

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología

Subárea Neurociencias

**Estudio de la propiedad antiinflamatoria de
Cannabidiol en un modelo de sensibilización
locomotora asociada a procesos inflamatorios
inducido por Cocaína y Cafeína en ratón**

Lic. Diego Flores Luna

Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Co-orientadora: Dra. Ximena López

Departamento de Neurofarmacología Experimental

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

-febrero 2025-

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer sinceramente a los miembros del tribunal, **Inés, Laura y Ronald**, por el compromiso y la atención con que leyeron esta tesis. Valoro profundamente sus comentarios y sugerencias, que acompañaron con tanta generosidad el cierre de este trabajo.

Por lo que significó transitar esta tesis, mi agradecimiento más especial es para mis tutoras, Cecilia y Ximena, que me guiaron en todo el proceso. A **Ceci**, gracias por recibirme en el laboratorio y confiar en mí para formar parte de este proyecto. Por encontrar siempre la manera de estar presente, por estar atenta a los experimentos, por ofrecer una mirada estratégica cuando surgían desafíos, y por compartir unos minutos de charla y humor al final de un día largo. Gracias por compartir tu entusiasmo y por alentarme a crecer en cada etapa de mi carrera. A **Xime**, gracias por haber estado en todo momento, por tu dedicación y generosidad inmensas. Desde los experimentos hasta los análisis, desde los informes hasta los pósters, me acompañaste en todo, con paciencia, y dándome confianza para aprender haciendo. Tu apoyo hizo que esta experiencia fuera enriquecedora tanto en lo profesional como en lo personal. Fue un privilegio compartir este proceso con vos, y agradezco profundamente todo lo que me enseñaste.

A quienes integran el **Departamento de Neurofarmacología Experimental**, gracias por la compañía, la buena onda y la amistad. Cada una de ustedes duplicó mi motivación para estar en el laboratorio. Es motivador formar parte de un grupo apasionado por la ciencia y por el trabajo en equipo. Gracias por todos los momentos compartidos.

Gracias a mis **amigas y amigos** de Paysandú, de Montevideo, de las Facultades, de otros rincones de Latinoamérica y del camino. Gracias por escucharme, por aconsejarme, por el cariño... por ser y por estar.

A **mi madre** y a **mi padre** por darme todo lo que necesité (y mucho más) para poder formarme y seguir creciendo en mi carrera. Por estar siempre, en todo momento, con todo el amor que me acompaña desde las cosas simples hasta lo grande. Gracias también a toda mi familia —**primos, tíos, abuelos**— por estar tan pendientes, por el cariño y por hacerme sentir que siempre puedo contar con ustedes.

Y gracias a **Jessi**, por apoyar mi decisión de hacer esta maestría, a pesar del desafío que significó la distancia. Gracias por acompañarme con amor y darme ánimo, por alentar todo lo que es bueno para mí y para los dos. Gracias por entender mis momentos de concentración y estudio, por ofrecer tu ayuda incluso sin estar dentro de las neurociencias, y

por celebrar con tanta alegría cada paso que doy. Gracias por el amor inmenso que me das, que me impulsa y me inspira.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	9
Presentación de Tesis.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. Reseña histórica del uso medicinal de Cannabis sativa.....	12
2. Cannabidiol (CBD): mecanismos de acción y potencial terapéutico.....	13
2.1 CBD y sistema endocannabinoide.....	14
2.2 Potencial terapéutico de CBD en trastornos neurológicos y psiquiátricos, y sus blancos asociados.....	17
3. Trastorno por uso de sustancias: enfoque en psicoestimulantes.....	18
3.1 Modelo de sensibilización locomotora inducida por psicoestimulantes.....	20
4. Inflamación asociada al PSUD.....	21
4.1 Inflamación sistémica inducida por PSUD.....	21
4.2 Neuroinflamación en el SNC inducida por PSUD.....	22
5. Potencial terapéutico de CBD en el trastorno por uso de sustancias psicoestimulantes (PSUD).....	25
5.1 Efectos conductuales de CBD en el PSUD.....	25
5.2 Propiedad antiinflamatoria de CBD en modelos experimentales de PSUD.....	27
6. Antecedentes de trabajo.....	30
6.1 Formas de consumo de cocaína: composición y efectos de la pasta base de cocaína (PBC).....	30
6.2 Rol de la cafeína, como adulterante, en la potenciación de los efectos de la PBC...	30
6.3 Potencial terapéutico de CBD como tratamiento para el consumo de PBC.....	32
6.4 Mecanismo de acción de CBD: inhibición del transportador de adenosina y la relación con su propiedad antiinflamatoria.....	32
7. Hipótesis y Objetivos.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1. Animales.....	36
2. Drogas.....	36
3. Evaluación comportamental.....	36
3.1 Modelo de Campo Abierto.....	36
3.2 Cuantificación de la actividad locomotora mediante EthoVision.....	37
3.3 Protocolo experimental de sensibilización locomotora.....	37
3.4 Protocolo experimental: efecto de CBD en la sensibilización locomotora.....	38
3.5 Protocolo experimental: efecto agudo de NBTI en la hiperlocomoción inducida por CocCaf.....	39
4. Evaluación de la reactividad microglial mediante inmunofluorescencia para Iba-1.....	40
4.1 Obtención y procesamiento de los tejidos.....	40
4.2 Detección de Iba-1 mediante inmunofluorescencia indirecta.....	41
4.3 Adquisición y análisis de imágenes.....	42
5. Evaluación de la concentración de citoquinas plasmáticas.....	43
5.1 Obtención de plasma.....	43
5.2 Determinación de la concentración de citoquinas mediante citometría de flujo.....	43

