables de la aparición de otras propiedades de la droga que puedan explicar la sintomatología de sus consumidores. Tal vez, los trastornos descritos en la clínica, tales como el deterioro cognitivo, puedan ser atribuidos al potencial neurotóxico de la droga. La realización de futuros experimentos neurobiológicos permitirá corroborar dicha propiedad.

A pesar de no mantener la vía de administración utilizada en el consumo de PBC (fumada) o CC (nasal) en los experimentos diseñados, la inyección sistémica permitió identificar dos de las propiedades que caracterizan a las drogas de abuso: el aumento de la transmisión DAérgica en el NAcc y el efecto estimulante, validando el uso de la misma para el estudio pre-clínico de las acciones centrales de PBC. No obstante, es necesario caracterizar los efectos inducidos por un tratamiento crónico en modelos experimentales validados para determinar la propiedad adictiva, tales como la sensibilización comportamental y neuroquímica.

Por último, no hay que dejar de mencionar que los resultados obtenidos en este estudio nos llevarían a pensar que el potente efecto adictivo observado en los consumidores de PBC y sus diferencias con los consumidores de CC podría ser explicado principalmente por la vía de administración utilizada (fumada *vs.* nasal). En este sentido, como hemos mencionado en la introducción, cuanto más rápido una droga de abuso alcanza el cerebro, más potencial adictivo posee. Sin embargo, no podemos descartar aún que la presencia de

otras sustancias participe también del gran potencial adictivo de PBC. Son necesarios más experimentos para llegar a responder esta interrogante. Comprender los mecanismos neurobiológicos de la adicción inducida por PBC permitirá seleccionar farmacoterapias más efectivas.

Agradecimientos

A las personas que colaboraron con el presente trabajo en sus diferentes etapas: Lic. Milton Romani, Secretario General de la Junta Nacional de Drogas y Sra. Laurita Regueira, secretaria de la Junta Nacional de Drogas; Q.F. Elena Lerena, Instituto Técnico Forense; Dr. Juan Triaca, Portal Amarillo y Dra. Andrea Gago por su participación inicial en el proyecto de investigación en pasta base.

Este estudio fue financiado por el Proyecto Programa de Desarrollo Tecnológico-Salud N° 76/26.

Referencias bibliográficas

1. **Jeri FR.** The Coca Paste Epidemic in South America: Epidemiological, Clinical, Experimental and Therapeutic Observations. *Revista de la Sanidad de las Fuerzas Policiales* 1982; 43(2):170-179.
2. **Castro de la Mata R.** Aspectos farmacológicos de la pasta básica de cocaína. En: F. R. León, Castro de la Mata (ed). *Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario*. Centro de Información y Educación para la Prevención del Abuso de Drogas (CEDRO); 1989. <http://www.cedro.org.pe/>
3. **Navarro R.** Aspectos clínicos de la dependencia a la pasta básica de cocaína. En: F. R. León, Castro de la Mata (ed). *Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario*. Centro de Información y Educación para la Prevención del Abuso de Drogas (CEDRO); 1989. <http://www.cedro.org.pe/>

4. **Pérez J.** Clínica de la adicción a pasta base de cocaína. *Rev Chil Neuropsiq* 2003; 41:55-63.
5. Junta Nacional de Drogas, "Drogas: más información menos riesgos", 6ª edición 2008. Editor: Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República Oriental del Uruguay: Presidente Lic. Jorge Vázquez; Secretario General Lic. Milton Romani Gerner. <http://www.infodrogas.gub.uy/>
6. **Castañó P.** Cocaínas Fumables. *Adicciones* 2000; 12(4):541-550.
7. **Elsohly MA, Brenneisen R, Jones AB.** Coca Paste: Chemical Analysis and Smoking Experiments. *Journal of Forensic Sciences* 1991; 36:93-103.
8. **Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P.** Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones* 2002; 14(1):57-64.
9. **Jones RT.** Pharmacokinetics of cocaine: considerations when assesing cocaine use by urinalysis. *NIDA Res Monog* 1998; 175:221-34.
10. **Samaha AN, Robinson TE.** Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends in Pharmacological Science* 2005; 26(2):82-87.
11. **Bradberry CW, Roth RH.** Cocaine increases extracellular dopamine in rat nucleus accumbens and ventral tegmental area as shown by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 1989; 103:97-102.
12. **Carboni E, Imperato A, Perezzani L, Di Chiara.** Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 1989; 28:653-661.
13. **Kalivas PW, Duffy P.** Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 1990; 5:48-58.
14. **Robinson TE, Berridge KC.** The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 1993; 18:247-291.
15. **Kalivas PW, Volkow ND.** The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *A J Psychiatry* 2005; 162:1403-1413.
16. **Kalivas PW, O'Brien C.** Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33(1):166-80.
17. **Porrino LJ.** Functional consequences of acute cocaine treatment depend on route of administration. *Psychopharmacol (Berl)* 1993; 112:343-351.
18. **Pierce RC, Kalivas PW.** A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 1997; 25(2):192-216.
19. **Samaha AN, Mallet N, Ferguson SM, Gonon F, Robinson TE.** The rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity: implications for addiction. *J Neurosci* 2004; 24(28):6362-70.
20. **Noble EP.** Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry* 2000; 15(2):79-89.
21. **Antoniou K, Kafetzopoulou E, Papadopoulos-Daifotib Z, Hyphantisa T, Marselosa M.** D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci and Biobehav Rev* 1998; 23:189-196.
22. **Lagos P, Scorza MC, Monti JM, Jantos H, Reyes-Parada M, Silveira R, Ponzoni A.** Effects of the D₃ preferring dopamine agonist pramipexole on sleep and waking, locomotor activity and striatal dopamine release in rats. *Eur J Neuropsychopharmacol* 1998; 8:113-120.
23. **Scorza MC, Carrau C, Silveira R, Zapata G, Cassels BK, Reyes-Parada M.** Monoamino oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives. *Structure-activity relationships. Biochem Pharmacol* 1997; 54:1361-1369.



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Coca-paste seized samples characterization: Chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant

Ximena López-Hill^{a,1}, José Pedro Prieto^{a,1}, María Noel Meikle^a, Jessika Urbanavicius^a,
Juan Andrés Abin-Carriquiry^b, Giselle Prunell^b, Eleuterio Umpiérrez^c,
María Cecilia Scorza^{a,*}

^a Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Avenida Italia 3318, ZP11600 Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Uruguay

^c Laboratorio de Análisis Orgánico, Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2011

Received in revised form 25 February 2011

Accepted 1 March 2011

Keywords:

Coca-paste

Cocaine-hydrochloride

Caffeine

Locomotor activity

ABSTRACT

Coca-paste (CP) is a drug of abuse that so far has not been extensively characterized. CP is an intermediate product of the cocaine alkaloid extraction process from coca leaves, hence it has a high content of cocaine base mixed with other chemical substances (impurities) and it is probably adulterated when it reaches the consumers. Despite its high prevalence and distribution through South America, little is known about its effects on the central nervous system.

In the present study, a chemical analysis of CP samples from different police seizures was performed to determine the cocaine base content and the presence and content of impurities and adulterants. Some CP representative samples were selected to study the effects on the locomotor activity induced after acute systemic administration in rats as a measure of its stimulant action. The behavioral response was compared to equivalent doses of cocaine.

As expected, cocaine was the main component in most of the CP samples assayed. Caffeine was the only active adulterant detected. Interestingly, several CP samples elicited a higher stimulant effect compared to that observed after cocaine when administered at equivalent doses of cocaine base. Combined treatment of cocaine and caffeine, as surrogate of different CP samples mimicked their stimulant effect.

We demonstrated that cocaine and caffeine are the main components responsible for the CP-induced stimulant action while the contribution of the impurities was imperceptible.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coca Paste (CP) is an illicit drug of abuse that is mainly consumed in several South American countries [1–5]. CP users have frequently been associated with crime and violence bringing on serious social and public health problems [5,6]. CP is one of the forms of cocaine used for smoking. In humans, its consumption produces an intense euphoria and a very fast stimulant effect, psychomotor alteration as well as high dependence. Although physiological or subjective effects induced by CP consumption could be similar to those induced by cocaine in its hydrochloride form (e.g. hyperstimulation, disinhibition) one of the most clinically distinctive features of CP consumption compared with cocaine users is the breach of social norms, severe behavioral changes like impulsivity and aggressiveness, cognitive impairment (memory and concentration

alterations) and antisocial behavior [2–8]. Despite that several reports focused on the study of the psychomotor alteration in CP consumers have been published [2,4–6,9], the general background or the underlying neural mechanisms that explain the differences with cocaine users remain unknown. To our knowledge, there is only one preclinical study published by our research group in which some pharmacological aspects of the CP effects on the central nervous system (CNS) were investigated [10].

CP is one of the earliest intermediate products obtained during any of the preliminary phases of cocaine alkaloid extraction from coca leaves (from *Erythroxylon coca* bush). This process involves several purification steps, which generally ends in the obtainment of cocaine in its salt form as hydrochloride, being the white powder to be insufflated [5,11]. Consequently, CP is a non-purified extract of coca leaves with a variable content of cocaine (base), mixed with other chemical substances (impurities, defined as substances present in the drug as a natural result of the manufacturing process). In addition, it is most likely that CP is sold adulterated, which might lead to an increase in its addictive profile and may disguise the clinical picture [6]. So far, the

* Corresponding author. Tel.: +598 2487 1616x115; fax: +598 2487 5548.

E-mail address: scorza@iibce.edu.uy (M.C. Scorza).

¹ These authors contributed equally to this work.

contribution of CP adulterants on its central action has not been studied.

Caffeine, amphetamine and lidocaine are very common active adulterants found in illicit drugs, including cocaine [12–17]. Particularly, caffeine is the most consumed psychoactive drug in the world. In human, low non-toxic doses of caffeine produce positive effects on arousal, vigilance and attention whereas higher doses cause anxiety, nervousness, impaired thinking, sleep disturbance, heart palpitations and stomach irritation; toxic doses provoke seizures [18–20]. In rodents, the ability to enhance motor activity as a measure of its stimulant property has received a great deal of attention [20–23]. Also, early preclinical studies have shown that acute systemic administration of caffeine can increase the cocaine-induced locomotor stimulant activity indicating an additive action of both drugs [13]. A combination of low doses of cocaine and caffeine (0.32 mg/kg) appeared to be additive since they were found to induce place preference and stimulate locomotor activity [23]. In addition, acute or chronic caffeine exposure can potentiate the behavioral effects of amphetamine and cocaine in rats responding to food reinforcement and discriminative-stimulus [24–27].

We had previously observed that the systemic administration of CP to rats induced a significant increase in the locomotor activity, reflecting its stimulant effect. Interested in whether the stimulating effect was due exclusively to the cocaine base content, we studied the locomotor activity induced by a seized CP sample and cocaine injected at an equivalent dose of 10 mg/kg of cocaine base under the same administration route. The results demonstrated that both drugs induced a similar behavioral response suggesting that the cocaine base content, but not the other compounds, mediated the CP hyperactivity [10]. However, in that report only one dose of a single CP was assayed. We must keep in mind that CP samples from different seizures may vary in their chemical content (i.e. in sort and quantity of impurities as well as adulterants) and thus might differ in their central actions. Consequently, other samples and doses must be evaluated to determine if the cocaine content in CP samples always mediates its behavioral effects.

The aims of the present study were to chemically analyze CP samples from different police seizures and to investigate the stimulant effect induced after their acute systemic administration in rats. This effect was compared to that induced by cocaine under the same administration conditions. The contribution on the CP stimulant effect of caffeine, the main adulterant found to be present in CP samples, was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Seventy-five adult male Wistar rats, each weighing 260–320 g, bred in the IIBCE animal facilities (Montevideo) were employed in the study. The animals were housed in groups of 6 in plastic cages (50 cm × 37.5 cm × 21 cm) with food and water available *ad libitum* and kept under controlled conditions (temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-h day–night cycle, lights on at 7:00 am). All procedures were carried out in accordance to the IIBCE Bioethics Committee's requirements and under the current ethical regulations of the national law on animal experimentation No. 18.611. Adequate measures were taken to minimize discomfort or stress of the animals, and all efforts were made in order to use the minimal number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Drugs

Seven CP samples (named CP 1–7) from different seizures, made by the local police after raid procedures during the period of 2007–2009, were used. These are samples that could be possibly consumed by drug users. CP samples were supplied by the Technical Forensic Institute (Montevideo-Uruguay) with the authority of the National Drugs Board. Cocaine hydrochloride, caffeine, lidocaine and amphetamine were from Sigma Aldrich (Germany and USA). The standard solutions of cis- and trans-cinnamoylcocaine and metilecgonine were purchased in the National Measurement Institute of the Department of Innovation, Industry, Sciences and Research of Australia.

CP samples were dissolved in hydrochloric acid (HCl) 2% and distilled water and enough sodium hydroxide to titrate the solution to a pH = 6.3 was used (CP-vehicle). Cocaine and caffeine were dissolved in distilled water (cocaine/caffeine-vehicle). Drugs were injected by intraperitoneal (i.p.) route. The volume of injection was set at 1 ml/kg and corrected when equivalent doses were administered.

2.3. Chemical analysis of CP samples

A first step of identification of cis- and trans-cinnamoylcocaine, metilecgonine, cocaine and adulterants in CP samples was performed using a Gas Chromatograph with a Mass selective detector (Agilent 5890 II plus/5972). The conditions were: HP-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm and the temperature of the Injection Port was 250°C . The initial oven temperature was 90°C , the ramp rate was $5^\circ\text{C}/\text{min}$ to a final temperature of 230°C and held for 5 min. The carrier was helium at a constant flow of 0.9 ml/min. Transfer line was set at 250°C . Mass conditions were: EI 70 eV , Scan from 45 to 450, dwell time 100.

A high performance liquid chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) was performed to quantify the percentage of cocaine and caffeine in each CP sample. An HPLC-DAD system (pump 1525, autosampler 717 plus and DAD 2998, Waters, MA, USA) equipped with a C-18 column (5 μm particles, 150 mm × 3.6 mm; phenomenex, USA) and operated isocratically at a flow rate of 1.0 ml/min was used. The mobile phase was composed of acetate buffer (25 mM, pH 3.6), sodium octylsulphate (0.6 mM) and 35% methanol. The content of cocaine and caffeine in CP samples were calculated using a standard solution of each substance as a reference.

2.4. Behavioral experiments

Rats were moved in their home cages to the experimental room, identified and weighed one day before the behavioral experiments to allow acclimation to the test environment. The experimental room was under controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). The stimulant effect was determined by measuring the animal locomotor activity starting 5 min after drugs or vehicle administration using the Open Field (OF) paradigm, as previously described ([28], with modifications). OF consisting of a square box (60 cm × 60 cm) with red 40-cm-high acrylic sides was used. Locomotor activity (quantitative and qualitative) was recorded automatically during 60 min by a camera connected to a computer equipped with the Ethovision software 7.0 (Noldus, The Netherlands). Using this video-tracking software we specifically measured the following variables: horizontal locomotor activity defined as the total distance moved in meters (m), the velocity of movements (m/s) and the animals' behavioral pattern (locomotor pattern).

After recording the activity of the animal, the box was cleaned with alcohol 30% before placing the following rat. Experiments were performed between 9:00 am and 02:00 pm. In all the experiments rats were naïve to the OF and were used only once.

2.5. Experimental groups

Cocaine was administered at 5 and 20 mg/kg ($N = 8-7$, respectively). These doses had previously been reported to induce a stimulant effect [29,30]. CP samples were injected at equivalent cocaine dose of 5 and 20 mg/kg ($N = 6$ per group). Caffeine at 2.5 and 4.5 mg/kg doses was administered alone ($N = 6-5$, respectively) or in combination with cocaine (5 and 20 mg/kg respectively; i.e. Coc (5) + Caf (2.5), Coc (20) + Caf (4.5); $N = 5-6$ per group). These caffeine doses were calculated based on the percentage of caffeine content of the CP samples. Control animals were injected with the corresponding vehicles mentioned above ($N = 8$).

2.6. Data analysis

Data are given as Mean ± Standard Error of the Mean (SEM) and were analyzed by One-way (treatment) or Two-way (time and treatment) analysis of variance (ANOVA) of independent or repeated measures followed by post hoc Newman–Keuls multiple comparison test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical analysis of CP samples

Table 1 shows that among the seven analyzed CP samples, cocaine base content varied between 20 and 70%, most of them presenting cocaine levels above 50%. Additionally, caffeine content varied between 1 and 15%. Some impurities, like alkaloids cis- and trans-cinnamoylcocaine and metilecgonine, were also detected at very low levels (less than 4%; data not shown). According to these results, CP samples contained at least one active adulterant since neither lidocaine nor amphetamine were detected in any of the CP samples.

Table 1
Chemical analysis of seven seized CP samples.

Samples	Cocaine base (%)	Caffeine base (%)
CP 1	68.9 ± 3.6	15.0 ± 0.1
CP 2	67.4 ± 1.2	14.0 ± 0.2
CP 3	59.3 ± 0.6	14.0 ± 0.1
CP 4	59.9 ± 4.5	14.0 ± 0.5
CP 5	68.2 ± 2.0	1.0 ± 0.5
CP 6	50.2 ± 1.0	1.0 ± 0.5
CP 7	20.7 ± 0.2	10.3 ± 0.5
Caffeine	–	100.0 ± 0.0
Cocaine	89.6 ± 0.0	–

Table shows the chemical analysis of the seven CP samples studied. It showed that cocaine base content varied between 20 and 70% whereas caffeine base content was between 1 and 15%. Cocaine and caffeine base quantity were calculated taking standard solution of cocaine or caffeine base as reference, respectively.

Table 2

Effects on distance moved and velocity of movement induced by systemic administration of CP samples, cocaine, caffeine or the combination between cocaine and caffeine treatments at different doses.

Treatment	Mean ± SEM of distance moved (m)	Mean ± SEM of velocity (m/s)
Control	55.6 ± 4.3	0.01 ± 0.001
Cocaine (5)	143.4 ± 11.1***	0.04 ± 0.003***
CP 1 (5)	167.6 ± 9.1***	0.05 ± 0.002***
CP 5 (5)	133.9 ± 11.8***	0.03 ± 0.004***
CP 7 (5)	198.9 ± 16.4***+//	0.06 ± 0.004***+//
Coc (5) + Caf (2.5)	191.3 ± 19.1***+###	0.06 ± 0.005***+###
Caffeine (2.5)	86.2 ± 10.9**	0.02 ± 0.003**
Cocaine (20)	323.0 ± 25.8***	0.09 ± 0.007***
CP 1 (20)	425.2 ± 22.2***+//	0.12 ± 0.006***+//
CP 5 (20)	261.6 ± 38.2***	0.07 ± 0.010***
Coc (20) + Caf (4.5)	414.9 ± 38.4***+###	0.12 ± 0.010***+###
Caffeine (4.5)	119.9 ± 9.1***	0.03 ± 0.002***

Table shows the effect of the systemic administration of CP 1, 5, 7 samples at equivalent doses of cocaine base (5 and 20 mg/kg); Cocaine at 5 and 20 mg/kg; Caffeine at 2.5 and 4.5 mg/kg; Cocaine at 5 mg/kg combined with Caffeine at 2.5 mg/kg, Coc (5) + Caf (2.5) and Cocaine at 20 mg/kg combined with Caffeine at 4.5 mg/kg, Coc (20) + Caf (4.5), on the distance moved and movement velocity during 60 min. All data are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Newman–Keuls test. * = denotes statistical differences vs. control group; + = denotes statistical differences vs. Cocaine (5 or 20 mg/kg); / = denotes statistical differences between CP samples; # = denotes statistical differences vs. Caffeine (2.5 or 4.5 mg/kg). ***,+//,### = $P < 0.0001$; **,// = $P < 0.01$; * = $P < 0.05$. $N = 5–8$.

significant difference for the distance moved or the velocity of movement.

Fig. 1A shows the locomotor profile induced by the drugs registered during 60 min. Two-way ANOVA revealed a significant effect for time ($F_{1,58} = 114.79$; $P < 0.0001$) indicating that in all groups locomotion decreased along time of the experimental session. This may reflect the typical habituation process observed in the OF. In addition, there was a significant treatment effect ($F_{4,58} = 35.66$; $P < 0.0001$) and time × treatment interaction ($F_{4,58} = 2.53$; $P < 0.05$). As expected for a stimulant drug, all treatments increased the locomotor activity of animals. Therefore, post hoc analysis revealed significant differences between CP 1, CP 5, CP 7 and cocaine vs. control group either in the 0–30 min or the 30–60 min period (Fig. 1B). Particularly, CP 1 produced a significant increase in locomotion compared to cocaine- and CP 5-injected animals in the first period (0–30 min) whereas no significant difference was observed in the second period between the three groups (30–60 min, Fig. 1B). While CP 5-treated animals behaved similarly to the animals injected with cocaine in both registered periods, CP 7 induced a higher stimulant effect compared to cocaine or CP 5 administration in both periods registered and compared to CP1 in the second period (Fig. 1B). When the total distance moved (0–60 min) and velocity of movement were considered, CP 7 was the only CP sample that was significantly different compared with all treatments (Table 2). Importantly, CP 7 compared to CP 1 and CP 5, was the sample that resulted in the highest caffeine dose administered (Table 3). Overall, these results indicated that, at 5 mg/kg dose, the cocaine base content was the responsible of the stimu-

Table 3

Doses of caffeine calculated based on cocaine and caffeine contents of three CP samples assayed.

CP samples	Doses of cocaine (mg/kg)	Doses of caffeine (mg/kg)
CP 1	5	1.08
	20	4.35
CP 5	5	0.07
	20	0.30
CP 7	5	2.48

Table shows the doses of caffeine calculated based on the cocaine doses at which CP samples were injected.

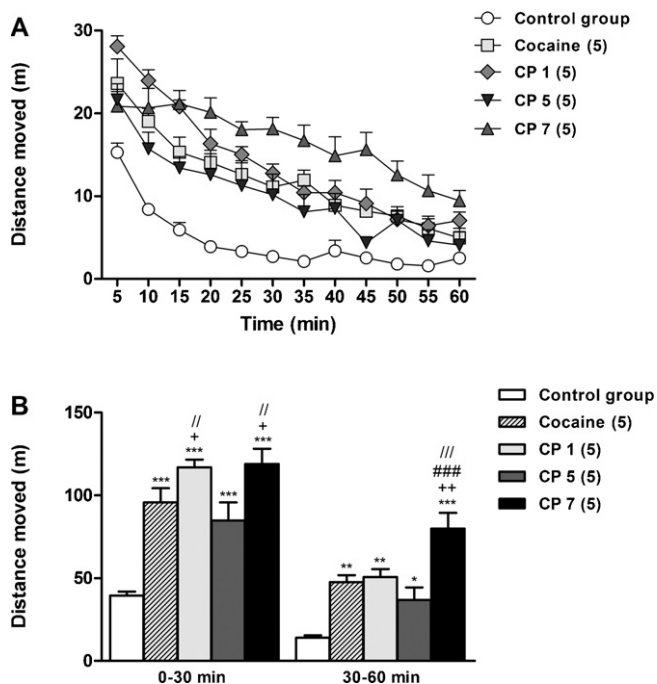


Fig. 1. A: Locomotor activity induced by systemic administration of CP 1, 5 and 7 at an equivalent dose of cocaine base (5 mg/kg) and cocaine (5 mg/kg) during 60 min. B: Effect of the treatments on distance moved (m) expressed in two periods: 0–30 min and 30–60 min. All data are expressed as mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test. * = denotes statistical differences vs. control group; + = denotes statistical differences vs. cocaine; # = denotes statistical differences between vs. CP 1; / = denotes statistical differences between vs. CP 5. ***,###,/// = $P < 0.001$; **,+,// = $P < 0.01$; *,+ = $P < 0.05$. There was no difference between CP 1 and CP 7 in the 0–30 min period neither by cocaine vs. CP 1 nor CP 5 in the 30–60 min period. $N = 6–8$.

3.2. Stimulant effect induced by CP 1, 5, 7 samples vs. cocaine

According to the chemical analysis results (Table 1), CP samples with different proportions of cocaine and caffeine base content were selected in order to study the CP-induced stimulant effect. Thus, CP 1 was chosen as a representative of a CP sample with high cocaine (68.9%) and caffeine (15%) base content, CP 5 for high cocaine (68.9%) and low caffeine (1%) and CP 7 for low cocaine content (20%) and a similar content in caffeine than CP 1 (10%). Then, the effect on the locomotor activity induced by CP 1, CP 5 and CP 7 was evaluated and compared to that induced by cocaine administered at equivalent dose of 5 mg/kg of cocaine base. Results are shown in Fig. 1A and B. Animals injected with CP-vehicle or cocaine/caffeine-vehicles were pooled forming the control group since they did not show any

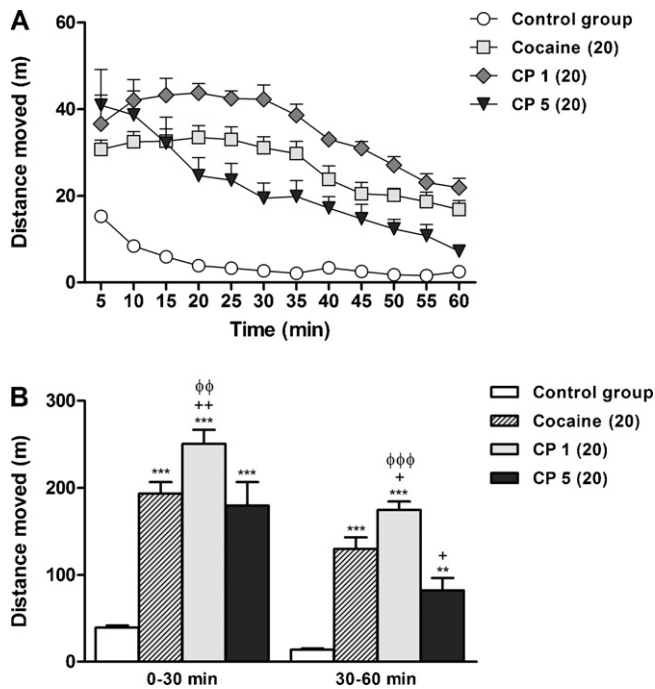


Fig. 2. A: Locomotor activity induced by systemic administration of CP 1 and 5 at an equivalent dose of cocaine base (20 mg/kg) and cocaine (20 mg/kg) during 60 min. B: Effect of the treatments on distance moved (m) expressed in two periods: 0–30 min and 30–60 min. All data are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test. * = denotes statistical differences vs. control group; + = denotes statistical differences vs. cocaine; ϕ = denotes statistical differences vs. CP 1. *** $\phi\phi\phi$ = $P < 0.001$; ** $\phi\phi$ = $P < 0.01$; * = $P < 0.05$. There was no difference between CP 5 and cocaine in the first registered period (0–30 min). $N = 6$ –8.

lant effect induced by CP 1 and CP 5 samples while the stimulant effect induced by CP 7 cannot be explained only by its cocaine base content. The amount of caffeine may play an important role in the enhancement of the locomotion induced by this CP sample.

Based on this partial result, in a second experiment we increased CP 1 and CP 5 doses to determine if the interaction cocaine-caffeine could be also evidenced. Fig. 2A and B shows the distance moved after CP 1, CP 5 and cocaine administration at equivalent dose of 20 mg/kg. The resulting caffeine doses administered for each CP sample are shown in Table 3.

The locomotor profile induced by these drugs registered during 60 min is shown in Fig. 2A. Two-way ANOVA revealed a significant effect for time ($F_{1,46} = 48.37$; $P < 0.0001$) and treatment ($F_{3,46} = 74.72$; $P < 0.0001$) but not for time $\times$ treatment interaction ($F_{3,46} = 2.71$; $P = 0.06$). Post hoc Newman–Keuls test indicated that all treatments induced a significant hyperlocomotion compared with the control group either in the 0–30 min or 30–60 min period (Fig. 2B). CP 1 induced a significant increase in the locomotion compared to the cocaine and CP 5 administration whereas the effect of CP 5 treatment was similar to cocaine in the first period, but less during the second period (30–60 min, Fig. 2B). Besides, total distance moved (0–60 min) and velocity of movement revealed a significant difference induced by CP 1 compared with all treatments (Table 2). Animals treated with CP 5 showed a stimulant effect similar than the ones treated with cocaine.

Overall, the higher stimulant activity induced by CP 1 could be the result of an additive action between cocaine and caffeine which became evident when the dose of CP 1 was increased to 20 mg/kg. On the other hand, CP 5 may behave similar to cocaine because of its low caffeine content.

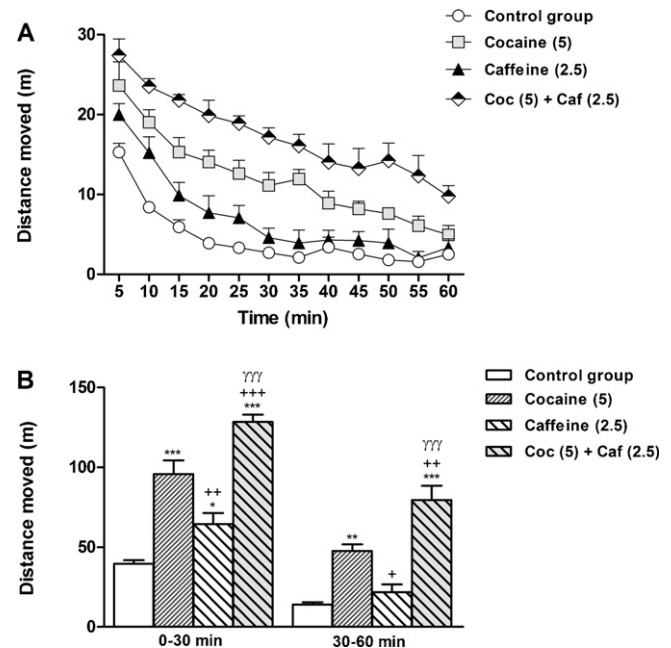


Fig. 3. A: Locomotor activity induced by systemic administration of cocaine (5 mg/kg), caffeine (2.5 mg/kg) and cocaine at 5 mg/kg combined with caffeine at 2.5 mg/kg, Coc (5) + Caf (2.5), during 60 min. B: Effect of the treatments on distance moved (m) expressed in two periods: 0–30 min and 30–60 min. All data are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test. * = denotes statistical differences vs. control group; + = denotes statistical differences vs. cocaine; γ = denotes statistical difference vs. caffeine (2.5). *** $\gamma\gamma\gamma$ = $P < 0.001$; ** $\gamma\gamma$ = $P < 0.01$; * γ = $P < 0.05$. There was no difference between caffeine (2.5) and control group in the first registered period (0–30 min). $N = 5$ –8.

3.3. Stimulant effect induced by cocaine and caffeine combinations vs. cocaine

To confirm that the amount of caffeine contributes to the stimulant effect of CP samples, a third series of experiments was conducted. Thus, animals were injected with cocaine at 5 mg/kg, caffeine at 2.5 mg/kg or the combination of both. These values were calculated from the contents of both stimulants present in CP 7 at the equivalent dose of 5 mg/kg of cocaine base; Coc (5) + Caf (2.5) group (see Table 3).

Fig. 3A and B shows the results related to the stimulant effects of these treatments; the locomotor profile induced by treatments along 60 min is provided in section A. Two-way ANOVA revealed a significant difference for time ($F_{1,45} = 101.07$; $P < 0.0001$) and treatment ($F_{3,45} = 66.08$; $P < 0.0001$) but not for the interaction ($F_{3,45} = 2.05$; $P = 0.11$). Post hoc analysis showed a significant effect between cocaine (5) and Coc (5) + Caf (2.5) vs. control group in both registered periods (0–30 and 30–60 min, Fig. 3B) whereas caffeine (2.5) only reached a significant effect in the first period (0–30 min, Fig. 3B). In addition, Coc (5) + Caf (2.5)-combined treatment produced a significant rise in the locomotion compared to the cocaine (5)- or caffeine (2.5)-injected animals in both periods (0–30 and 30–60 min, Fig. 3B). Animals treated with caffeine (2.5) showed a significant lower stimulant effect than the ones treated with cocaine (5). Considering the effect of these treatments on total distance moved (0–60 min) and velocity of movement, one-way ANOVA and post hoc analysis revealed significant differences between Coc (5) + Caf (2.5)-treated animals vs. control, caffeine (2.5) and cocaine (5) groups (Table 2). Moreover, caffeine (2.5) was significantly different vs. cocaine (5) but not vs. the control group. This result confirms that, at the dose assayed (at equivalent dose of 5 mg/kg of cocaine base), the caffeine content of CP 7 contributed to the hyperlocomotion observed after its injection. Note

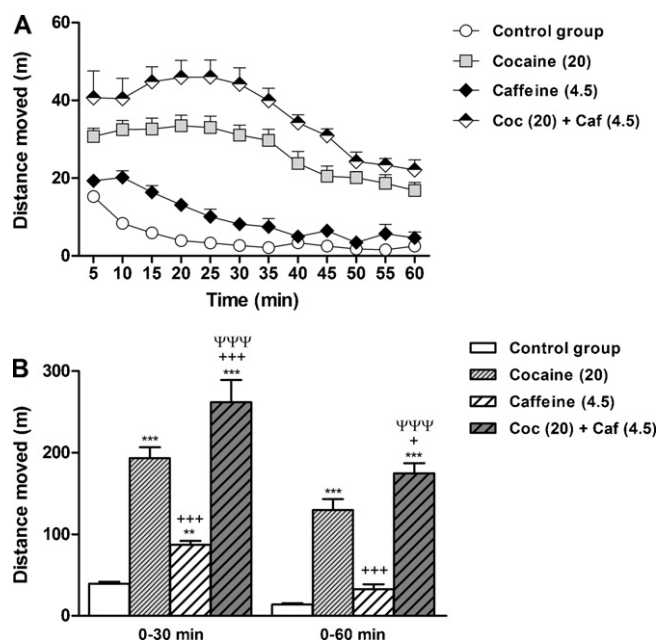


Fig. 4. A: Locomotor activity induced by systemic administration of cocaine (20 mg/kg), caffeine (4.5 mg/kg) and cocaine at 20 mg/kg combined with caffeine at 4.5 mg/kg, Coc (20)+Caf (4.5), during 60 min. B: Effect of the treatments on distance moved (m) expressed in two periods: 0–30 min and 30–60 min. All data are expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test. * = denotes statistical differences vs. control group; * = denotes statistical differences vs. cocaine; ψ = denotes statistical difference vs. caffeine (4.5). ***+, $\psi\psi\psi$ = $P < 0.001$; ** = $P < 0.01$; * = $P < 0.05$. There was no difference between caffeine (4.5) vs. control group in the first registered period. $N = 5-8$.

that the mean value of the distance moved induced by Coc (5) + Caf (2.5) and CP 7-treated animals was very similar (191.3 ± 19.1 and 198.9 ± 16.4 , respectively).

Similarly, to determine if the amount of caffeine was responsible of the higher stimulant effect observed after CP 1 administration at equivalent dose of 20 mg/kg of cocaine base, other animals were injected with cocaine at 20 mg/kg combined with a dose of caffeine at 4.5 mg/kg, an approximate value calculated according to the caffeine content in CP 1 when was administered at an equivalent dose of 20 mg/kg of cocaine base; Coc (20)+Caf (4.5) group (see Table 3). Results are presented in Fig. 4A and B; section A shows the locomotor profile induced by the treatments. Two-way ANOVA revealed a significant effect for time ($F_{1,44} = 42.92$; $P < 0.0001$) and treatment ($F_{3,44} = 106.55$; $P < 0.0001$) but not for the interaction ($F_{3,44} = 2.33$; $P = 0.08$). Post hoc analysis showed a significant effect between cocaine (20) and Coc (20)+Caf (4.5) vs. control group in both registered periods (0–30 and 30–60 min, Fig. 4B). Locomotion was increased in caffeine (4.5)-treated animals only in the first period (0–30 min, Fig. 4B). Moreover, the stimulant effect induced by Coc (20)+Caf (4.5)-combined treatment was significantly higher than the observed in cocaine (20)-injected animals and also with those treated with caffeine (4.5) in both periods (0–30 and 30–60 min, Fig. 4B). The stimulant effect induced by caffeine (4.5) was significantly lower than the cocaine (20) treatment in both registered periods. For total distance moved (0–60 min) and velocity of movement, one-way ANOVA showed a significant effect of the treatments assayed. Post hoc analysis revealed significant differences between Coc (20)+Caf (4.5)-treated animals vs. control, caffeine (4.5) and cocaine (20) groups (Table 2). Caffeine (4.5) did not reach a significant difference to the control group but its effect was significantly lower than cocaine (20).

Conclusively, the high hyperlocomotion observed after CP 1 injection compared to that induced by cocaine (20) indicates that the caffeine content strongly contribute to the stimulant effect of

CP 1 when is injected at equivalent dose of 20 mg/kg of cocaine base. Note that the mean value of the distance moved induced by Coc (20)+Caf (4.5) and CP 1-treated animals was very similar (414.9 ± 38.4 and 425.2 ± 22.2 , respectively).

3.4. Locomotor pattern induced by all treatments during 60 min

Fig. 5 shows representative tracks of the animals' movement patterns treated with CP 1, 5 and 7 samples, cocaine and caffeine only or the combination of cocaine plus caffeine. Tracks from control animals displayed a typical pattern of movement with high peripheral activity and less central activity in the OF. According to the total distance moved shown in Table 3 and as expected for psychostimulant drugs it can be observed that the movement pattern of almost all treatments was clearly different from that observed in control animals, even reaching very high levels of intensity in some traces along the field. The comparison of these qualitative results with the absolute values of the distance moved of each treatment is presented in Table 2.

4. Discussion

The present work reports the chemical analysis of CP samples obtained from different seizures and preclinical studies showing the stimulant effect elicited by them.

4.1. Chemical analysis of CP samples: cocaine and caffeine as main components

The chemical analysis of the CP samples showed that cocaine was the main component in most of them (above 50% except one sample) and caffeine was the most frequently detected active adulterant (between 1 and 15%) while lidocaine or amphetamine were not detected in any of the samples. It is not surprising to find that the CP samples were adulterated, since this is a common finding in the analysis of illicit drugs, e.g. illicit cocaine is rarely sold in pure form and is usually adulterated with other substances thereby varying in purity. Adulterants (substances deliberately added to mimic or to boost the effects of the drug), impurities (defined above) and diluents (inert substances added as bulking agents) are frequently detected in street cocaine [17,31,32]. Particularly, caffeine and amphetamine have been described as active adulterants in illicit cocaine and other psychotropic drugs [12,16,17,33].

To our knowledge, the report by ElSohly and colleagues is the only published chemical analysis of CP samples, in this case coming from Colombia and Peru. These authors reported that cocaine was the main component and that the impurities in CP samples included benzoic acid and alkaloids like ecgonine, benzoylecgonine, cis- and trans-cinnamoylcocaine [34]. The cocaine and some impurities contents match with our results, although adulterants are neither mentioned nor quantified in that report [34]. Therefore, our results contribute to the knowledge of the chemical composition of this type of drugs of abuse at the level of the consumer's market.

4.2. Stimulant effect of CP samples and the relevance of caffeine

In regard to the behavioral effect, we found that depending on the CP sample and the administered dose (equivalent of 5 or 20 mg/kg of cocaine base content) the animals treated with adulterated CP samples with a high proportion of caffeine had significantly greater locomotor activity than those treated with equivalent doses of cocaine only. By the co-administration of cocaine and caffeine we reproduced the behavioral responses of these CP samples, demonstrating that caffeine is an active adulterant responsible for the greater locomotor activity observed.

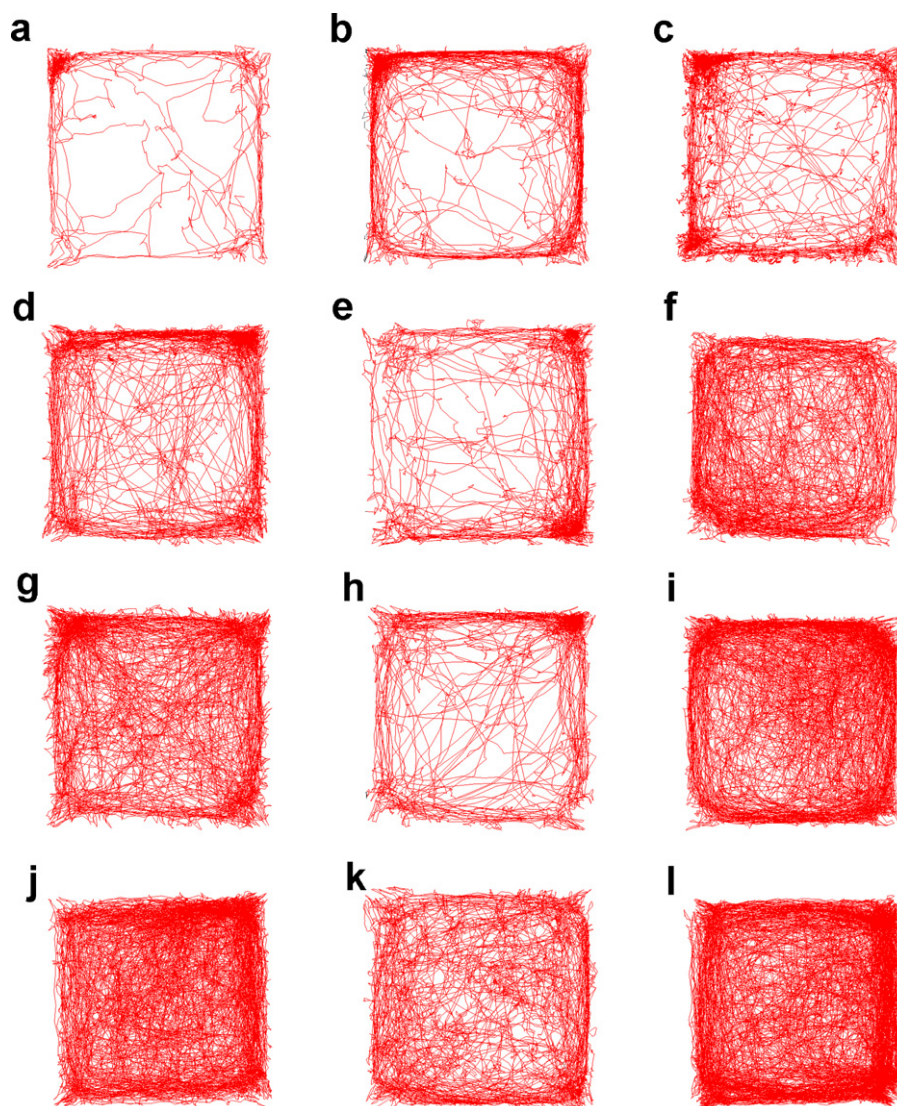


Fig. 5. Pattern of movement induced by cocaine, CP 1, CP 5, CP 7 or combined treatment of cocaine plus caffeine, at different doses. Red traces represent the animal locomotion under each treatment (a–l) recorded during 60 min. a: control group; b: caffeine (2.5); c: cocaine (5); d: CP 1 (5); e: CP 5 (5); f: CP 7 (5); g: Coc (5)+Caf (2.5); h: caffeine (4.5); i: cocaine (20); j: CP 1 (20); k: CP 5 (20); l: Coc (20)+Caf (4.5). Numerical data corresponding to each trace are showed in Table 2. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

We have previously published data on the behavioral and neurochemical effects induced by one CP sample that corresponds to CP 1 included in this report. Those data showed that after acute administration at an equivalent dose of 10 mg/kg of cocaine base, the CP sample tested did not show any difference with cocaine on locomotion or dopamine metabolism in the nucleus accumbens [10]. Nevertheless, further experiments were necessary to obtain a more conclusive picture of the neurobiological effect of CP 1 and to extrapolate the conclusions to other CP samples seized. In the present study we investigated the chemical composition of seven CP samples and the contribution of the adulterants in the resultant CP stimulant effect. The cocaine together with the caffeine content appeared as the major difference between the samples. Thus, we selected some representative ones to continue the study of their stimulant effect. All CP samples assayed elicited a stimulant effect maintained along the registered time, and importantly this effect was similar or higher than cocaine administered at equivalent doses. Specifically, animals treated with CP 7 at an equivalent dose of 5 mg/kg of cocaine base, had significantly greater locomotor activity than cocaine. Moreover, when CP 1 was injected at a dose of 20 mg of cocaine base/kg (but not at 5 mg/kg or 10 mg/kg)

a higher stimulant effect than the induced by cocaine only at an equivalent dose was achieved. Results indicated that these CP samples contained one or more components different from cocaine that contributed to the stimulant effect. Caffeine seemed to be the active adulterant that contributed to the coca-paste stimulant effect, since after its combination with cocaine at the same percentage measured in CP 7 or CP 1, a similar behavioral profile was obtained. Thus, our results demonstrate that the caffeine content found in several CP samples is enough to potentiate the stimulant effect attributed to cocaine base content. This statement was strongly supported by the fact that low caffeine content in CP 5 produced similar locomotor effects than cocaine at equivalent doses. Moreover, these behavioral results indirectly indicate that the pharmacological incidence of impurities present in the CP samples was imperceptible.

In the present study, we did not study the specific mechanisms that could explain the contribution of caffeine in the potentiation of the CP stimulant effect. The main caffeine mechanism of action in the brain seems to be a nonselective competitive blockade of adenosine receptors, in particular adenosine A₁ receptors and A_{2A} receptors [35,36]. Actually, increasing evidence indicates that caffeine exerts its motor stimulant effect by acting on striatal medium

spiny neurons blocking A₂ receptors and thus reducing the inhibition exerted by endogenous adenosine on striatal dopaminergic transmission [20,37]. On the other hand, the stimulant effects produced by drugs like cocaine or amphetamine are exerted mainly by interfering with the dopamine transport system, thereby increasing the mesolimbic and striatal dopaminergic neurotransmission [38–40], both involved in the control of the spontaneous and drug-stimulated motor activity. Therefore, although the mechanisms of action of caffeine and cocaine are substantially different, they could lead to an increase in both dopaminergic neurotransmission systems explaining the great stimulant action induced by CP 1 or 7 samples at doses of 20 and 5 mg/kg respectively.

So far there are no published preclinical or clinical data on CP central effects that explain its high potential for addiction and the clinical picture observed among its consumers. Here we report that caffeine present in CP samples may contribute to the motor stimulant effect when administered via a systemic intraperitoneal route, discarding the contribution of other impurities. Cocaine hydrochloride cannot be smoked because it is decomposed at temperatures required to volatilization; cocaine base, however, can be easily smoked. Thus, when CP is smoked, cocaine reaches the brain more rapidly than when the hydrochloride is insufflated [41–43] and results in more intense subjective effects which may contribute to the greater addictive potential of CP. In addition to cocaine base in CP, caffeine could also be volatilized [44] and rapidly reach the brain when is smoked contributing to the CP central effects. Therefore, according to our results it is important to consider that the combination of cocaine base and caffeine in a smoked drug (CP) could boost its stimulant effect and this may contribute to its high dependence and the differential clinical picture observed among its consumers. Nevertheless, additional studies are needed to elucidate the pharmacodynamic nature of the interaction between cocaine and caffeine and to confirm the potentiation of both drugs in the CP stimulant effect using the volatilization as a route of administration. Moreover, further preclinical studies should be done to examine how CP chemical composition contributes to its addictive properties and which are the consequences of the stimulants interaction on the health of consumers.

4.3. Conclusions

The current data provide information about the composition of CP samples and clearly demonstrate that cocaine and caffeine contents contribute to the stimulant effect of CP. Additionally, we provide useful information to the scientific and clinicians' community about the importance of the adulterants in illicit drugs that might have considerable impact on consumer's addictive profile.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

This study was fully supported by Grant *Programa de Desarrollo Tecnológico-Salud* (PDT, Uruguay) 76/26 and partially by Grant *Alto Impacto Social* (AIS, Uruguay) 2009/2/575 and PEDECIBA (Uruguay). María Noel Meikle was recipient of a contract from PDT 76/26; currently has a postgraduate fellowship from ANII. Ximena López Hill and José Pedro Prieto are recipients of a contract from AIS 2009/2/575. Ximena López Hill and María Noel Meikle are postgraduate students of PEDECIBA. We are grateful to Lic. Milton Romani and Ms. Laurita Regueira from National Drugs Board; Ms. Elena Lerena from Technical Forensic Institute, for supplying Coca paste samples; Dr. Juan Triaca from Portal Amarillo for giving us

information about clinical aspects of Coca paste consumers and to Marcela Martínez by technical support. Specially thanks to Dr. Andrea Gago for her valuable and great helpful in the initial part of this research project. We are also grateful to Diego Detomasi and Carina Detomasi for their help in language revision on the manuscript.

References

- [1] Jeri FR. The coca paste epidemic in South America: epidemiological, clinical, experimental and therapeutic observations. *Revista de la Sanidad de las Fuerzas Policiales* 1982;43(2):170–9.
- [2] Castro de la Mata R. Aspectos farmacológicos de la pasta básica de cocaína. In: León FR, Castro de la Mata R, editors. *Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario*. CEDRO; 1989. <http://www.cedro.org.pe>.
- [3] Navarro R. Aspectos clínicos de la dependencia a la pasta básica de cocaína. In: León FR, Castro de la Mata R, editors. *Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario*. CEDRO; 1989. <http://www.cedro.org.pe>.
- [4] Pérez J. Clínica de la adicción a pasta base de cocaína. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría* 2003;41:55–63.
- [5] National Drugs Board. *Drogas: más información menos riesgos*. 6th ed. National Drugs Board, Presidencia de la República Oriental del Uruguay; 2008. <http://www.infodrogas.gub.uy>.
- [6] Triaca J, Cardeillac V, Idiarte Borda C. Características de los primeros usuarios que consultaron en el Centro de Referencia Nacional de la Red Drogas “Portal Amarillo”. *Revista Psiquiatría del Uruguay* 2009;73:37–48.
- [7] Ferrando R, Bocchino S, Barrachina A, Ferro A, Rodríguez J, Silveira A, et al. Alteraciones de la perfusión cerebral en consumidores activos de pasta base de cocaína. *Revista Psiquiatría del Uruguay* 2009;73:51–62.
- [8] Jeri FR. El síndrome de la pasta de coca. *Revista de la Sanidad del Ministerio del interior* 1978;39:1–18.
- [9] Castaño P. Cocaínas Fumables. *Adicciones* 2000;12(4):541–50.
- [10] Meikle MN, Urbanavicius J, Prunell G, Umpiérrez E, Abin-Carriquiry A, Scorza MC. Primer estudio pre-clínico de la acción de Pasta Base de Cocaína en el Sistema Nervioso Central. *Revista Psiquiatría del Uruguay* 2009;73:25–36.
- [11] Paly D, Jatlow P, Van Dyke C, Jeri FR, Byck R. Plasma cocaine concentrations during cocaine paste smoking. *Life Sciences* 1982;30:731–8.
- [12] Hawks R. “Cocaína: la substancia”. La Cocaína. In: Petersen RC, Stillman RC, editors. *NIDA Research Monograph*; 1997, chapter III, p. 13.
- [13] Misra AL, Vadlamani NL, Pontani RB. Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1986;24:761–4.
- [14] Barat SA, Abdel-Rahman MS. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. *Brain Research* 1996;742:157–62.
- [15] Barat SA, Abdel-Rahman MS. Kinetics and rat locomotor activity following cocaine and lidocaine administration. *Journal of Applied Toxicology* 1998;18:227–32.
- [16] Simonsen KW, Kaa E, Nielsen E, Rollmann D. Narcotics at street level in Denmark. A prospective investigation from 1995 to 2000. *Forensic Science International* 2003;131:162–70.
- [17] Evrard I, Legleyeb S, Cadet-Taïroua A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy* 2010;21:399–406.
- [18] Rall TW. Central nervous system stimulants. In: Goodman LS, Gilman A, editors. *The Xanthines in the pharmacological basis of therapeutics*. 6th ed. New York: Macmillan Publishing Co; 1980. p. 592–607.
- [19] Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews* 1999;51:83–133.
- [20] Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004;61:857–72.
- [21] Snyder SH, Katims JJ, Annau Z, Bruns RF, Daly JW. Adenosine receptors and behavioral actions of methyl-xanthines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981;78:3260–4.
- [22] Svenningsson P, Nomikos GG, Ongini E, Fredholm BB. Antagonism of adenosine A_{2A} receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience* 1997;79:753–64.
- [23] Bedingfield JB, King DA, Holloway FA. Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity and additivity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1998;61:291–6.
- [24] Gauvin DV, Criado JR, Moore KR, Holloway FA. Potentiation of cocaine's discriminative effects by caffeine: a time-effect analysis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1990;36:195–7.
- [25] Horger BA, Wellman PJ, Morien A, Davies BT, Schenk S. Caffeine exposure sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine. *Neuroreport* 1991;2:53–6.
- [26] Jaszyna M, Gasior M, Shoaib M, Yasar S, Goldberg SR. Behavioral effects of nicotine, amphetamine and cocaine under a fixed-interval schedule of food reinforcement in rats chronically exposed to caffeine. *Psychopharmacology* 1998;140:257–71.
- [27] Young R, Gabryszuk M, Glennon RA. (–) Ephedrine and caffeine mutually potentiate one another's amphetamine-like stimulus effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1998;61:169–73.

- [28] Scorza MC, Meikle MN, López-Hill X, Richeri A, Lorenzo D, Artigas F. Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2008;11:519–32.
- [29] Carboni E, Imperato A, Perezzi L, Di Chiara G. Amphetamine, cocaine, phenylcyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 1989;28:653–61.
- [30] Antoniou K, Kafetzopoulou E, Papadopoulou-Daifotis Z, Hyphantisa T, Marselos M. d-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1998;23:189–96.
- [31] Coomber R. Adulteration of drugs: the discovery of a myth. *Contemporary Drug Problems* 1997;24(2):239–71.
- [32] Coomber R. The adulteration of drugs: what dealers do, what dealers think. *Addiction Research* 1997;5(4):297–306.
- [33] McNamara R, Maginn M, Harkin A. Caffeine induces a profound and persistent tachycardia in response to MDMA (“Ecstasy”) administration. *European Journal of Pharmacology* 2007;555:194–8.
- [34] ElSohly MA, Brenneisen R, Jones AB. Coca paste: chemical analysis and smoking experiments. *Journal of Forensic Sciences* 1991;36:93–103.
- [35] Jacobson KA, van Rhee M. Development of selective purinoceptor agonists and antagonists. In: Jacobson KA, Jarvis MF, editors. *Purinergic approaches in experimental therapeutics*. New York: Wiley-Liss; 1997. p. 101–28.
- [36] Daly JW, Fredholm BB. An atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence* 1998;51:199–206.
- [37] Cauli O, Morellia M. Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology* 2005;16(2):63–77.
- [38] El Yacoubi M, Ledent C, Ménard J-F, Parmentier M, Costentin J. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British Journal of Pharmacology* 2000;29:1465–73.
- [39] Kuczenski R, Segal DA, Aizenstein ML. Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *Journal of Neuroscience* 1991;9:2703–12.
- [40] Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats (amphetamine/cocaine/ethanol/nicotine/opiates). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:5274–8.
- [41] Jones RT. NIDA research monograph 99. In: *Research findings on smoking of abused substances*; 1990. p. 30–41.
- [42] Samaha AN, Robinson TE. Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends in Pharmacological Science* 2005;26(2):82–7.
- [43] Vaughn MG, Fu Q, Perron BE, Bohnert ASB, Howard MO. Is crack cocaine use associated with greater violence than powdered cocaine use? Results from a national sample. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 2010;36:181–6.
- [44] Gostic T, Klemenc S, Stefane B. A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Science International* 2009;187:19–28.

Anti-aggressive effect induced by coca-paste seized sample on isolation-induced aggression in rats. Comparison with cocaine.

María Noel Meikle¹, Jessika Urbanavicius¹, José Pedro Prieto¹, Ximena López¹,
Andrés Abin Carriquiry², Giselle Prunell², María Cecilia Scorza^{1a}

¹Laboratorio de Biología Celular and ²Departamento de Neuroquímica, Instituto
de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

^aCorresponding author: María Cecilia Scorza.

Avenida Italia 3318. ZP11600. Montevideo, Uruguay.

Telephone Number: (+) 598 2487 1616 ext: 115.

Fax Number: (+) 598 2487 5548.

E-mail: scorza@iibce.edu.uy

Abstract

The drugs of abuse-aggression/violence relationship has been recognized but its nature is often complex. We are interested in the study of the pharmacological action of coca-paste (CP), an illicit drug of abuse widespread in Latin America which consumption has been usually associated with aggressiveness/violence. However, little is known about preclinical effects of CP and aggressive behavior.

We study the effect induced after acute administration of one CP seized sample (CP 1) on aggressive behavior using the isolation-induced aggression paradigm in male rats. A comparison with cocaine injected at equivalent dose of cocaine base (10 mg/kg) was included.

In the test session, CP 1 and cocaine significantly inhibited the aggressive behaviors (number and time) whereas exploratory activity (rearings) was increased. Social investigation time was slightly reduced only by cocaine. No residual effect of both drugs was obtained during the post-test session. A hyperactive state was provoked by both drugs. Neurochemical correlation revealed a significant increase of dopamine (DA) tissue levels in Nucleus accumbens (NAcc) and tended to increase serotonin (5-HT) levels into the Prefrontal Cortex (PFC). DAergic and 5-HTergic turnover in both areas were consequently decreased.

We demonstrated that, CP 1 behaved similarly to cocaine. Stimulation of the mesolimbic system, reflected by a hyperactive state and DA levels increased after CP 1 and cocaine treatment could be involved specifically in the impaired animal aggressive performance. Additionally, the absence in a reduction in PFC 5-HT levels could also contribute to the anti-aggressive effect induced by CP 1 and cocaine.

Keywords: aggression, coca-paste, rats, cocaine, dopamine

1. Introduction

Coca-Paste (CP) is an illicit drug of abuse. Its consumption has been extended in several South American countries for many years (Jeri 1982, Castro de la Mata R 1989; Navarro 1989; Pérez 2003; National Drugs Board 2008). Despite that, its pharmacological effects on the central nervous system (CNS) had not been studied so far. Accordingly, we have started to carry out a preclinical characterization of the effects induced by this drug to elucidate the neural basis involved in the clinical profile of CP consumers. We had already described the stimulant effect induced by the acute systemic administration of CP samples from different police seizures in comparison with the effect induced by cocaine (Meikle et al. 2009; Lopez-Hill et al. 2011); however other CP central actions remain to be addressed.

CP is one of the earliest intermediate products obtained during any of the preliminary phases of cocaine alkaloid extraction from coca leaves (from *Erythroxylon coca* bush) (Paly et al. 1982; National Drugs Board 2008). It is a non-purified extract of coca leaves with a high (although variable) content of cocaine (base) mixed with a low proportion of impurities (e.g. other alkaloids) and adulterants (Triaca et al. 2009; Lopez-Hill et al. 2011). CP is one of the forms of cocaine used for smoking (Castaño 2000). In humans, its consumption produces an intense euphoria and a very fast stimulant effect, psychomotor alteration as well as high dependence. After CP consumption several behavioral alterations like impulsivity and aggressiveness usually emerge (Jeri 1978; Castro de la Mata R 1989; Navarro 1989; Pérez 2003; National Drugs Board 2008; Triaca et al. 2009; Ferrando et al. 2009) and likewise crack addicts, people who consume CP have frequently been associated with crime and violence (Hatsumaki and Fischman 1996; Cornish and O'Brien 1996; Triaca et al. 2009).

Although, several reports have associated the consumption of different drugs of abuse with heightened violence, the consistency of this relationship still remains in doubt (Brody 1990; Miczek 1993; Hoaken and Steward 2003). Specifically, studies from animals concerning the relationship between cocaine and aggression have discrepant outcomes. Depending of the specie, doses,

length of dosing regimen and paradigms utilized the reported results have been different (Hadfield 1982a; Hadfield et al. 1982b; Darmani et al. 1990, Long et al. 1996). Consequently, a further preclinical characterization studying the relationship between cocaine and aggression appears to be needed. Additionally, no behavioral studies have been done yet regarding whether CP induces aggressive behavioral responses.

Many evidences support the involvement of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) as essential neurotransmitters in the control of aggressive behavior. Several studies implicate the mesocorticolimbic dopamine system in the preparation, execution and recovery of aggressive acts (van Erp and Miczek 2000; Miczek et al. 2004; de Almeida et al. 2005). To our knowledge, the effect on aggression induced by acute administration of psychostimulant drugs has not been correlated with acute changes on DA and 5-HT tissue levels.

Based on all mentioned above, the current study was conducted to investigate the pharmacological effect induced by acute administration of a seized CP sample (CP 1) on aggressive behavior in rats using the isolation-induced aggression paradigm. CP 1-induced response was compared to that elicited by cocaine injected at an equivalent dose of cocaine base. The animal motor activity and dopamine (DA) and serotonin (5-HT) tissue levels in the nucleus accumbens (NAcc) and prefrontal cortex (PFC) respectively, were also assessed.

2. Methods

2.1. Subjects

Adult Wistar male rats weighing 250 to 320 g, bred in the IIBCE animal facilities (Montevideo) were employed in the study. Firstly, the animals were divided into residents and intruders. Each resident was housed isolated in clear plastic and standard cages (50 x 37.5 x 21 cm) whereas intruders were maintained in groups of 6, also in standard plastic cages. All animals were housed under 12-h day-night cycle (lights on at 7:00 AM) and in a temperature-controlled environment (22 ± 2 °C) with food and water available *ad libitum*. All procedures were carried out in accordance to the IIBCE Bioethics Committee's

requirements and under the current ethical regulations of the national law on animal experimentation N°18.611. Adequate measures were taken to minimize discomfort or stress of the animals, and all efforts were made in order to use the minimal number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Drugs and dosage

A Coca-paste sample (CP 1) was obtained from a seizure made by the local police after raid procedures in 2007. This is a sample that could have been possibly consumed by drug users. CP 1 was supplied by the Technical Forensic Institute (Montevideo-Uruguay) with the authority of the National Drugs Board. Cocaine hydrochloride was obtained from Sigma Aldrich (Germany and USA). CP 1 was dissolved in hydrochloric acid (HCl) 2 % and enough sodium hydroxide to titrate the solution to a pH= 6.3; whereas cocaine was dissolved in distilled water.

A previous chemical analysis indicated that CP 1 contained 68.9 % of cocaine base and 15.0 % of caffeine. In addition, some impurities like alkaloids cis- and trans-cinnamoylcocaine were also detected at very low levels, 0.6 ± 0.2 and 1.8 ± 0.2 , respectively (Moraes et al. 2010; Lopez-Hill et al. 2011).

CP 1 and cocaine were injected intraperitoneally (i.p.). Cocaine was administered at 10 mg/kg (N = 6) whereas CP 1 was injected at equivalent cocaine dose of 10 mg/kg (N = 6). Control animals were injected with the corresponding vehicles (N = 6). The volume of injection was set at 1 ml/kg and corrected when equivalent doses were administered.

2.3. Procedures of behavioral experiments

2.3.1. Aggressive behavior

The effect of acute administration of CP 1 and cocaine on individually housed rats was investigated in the isolation-induced aggression paradigm originally based on the resident-intruder paradigm. The isolation-induced aggression has been extensively studied and used as an animal model for elucidating drug action on aggression and/or social behavioral deficits reflecting intra-specific aggression (Mizcek 1979; Koolhaas and Bohus 1991; Ferrari et al. 2005;

Miczek and de Boer 2005). Our experiments were specifically based on procedures described by Banjaw et al. (2006) with some modifications which were able to reach a baseline level of aggression in residents against intruders when encountered in their resident cage. Basically, after 7 days of individual male housing (residents) the baseline aggressive behavior of the isolated rats were monitored (design first encounter: E 1) during 10 min. Two days after, baseline aggressive behavior in resident rats was monitored (design second encounter: E 2) during 10 min. On the 11th day (Test day session) residents were randomly assigned to be injected with CP, cocaine or vehicle (control group). After 30 min, an encounter with an intruder (E 3) was registered during 15 min. All intruders were tested under drug-free conditions. A Post-test session (E 4) was performed 24 h later to determine the residual effect of the drugs. Resident home cages were not washed for at least 12 days to assure the aggression territoriality. Social encounters were performed and arranged to ensure that each of the resident rats encountered a different intruder rat from the corresponding intruder group over four test sessions. Frequency and time of the aggressive behaviors (attack-bites, chasing, kicks and keep down) were measured. Time of non-aggressive behaviors (social investigation time) and frequency of rearings activity (exploratory activity) were also recorded.

2.3.2. Motor activity

In a different set of experiments, grouped animals were treated with the same doses of CP 1 and cocaine than those treated for the aggression experiments. Locomotion was measured using an Open Field (OF) paradigm as previously described (Scorza 2008, with modifications). OF consisting of a square box (60 x 60 cm) with red 40-cm-high acrylic sides was used. Locomotor activity (quantitative and qualitative) was recorded automatically during 60 min by a camera connected to a computer equipped with the Ethovision software 7.0 (Noldus, The Netherlands). Using this video-tracking software we specifically measured the following variables: horizontal locomotor activity defined as the total distance moved in meters (m), the velocity of movements (m/sec) and the time spent in movement, as previously used (Lopez-Hill et al. 2011). The animals were tested during the light phase of the photo cycle between 9 A.M.

and 2 P.M. with the experimental room under temperature-controlled environment (22 ± 2 °C).

2.4. Procedures of neurochemical experiments

To determine the neurochemical changes induced by the acute administration of CP 1 and cocaine, DA and 5-HT tissue levels of NAcc and PFC were evaluated in a third group of animals acutely injected with CP 1 and cocaine at the same doses than those administered for the aggression experiments. 35-40 min after drugs injection rats were sacrificed by decapitation and their brains dissected. This evaluation time is in accordance with the time used to evaluate the aggression behaviors in residents during the test session. PFC and NAcc were dissected and then stored at -70 °C until the day of processing. Tissue samples were weighed, sonicated in perchloric acid (0.1 M) and centrifuged (15.000 g; 4 °C) for 15 min. The supernatants were then injected into an High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system (PM-80 BAS, West Lafayette, IN, USA) equipped with a C18 column (5 µm particles, 150 mm × 3.46 mm; Phenomenex, USA) with electrochemical detection consisting in an electrochemical detector (LC-4C BAS) with oxidation potential set at +0.75 V (glassy carbon working electrode versus a Ag/AgCl reference electrode). The mobile phase was composed of citric acid (0.15 M), sodium octylsulphate (0.6 mM), 4 % acetonitrile and 1.6% tetrahydrofuran at pH 3.0; with a flow rate of 1.0 ml/min (Costa et al. 2001). DA and 5-HT were calculated as nanogram per gram wet tissue (ng/g). 3,4-dihydroxy-yphenylacetic acid (DOPAC) and 5-hydroxy-indoleacetic acid (5-HIAA) were quantified as nanogram per gram wet tissue (ng/g) to determine the DOPAC/DA ratio and 5-HIAA/5-HT as DAergic and 5-HTergic turnover, respectively.

2.5. Data analysis

Data are given as Mean $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) and were analyzed by One-way (treatment) analysis of variance (ANOVA) of independent measures followed by post-hoc Newman-Keuls multiple comparison test. Student t-test of paired measures was also used. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Baseline isolation-induced aggression

Figure 1 A-C shows the results obtained from the evaluation of the baseline aggression at the 7th and 9th day of the resident isolation after the introduction of the intruder (E 1 and E 2, respectively) registered during 10 min. Particularly, the number of aggressive behaviors was significantly increased ($P < 0.05$; Fig. 1A) whereas the time of aggressive behaviors did not show any significant difference between E 1 and E 2 (Fig. 1B). Latency to the first attack was significantly lower during E 2 than during E 1 ($P < 0.05$; Fig. 1C). On the other hand, residents showed a time spent in social investigation and a number of rearings during E 1 similar to the ones observed during E 2 (Table 1). Overall, these results indicated that the aggressive behaviors displayed by resident animals were significantly increased from E 1 to E 2 without exhibiting any changes in the non-aggressive response and the exploratory activity.

3.2. Effect of CP 1 and cocaine in isolation-induced aggression: Test day session

Animals injected with CP-vehicle or cocaine-vehicle were pooled forming the control group since they did not show any significant difference for aggressive, non-aggressive behaviors and motor activity parameters. Figure 2 A-C shows the results related to the aggressive behaviors induced by the CP 1 and cocaine at the 11th day of the resident isolation after the introduction of the intruder (Test day session or E 3) registered during 15 min. Both CP 1 and cocaine produced a significant decrease in the number of aggressive behavior compared to the control group ($P < 0.05$), whereas no significant difference was observed between both drugs (Fig. 2A). Although the duration of aggressive behaviors tended to decrease after drugs treatment, it did not reach statistical significance (Fig. 2B). In contrast, CP 1 and cocaine induced a significant increase in the latency to the first attack in comparison with the control group ($P < 0.05$);

however this augment was significantly different between both drugs ($P < 0.05$; Fig. 2C), being the latency induced by cocaine longer than the induced by CP 1.

Table 1 also shows the social investigation time and the number of rearings during E 3. Cocaine-treated residents showed a significant decrease in the social investigation time compared with the control group ($P < 0.05$) while the effect induced by CP 1 tended to be lower than the cocaine. Besides, exploratory activity was significantly higher in residents treated with CP 1 and cocaine than the one observed in vehicle-treated animals ($P < 0.01$). CP 1 and cocaine did not show statistical differences in all these parameters (Table 1).

3.3. Effect of CP 1 and cocaine on animal-motor activity

Figure 3 A-C shows the motor activity induced by CP 1 and cocaine compared with the control group. Distance moved, velocity of movement (speed) and time spent in movement were registered. Because 30 min after the drugs injection is the period correlated with the resident-motor activity elicited during the isolation-induced aggression paradigm we only consider the motor activity recorded in a period between 30 to 45 min (shaded area in inset graph of Fig.3A). Regarding this, CP 1 and cocaine acute administration evoked a significant increase in the distance moved ($P < 0.01$; Fig. 3A), velocity of movement ($P < 0.01$; Fig. 3B) and time spent in movement ($P < 0.01$; Fig. 3C) compared to the control group. Overall, these results indicated that at the doses injected, CP 1 and cocaine induced a clear hyperactive or stimulant effect. Interestingly, this effect correlates with the high exploratory activity elicited by CP 1- and cocaine-treated residents during the isolation-induced aggression paradigm (see Table 1).

3.4. Residual effect of CP 1 and cocaine in isolation-induced aggression: Post-test day session

In order to detect a residual effect of both drugs, Figure 4 A-C shows the results related to the aggressive behaviors of residents pre-treated with CP 1, cocaine or vehicle on the 12th day of the resident isolation after the introduction of the

intruder (post-test day session or E 4) registered during 10 min. Despite the variability, no residual effect seems to be elicited neither by CP 1 or cocaine in any of the three parameters measured (e.g. number and time of aggressive behavior and latency of the first attack; Fig 3 A-C, respectively). Additionally, Table 1 shows that the mean value of the duration of social investigation was very similar between treated and control groups. The increase in the number of rearings induced by resident-drugs treated compared with the control group observed during E 3 was substantially attenuated during E 4.

3.5. Effect of CP 1 and cocaine in DA and 5-HT tissue levels in NAcc and PFC.

Table 2 displays the DA and 5-HT tissue levels in NAcc and PFC, respectively induced by CP 1 and cocaine compared with the control group. It could be observed that, as expected, CP 1 and cocaine significantly increased DA tissue levels in NAcc ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) and tended to increase 5-HT tissue levels in PFC (Table 2). Moreover, DAergic and 5-HTergic turnover in both brain regions was also measured. A significant decrease in DAergic turnover was elicited by CP 1 and cocaine ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively); 5-HTergic turnover was also decreased after both drugs injection ($P < 0.01$, CP 1 and $P < 0.05$, cocaine). No differences between drugs were observed in any of the parameters measured (Table 2).

4. Discussion

The present study constitutes the first preclinical characterization of the effect induced by acute administration of a CP seized sample on aggressive behavior. This response was elicited by territoriality in isolated male rats and was also compared with that induced by cocaine.

Residents acutely injected with CP 1 demonstrated a clear anti-aggressive effect and accordingly with others works an anti-aggressive action was also observed after cocaine acute administration (Miczek, 1979; Darmani et al. 1990; Long et al. 1996; Estelles et al. 2004). Basically, CP 1-treated animals behaved similarly to cocaine-treated residents, suggesting that cocaine

base is the main component responsible for the anti-aggressive action induced by CP 1. The blockage of the aggressive behavior was generally evidenced by a decreased number of attacks, a diminution in the time spent in attack and an increased latency to the first attack (reduced impulsivity). Moreover, the residents treated with CP 1 and cocaine also exhibited an increase in the exploratory activity (reflected by an increase in the number of the rearings) and a decrease in the social investigation time supporting CP 1 and cocaine's nonselective anti-aggressive effects. These results are in accordance with previous studies which reported that residents receiving an acute administration of high doses of cocaine spent less time in social investigation or in aggressive contact with the intruder (Blanchard and Blanchard 1999; Estelles et al. 2004). These behavioral responses could be associated with an alteration in the anxiety levels of the animals or an increased exploratory activity. However, further preclinical studies should be done to examine the anxiogenic effect induced by CP 1 or cocaine in these conditions.

As expected, CP 1 and cocaine administered in a different group of animals, but at the same dose used for resident's treatment, induced a hyperactive state i.e. enhanced locomotor activity, velocity of movement and spent time in movement. Moreover, the hyperlocomotion obtained confirmed that the increase in the rearing behavior was induced specifically for both drugs and not only as a cause of the isolation housing. Obviously, the hyperactive state could interfere with the aggressive performance of the animals blocking the baseline aggression. Interestingly, no residual effect of CP 1 and cocaine was observed during the post-test session, confirming that the anti-aggressive effect was specifically induced by the drugs.

It should be mentioned that our results revealed that only one week of isolation and two resident-intruder encounters (E1-E2) were enough to obtain a baseline level of aggression in animal residents to test the effects of both drugs. This is a very important issue to be taken into account because there are a lot of discrepancies in published results considering the use of a variety of test paradigms and different types of aggression assessments.

Several evidences support the involvement of DA and 5-HT as essential neurotransmitters in the control of aggressive behavior (Yudofsky et al. 1987;

Brizer 1988; Ferrari et al. 2005; Nelson and Trainor 2007). Particularly, several studies implicate the mesocorticolimbic DA system in the preparation, execution and recovery of aggressive acts. Besides, several 5-HT receptor subtypes are distributed in mesocorticolimbic structures, which are critical for the display of aggressive behavior patterns (van Erp and Miczek 2000; Miczek et al. 2002; Miczek et al. 2004; de Almeida et al. 2005). Therefore, aggressive or anti-aggressive actions seem to depend on alterations in the DAergic and 5-HTergic systems' function. In this sense, increased levels of aggression are associated with a reduced 5-HT levels in the prefrontal cortical area, an increased DA release in NAcc or with the systemic pharmacological activation of DAergic (e.g. D2) and 5-HTergic (e.g. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B}) receptors (Citrome and Volavka 1997; Miczek et al. 2002; de Boer and Koolhaas 2005). In contrast, reduced aggression was obtained after the blockade of these 5-HT receptors (van Erp and Miczek 2000; Miczek et al. 2002; Schwartz et al. 2009) or after acute administration of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor which increases the 5-HTergic neurotransmission (Fuller 1996; Sanchez et al. 1993; Sanchez and Meier 1997; Miczek et al. 2002). Because the dose and evaluation time were similar to those used to study the effect induced by CP 1 and cocaine on the residents during the isolation-induced aggression paradigm, the monoamine changes evaluated in other group of animals were considered as a neurochemical correlation of the behavioral responses. A significant increase of DA tissue levels in NAcc after CP 1 and cocaine treatment paradoxically suggests that the suppressed aggression observed in CP 1 and cocaine-treated residents during the test session may be a result of an overactivation of the accumbal DAergic neurotransmission. This neurochemical effect was expected because cocaine inhibits the dopamine transporter (DAT; Brown et al. 2001) preventing the reuptake of dopamine into the nerve terminal. The inhibition of the DAT results in increased levels of DA in the synaptic cleft, an action that is thought to mediate the motor stimulant (Le Moal and Koob 2007). Cocaine also interacts with the vesicular monoamine transporter 2, favoring the storage of catecholamines inside synaptic vesicles (Brown et al. 2001). It has been suggested that cocaine-induced inhibition of the DAT and increased vesicular sequestration of DA cause a shift in the ratio of cytoplasmic to vesicular DA,

increasing the amount of neurotransmitter packaged in each vesicle before its release (Brown et al. 2001). According to this biochemical effect, an increase of DA tissue levels was demonstrated in NAcc after acute injection of cocaine with a concomitant decrease in the DAergic turnover (DOPAC/DA ratio), reflecting an alteration on the DAergic metabolism (Altar et al. 1987; Costa et al. 2001). Likewise, after acute injection of CP 1 we observed a similar neurochemical profile as that detected after cocaine administration indicating that cocaine base was also responsible for this effect. Cocaine can also block the reuptake of 5-HT back into monoamine nerve terminals (Ritz et al. 1987), explaining that 5-HT levels into PFC tended to increase after CP 1 or cocaine treatment. We also observed that both drugs consequently reduced the level of 5-HTergic turnover (5-HIAA/5-HT ratios) compared with the control group.

Although we demonstrated an anti-aggressive effect associated to the acute administration of CP 1, we have to take into account that chronic consumption of the drug leads to the aggressive/violent behaviors (Jeri 1978; Castro de la Mata R 1989; Navarro 1989; Pérez 2003; National Drugs Board 2008; Triaca et al. 2009; Ferrando et al. 2009). Therefore, further experiments will have to be conducted to elucidate this issue.

The current study demonstrates for the first time the presence of a relationship between a blockade in aggression behavior and the level of DA and 5-HT neurotransmission induced by CP 1 and compared with cocaine. It may be possible that a predominant role of the mesolimbic DA system underlies the anti-aggressive responses. Finally, our findings can help to clarify existing inconsistencies in the literature about the relation of the pharmacological action of drugs of abuse and aggression/violence in humans.

Acknowledgements

This study was partially supported by Grant *Alto Impacto Social* (AIS, Uruguay) 2009/2/575-ANII and *Fondo Sectorial de Salud* (FSS, Uruguay) 2010/1/1613- ANII. MNM and JU currently have a postgraduate fellowship from ANII. XLH and JPP were recipients of a contract from AIS 2009/2/575. MNM, JU and XLH are postgraduate students of PEDECIBA. We are grateful to Lic. Milton Romani and Ms. Laurita Regueira from National Drugs Board; Ms. Elena Lerena from Technical Forensic Institute for supplying Coca paste samples; Gustavo Costa and Marcela Martínez by technical support.

Statement of conflict of interest

None

References

- Altar CA, Marien MR, Marshall JF. (1987). Time course of adaptations in dopamine biosynthesis, metabolism, and release following nigrostriatal lesions: implications for behavioral recovery from brain injury. *J Neurochem* 48: 390-9.
- Banjaw MY, Miczek K, Schmidt WJ. (2006). Repeated *Catha edulis* oral administration enhances the baseline aggressive behavior in isolated rats. *J Neural Transm* 113: 543-556.
- Blanchard DC and Blanchard RJ. (1999). Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 981-991.
- Brizer DA. (1988). Psychopharmacology and the management of violent patients. *Psychiatr Clin North Am* 11: 551-568.
- Brody SL. (1990). Violence associated with acute cocaine use in patients admitted to a medical emergency department. *NIDA Res Monogr* 103: 44-59.
- Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE. (2001). Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 762-767.
- Castaño P. (2000). Cocaínas Fumables. *Adicciones* 12(4): 541-550.
- Castro de la Mata R. (1989). Aspectos farmacológicos de la pasta básica de cocaína. In: F.R. León, Castro de la Mata (Eds.). *Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario*. CEDRO <http://www.cedro.org.pe>
- Citrome L and Volavka J. (1997). Psychopharmacology of violence: part I. Assessment and acute treatment. *Psychiatr Ann* 27: 691-695.
- Cornish JW and O'Brien ChP (1996). Crack Cocaine Abuse: An Epidemic with Many Public Health Consequences. *Annu Rev Public Health* 17: 259-73.

Costa G, Abin-Carriquiry JA, Dajas F. (2001). Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. *Brain Res* 888: 336-342.

Darmani NA, Hadfield MG, Carter WH, Martin BR. (1990). Acute and chronic effects of cocaine on isolation-induced aggression in mice. *Psychopharmacol* 102: 37-40.

de Almeida R, Ferrari PF, Parmigiani S, Miczek KA. (2005). Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. *Eur J Pharmacol* 526: 51-64.

de Boer SF, Koolhaas JM. (2005). 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol* 526: 125-139.

Estelles J, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro J. (2004). Social behavioural profile of cocaine in isolated and grouped male mice. *Drug Alcohol Depend* 76: 115-12.

Ferrando R, Bocchino S, Barrachina A, Ferro A, Rodríguez J, Silveira A, et al. (2009). Alteraciones de la perfusión cerebral en consumidores activos de pasta base de cocaína. *Rev Psiquiatr Urug* 73: 51-62.

Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S, de Almeida RMM, Miczek KA. (2005). Serotonin and aggressive behavior in rodents and nonhuman primates: Predispositions and plasticity. *Eur J Pharmacol* 526: 259-273.

Fuller RW. (1996). The influence of fluoxetine on aggressive behavior. *Neuropsychopharmacology* 14: 77-81.

Hadfield MG. (1982a). Cocaine: peak increase in isolation-induced fighting post-injection. *J Neuropharmacol* 21: 711-713.

Hadfield MG, Nugent EA, Mott EW. (1982b). Cocaine increases isolation-induced fighting in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 16: 359-360.

Hatsukami DK and Fischman MW. (1996). Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality?. *JAMA* 276: 1580-8.

Hoaken PN and Stewart SH. (2003). Drugs of abuse and the elicitation of human aggressive behavior. *Addict Behav* 28: 1533-1554.

Jeri FR. (1978). El síndrome de la pasta de coca. In: *Revista de la Sanidad del Ministerio del interior* 39: 1-18.

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(2): 170-179.

Koolhaas JM and Bohus B. (1991). Animal Models of Human Aggression. In: *Animal Models in Psychiatry* (Eds.), pp. 249-271, Humana Press, Clifton, New Jersey.

Le Moal M and Koob GF. (2007). Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* 6-7: 377-93.

Long AF, Wilson MC, Sufka KJ, Davis WM. (1996). The effects of cocaine and nandrolone co-administration on aggression in male rats. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 20: 839-856.

López-Hill X, Prieto JP, Meikle MN, Urbanavicius J, Abin-Carriquiry JA, Prunell G, Umpiérrez E, Scorza MC. (2011). Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav Brain Res* 221(1):134-41.

Meikle MN, Urbanavicius J, Prunell G, Umpiérrez E, Abin-Carriquiry A, Scorza MC. (2009). Primer estudio pre-clínico de la acción de Pasta Base de Cocaína en el Sistema Nervioso Central. *Rev Psiquiatr Urug* 73: 25-36.

Miczek KA. (1979). A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 60: 253-259.

Miczek KA, de Bold JF, Haney M, Tidey J, Vivian J, Weerts EM. (1993). Alcohol, other psychoactive drugs, and violence. In A. J. Reiss, & J. A. Roth (Eds.), *Understanding and preventing violence. Social influences* 3: 182-220. Washington, DC: National Academy Press.

Miczek KA, Fish EW, de Bold JF, de Almeida RMM. (2002). Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and g-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology* 163: 434-458.

Miczek KA, Faccidomo S, De Almeida RM, Bannai M, Fish EW, de Bold JF. (2004). Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities. *Ann NY Acad Sci* 1036: 336-355.

Miczek KA and de Boer SF. (2005). Aggressive, defensive, and submissive behavior. In: Whishaw, I.Q., Kolb, B. (Eds.). *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 344-352.

Moraes M, Scorza C, Abin-Carriquiry JA, Pascale A, González G, Umpiérrez E. (2010). Consumo de pasta base de cocaína en Uruguay en el embarazo, su incidencia, características y repercusiones. *Arch Pediatr Urug* 81(2): 100-104.

National Drugs Board. (2008). "Drogas: más información menos riesgos", 6th edition Ed.: National Drugs Board, Presidencia de la República Oriental del Uruguay. <http://www.infodrogas.gub.uy>

Navarro R. (1989). Aspectos clínicos de la dependencia a la pasta básica de cocaína. In: F.R. León, Castro de la Mata (Eds.). Pasta Básica de Cocaína: Un estudio multidisciplinario. CEDRO <http://www.cedro.org.pe>

Nelson RJ and Trainor BC. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci* 8 (7): 536-546.

Paly D, Jatlow P, Van Dyke C, Jeri FR, Byck R. (1982). Plasma Cocaine Concentrations during cocaine paste smoking. *Life Sci* 30: 731-738.

Pérez J. (2003). Clínica de la adicción a pasta base de cocaína. *Rev Chil Neuropsiquiatr* 41: 55-63.

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ. (1987). Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237(4819): 1219-1223.

Sanchez C, Arnt J, Hyttel J, Moltzen EK. (1993). The role of serotonergic mechanisms in inhibition of isolation-induced aggression in male mice. *Psychopharmacology* 110: 53-59.

Sanchez C and Meier E. (1997). Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. *Psychopharmacology* 129: 197-205.

Schwartz JJ, Morrison RL, Ricci LA, Melloni RH Jr. (2009). Paliperidone suppresses the development of the aggressive phenotype in a developmentally sensitive animal model of escalated aggression. *Psychopharmacology (Berl)* 203(4): 653-63.

Scorza MC, Meikle MN, López-Hill X, Richeri A, Lorenzo D, Artigas F. (2008). Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine. *Int J Neuropsychopharmacol* 11: 519-32.

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". Rev Psiquiatr Urug 73: 37-48.

van Erp AMM and Miczek KA. (2000). Aggressive Behavior, Increased Accumbal Dopamine, and Decreased Cortical Serotonin in Rats. J Neurosci 20 (24): 9320-9325.

Yudofsky SC, Silver JM, Schneider SE. (1987). Pharmacologic treatments of aggression. Psychiatr Ann 17:397-407.

Figure 1

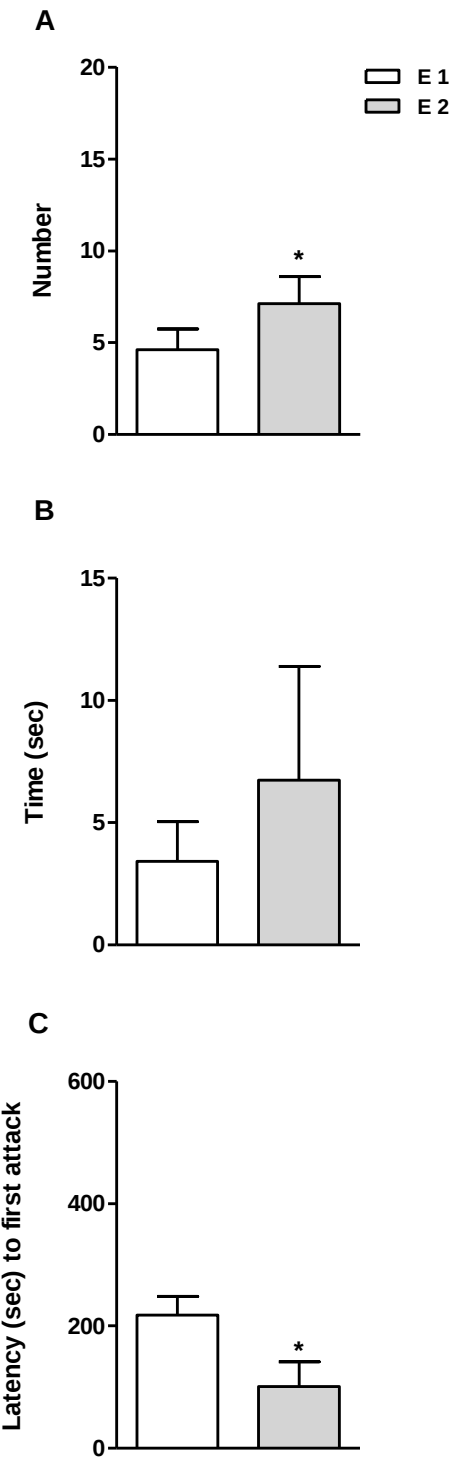


Figure 2

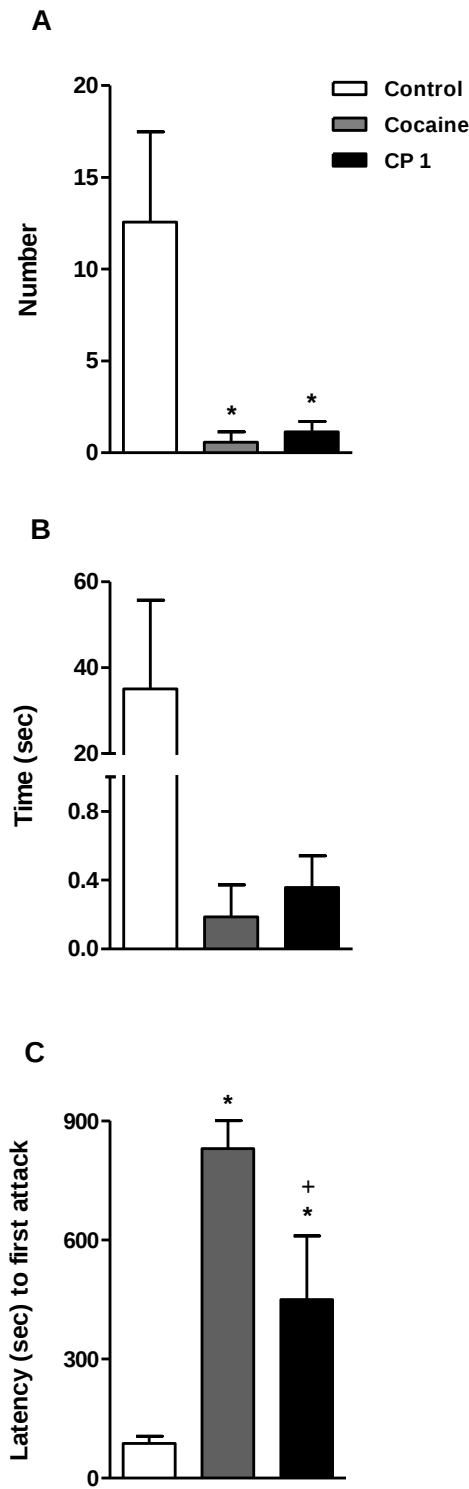


Figure 3

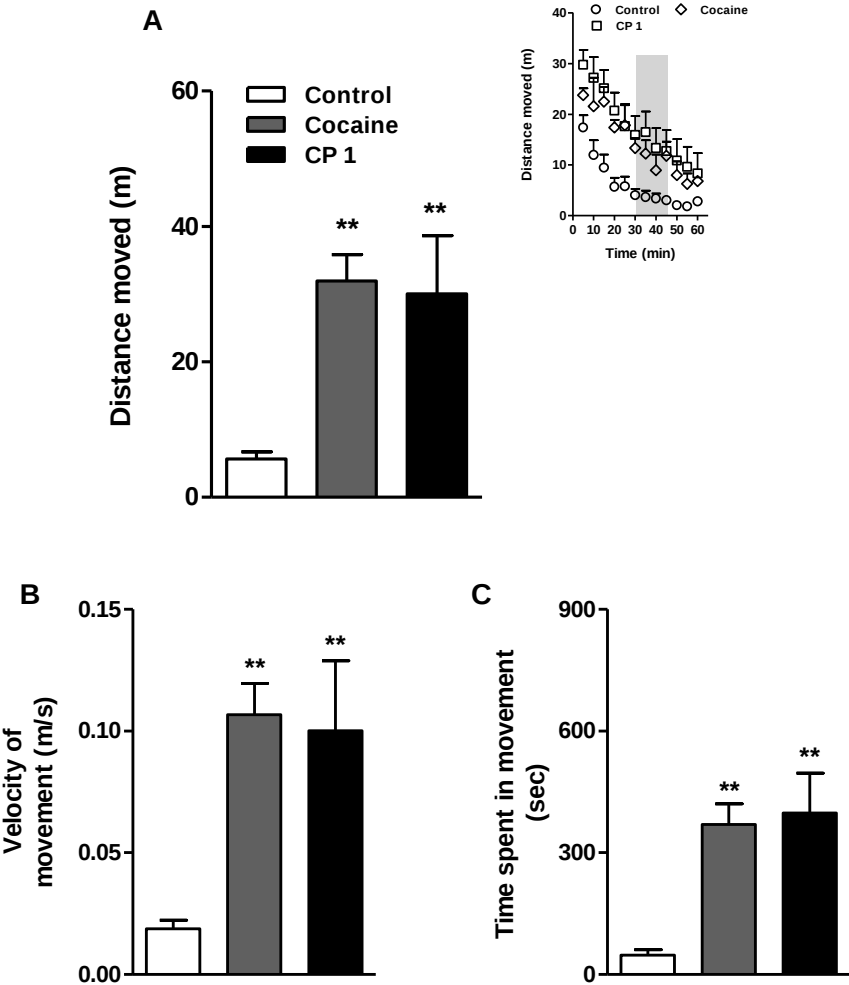


Figure 4

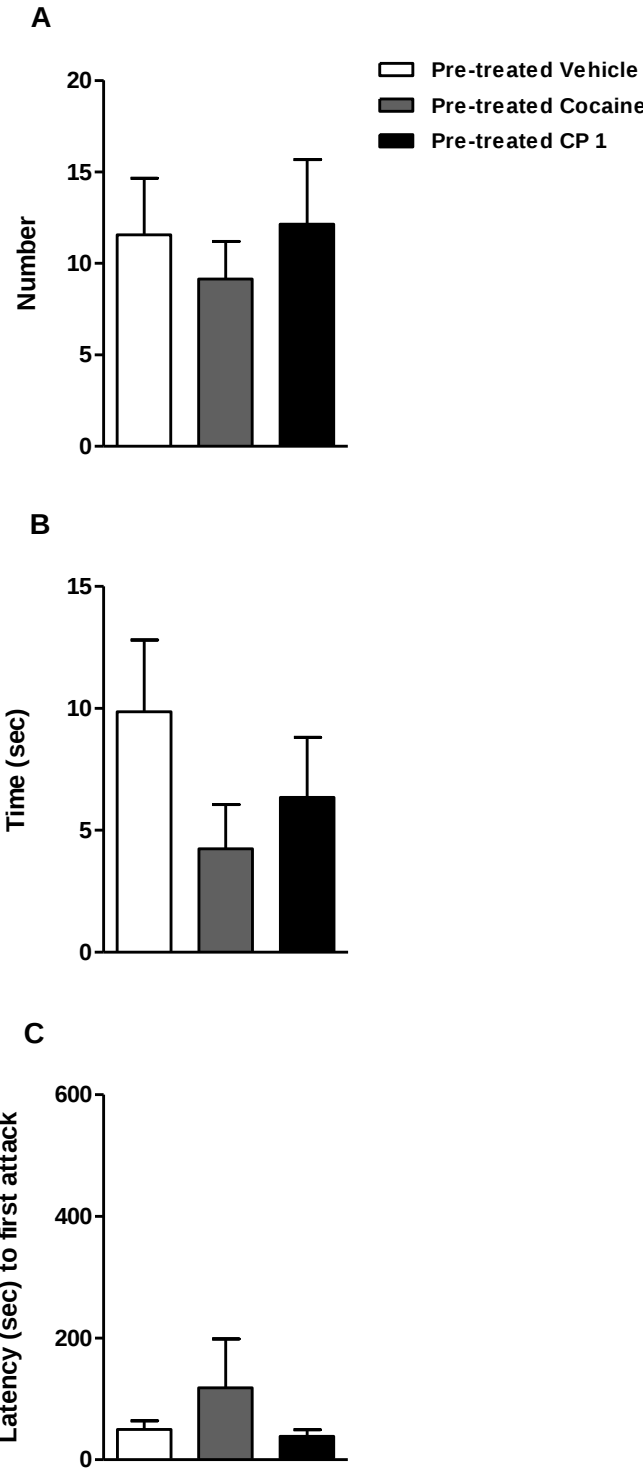


Table 1. Effects of CP 1 and cocaine on behaviors registered in residents during the isolation-induced aggression paradigm.

Resident Encounter	Treatment	Social Investigation Time (sec)	Number of Rearings
E 1 (10 min.)	No-drug	34.5 ± 3.6	51.4 ± 1.9
E 2 (10 min.)	No-drug	28.4 ± 1.3	45.3 ± 1.5
E 3 (15 min.)	Control	30.2 ± 4.6	69.0 ± 8.0
	CP 1	23.5 ± 5.9	105.3 ± 10.3 ^{**}
	Cocaine	11.3 ± 1.8 [*]	110.0 ± 5.1 ^{**}
E 4 (10 min.)	Pre-treated vehicle	27.5 ± 3.1	37.8 ± 3.8
	Pre-treated CP 1	26.5 ± 4.3	48.6 ± 4.82
	Pre-treated cocaine	26.6 ± 3.7	52.71 ± 7.1

Table 1- Values represent the mean ± SEM of the social investigation time (a non aggressive behavior) and number of rearings (exploratory activity) during four different encounters (E1-E4) between isolated rats and intruders. E1 and E 2 were analyzed during 10 min in absence of drugs. E 3 represents the test day session in which residents were injected with CP 1 (at an equivalent dose of cocaine base of 10 mg/kg) and cocaine (10 mg/kg) and registered during 15 min. E4 represents the post-test day session, was performed during 10 min in absence of drugs. Paired Student *t*-test was applied for comparison between E 1 vs. E2 and no statistical differences were obtained. One-way ANOVA followed by Newman Keuls test was applied for comparisons in E 3 and E 4. In E 3 asterisks indicate values differ from control group (* = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.01); there was no difference between cocaine and CP. There were no differences between control group and treatments during E 4 (Residual effect). N= 5-6.

Table 2- Neurochemical effects on DA and 5-HT in NAcc and PFC, respectively induced by CP 1 and cocaine.

Treatment	NAcc		PFC	
	DA	DOPAC/DA	5-HT	5-HIAA/5-HT
Control	6.805 ± 846	0.63 ± 0.05	980.8 ± 74.5	0.64 ± 0.09
CP 1	12.182 ± 948.1 ^{***}	0.28 ± 0.02 ^{***}	1123.0 ± 33.3	0.43 ± 0.02 [*]
Cocaine	10.789 ± 640.4 ^{**}	0.35 ± 0.03 ^{***}	1169.0 ± 60.6	0.37 ± 0.009 ^{**}

Values represent the mean ± SEM of DA or 5-HT and their respective metabolites (DOPAC and 5-HIAA) tissue levels expressed in ng/gr wet weight. DA turnover was calculated as DOPAC/DA ratio and 5-HT turnover was calculated as 5-HIAA/5-HT ratio. Animals were injected with CP 1 (at an equivalent dose of cocaine base of 10 mg/kg), cocaine (10 mg/kg) or vehicle (control group) and 35 min later were scarified; NAcc and CPF were dissected. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. Control group represents the animals injected with vehicle. * = denote statistical differences between control vs. treatments (CP 1 and cocaine). * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001. DOPAC: 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid; 5-HIAA: 5-hydroxy-indoleacetic acid (N = 5-7).

Figure Legend

Figure 1 A-C. Aggressive behaviors of resident animals in a baseline sampling, e.g. in two encounters, E 1 and E 2, in which residents were no injected. Aggressive behaviors were evaluated during 10 min. **A** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of number of aggressive behaviors; **B** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of time (sec) of aggressive behaviors and **C** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of latency (sec) to the first attack. Paired Student *t*-test; * = denote statistical differences between E 1 and E 2. * = $P < 0.05$. No difference was observed in the time (sec) of aggressive behaviors. N = 6-5.

Figure 2 A-C. Aggressive behaviors of resident animals registered in Test day session (E 3). Residents were injected systemically with cocaine (10 mg/kg) and CP 1 at an equivalent dose of cocaine base (10 mg/kg) and 30 min later aggressive behaviors were evaluated during 15 min. **A** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of number of aggressive behaviors; **B** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of time (sec) of aggressive behaviors and **C** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of latency (sec) to the first attack. One way ANOVA followed by Newman Keuls test. * = denote statistical differences vs. control group; + = denotes statistical differences between cocaine vs. CP. *,+ = $P < 0.05$. There was no difference between cocaine and CP in number of aggressive behaviors and no differences were obtained in time of aggressive behaviors. N = 6-5.

Figure 3 A-C. Motor activity of animals induced by systemic administration of cocaine (10 mg/kg) and CP 1 at an equivalent dose of cocaine base (10 mg/kg). Animals were injected and 30 min later the motor activity was registered in the OF. **A** effect of the treatments on distance moved (m), **B** effect of the treatments on velocity of movement (m/sec) and **C** effect of the treatments on the time (sec) spent in movement. A registration period of 15 min (between 30-45 min after drug injection) was chosen to show the three parameters measured. The inset graph showed the distance moved during 60

min whereas the shaded area indicates the period of 30-45 min considered for the study. All data are expressed as mean $\pm$ SEM. One way ANOVA followed by Newman Keuls test. * = denote statistical differences vs. control group. * = $P < 0.05$. There was no difference between cocaine and CP in each parameter. N = 6-5.

Figure 4 A-C. Aggressive behaviors of resident animals registered in post-day session (E 4). Residual effect of drugs was evaluated in residents pre-treated with vehicle, cocaine and CP and aggressive behaviors were evaluated during 10 min. **A** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of number of aggressive behaviors; **B** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of time (sec) of aggressive behaviors and **C** represents data expressed as Mean $\pm$ SEM of latency (sec) to the first attack. All data are expressed as mean $\pm$ SEM. One way ANOVA followed by Newman Keuls test. There were no differences detected in each parameter. N = 6-5.