5.3 Adquisición y análisis de concentraciones de citoquinas.....	43
6. Análisis estadístico.....	46
RESULTADOS.....	47
1. Objetivo específico: estudio del efecto comportamental motor inducido por el tratamiento repetido de CocCaf y los procesos inflamatorios asociados.....	47
1.1 Evaluación de la inducción del desarrollo de la sensibilización locomotora mediante el tratamiento repetido con CocCaf utilizando el modelo CA.....	47
1.2 Determinación de la reactividad microglial en el núcleo accumbens mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Iba-1 como marcador de inflamación	52
2. Objetivo específico: estudio de la acción de CBD sobre el efecto comportamental motor inducido por el tratamiento repetido de CocCaf y los procesos inflamatorios asociados.....	54
2.1 Evaluación de la acción de CBD sobre la sensibilización locomotora inducida por el tratamiento repetido de CocCaf utilizando el modelo CA.....	54
2.2 Determinación de la acción de CBD sobre la reactividad microglial en el núcleo accumbens, mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Iba-1 como marcador de inflamación.....	60
2.3 Determinación de la acción de CBD sobre el efecto inducido por CocCaf sobre los niveles plasmáticos de citoquinas pro- y antiinflamatorias mediante el uso de citometría de flujo.....	62
3. Objetivo específico: estudio del papel de ENT1 en la acción de CBD mediante el uso de Nitrobenzylthioinosine (NBTI), un inhibidor selectivo de ENT1.....	64
3.1 Evaluación del efecto comportamental motor de NBTI mediante el modelo CA. Curva dosis-respuesta para la identificación de una dosis que no altere la actividad locomotora basal de los animales.....	64
3.2 Evaluación del efecto agudo de NBTI sobre la actividad locomotora inducidas por el tratamiento agudo de CocCaf mediante el modelo de CA.....	64
DISCUSIÓN.....	66
1. Sensibilización locomotora e inflamación inducidas por CocCaf (Objetivo 1).....	66
2. Efecto de CBD en la sensibilización locomotora y en marcadores inflamatorios (Objetivo 2).....	67
3. Implicancias del papel de ENT1 y dificultades con NBTI (Objetivo 3).....	70
4. Relevancia y limitaciones del estudio.....	71
CONCLUSIONES.....	73
PERSPECTIVAS.....	74
REFERENCIAS.....	75
FINANCIACIÓN.....	92

ABREVIATURAS

AEA: Anandamida

ANOVA: Análisis de Varianza

ATV: Área Tegmental Ventral

A2A: Receptor de Adenosina 2A

BHE: Barrera Hematoencefálica

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CA: Campo Abierto

CBD: Cannabidiol

CBN: Cannabinol

CB1: Receptor Cannabinoide Tipo 1

CB2: Receptor Cannabinoide Tipo 2

CocCaf: Combinación de cocaína y cafeína

CPF: Corteza prefrontal

CPP: Preferencia de Lugar Condicionado

CUD: Trastorno por Uso de Cocaína

CX3CL1: Quimioquina Fractalkina

CXCL10: Quimioquina Interferón Gamma-inducible

CXCL12: Quimioquina Estromal Derivada de Células 1

DAT: Transportador de Dopamina

D2: Receptor dopaminérgico D2

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEM: Error Estándar de la Media

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

ENT1/2: Transportador Equilibrativo de Nucleósidos Tipo 1 y 2

FAAH: Amida Hidrolasa de Ácidos Grasos

FDA: Food and Drug Administration

FSC: Dispersión Frontal

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GPR: Receptores acoplados a proteína G

IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

ICSS: Autoestimulación Intracraneal

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleuquina

LPS: Lipopolisacárido

MAGL: monoacilglicerol lipasa

MCP-1: Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1

NAcc: Núcleo Accumbens

NBTI: Nitrobenzylthioinosine

NF- κ B: Factor Nuclear Kappa B

NLRP3: Proteína 3 que contiene el dominio de pirina de la familia NLR

OLMOS: Medio de conservación de cortes cerebrales en inmunohistoquímica

PBC: Pasta Base de Cocaína

PBS: Solución Salina Bufferada con Fosfatos

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

PPAR- γ : Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas Gamma

PSUD: Trastorno por Uso de Sustancias Psicoestimulantes

SA-PE: Estreptavidina-Ficoeritrina

SDF-1: Factor Derivado de Células Estromales 1 (Stromal Cell-Derived Factor 1)

SeCB: Sistema Endocannabinoide

SNC: Sistema Nervioso Central

SSC: Dispersión Lateral (Side Scatter)

SUD: Trastorno por Uso de Sustancias

Tamb.: Temperatura ambiente

THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol

TLR4: Receptor Tipo Toll 4

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

TRP: Receptor de Potencial Transitorio

TSPO: Proteína Translocadora

ZT: Zeitgeber Time

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

5-HT1A: Receptor de serotonina de subtipo 1A

RESUMEN

Cannabidiol (CBD) es uno de los principales cannabinoides de la planta *Cannabis sativa*, sin acción psicomimética o reforzadora. Varios estudios preclínicos han reportado que CBD posee propiedades beneficiosas como antiepiléptico, antidepresivo y ansiolítico, antiinflamatorio y neuroprotector. Estas propiedades han despertado el interés en su uso médico en varios desórdenes neurológicos y neuropsiquiátricos entre las cuales se incluye el trastorno por uso de sustancias (*Substance Use Disorder, SUD*).

El SUD es un trastorno crónico caracterizado por la búsqueda compulsiva de drogas, pérdida de control sobre su consumo y la aparición de un síndrome de abstinencia cuando se ve impedido el consumo de la sustancia. Cocaína es una droga de abuso, psicoestimulante prototípica. Su prevalencia de consumo y sus efectos negativos son un problema de salud a nivel mundial. El desafío principal se encuentra en la búsqueda de estrategias eficaces para el tratamiento del desorden de uso de drogas psicoestimulantes. Desde hace varios años, en nuestro laboratorio trabajamos con una forma fumable de cocaína, la pasta base de cocaína (PBC). Reportamos que muestras de PBC incautadas en Uruguay, tenían un contenido variable de cocaína, y estaban adulteradas con cafeína. En modelos animales, demostramos que la presencia de cafeína potenciaba o aceleraba las acciones de cocaína, entre las cuales se encuentra el fenómeno de sensibilización locomotora. Existen reportes en la literatura que asocian este fenómeno inducido por cocaína con la aparición de procesos inflamatorios, sugiriendo que agentes antiinflamatorios podrían ser útiles en el tratamiento del SUD. De manera interesante, demostramos que CBD es capaz de atenuar la sensibilización locomotora inducida por la combinación de cocaína y cafeína (CocCaf) a las proporciones encontradas en las muestras de PBC. Quedaba pendiente avanzar en los mecanismos subyacentes.

En este trabajo de tesis hipotetizamos que: 1) la sensibilización locomotora inducida por la administración repetida de CocCaf se asocia a la aparición de procesos inflamatorios en regiones del circuito motivacional, y 2) CBD atenúa la sensibilización locomotora a través de su propiedad antiinflamatoria. Teniendo en cuenta que el bloqueo del transportador equilibrativo de nucleósidos de tipo 1 (ENT1) se relaciona con la propiedad antiinflamatoria de CBD evidenciada en modelos *in vitro* se comenzó a estudiar el papel de esta proteína en la acción de CBD. El objetivo general de este trabajo fue evaluar la capacidad de CBD de atenuar la sensibilización locomotora y los procesos inflamatorios asociados, a través de su propiedad antiinflamatoria, vía bloqueo de ENT1. Ratones machos adultos fueron co-tratados con CocCaf (5 y 2.5 mg/kg/i.p.) y CBD (20 mg/kg) o sus respectivos vehículos en un protocolo de sensibilización locomotora de 5 días. La actividad

locomotora fue evaluada cada día en un campo abierto durante 60 min, mediante el software de video seguimiento Ethovision XT17. Finalizado el experimento conductual, los animales fueron incluidos en dos grupos experimentales a los que se les realizó: 1) disección del cerebro para evaluar la reactividad microglial en el núcleo accumbens (NAcc) por inmunofluorescencia para Iba-1 en criocortes y microscopía confocal; 2) obtención de muestras de plasma, para posteriormente cuantificar citoquinas plasmáticas pro- y anti-inflamatorias mediante citometría de flujo. En un grupo independiente de animales, se caracterizó el efecto agudo de Nitrobenzylthioinosine (NBTI), un inhibidor selectivo de ENT1 (20-0.1 mg/kg/i.p.), a través de una curva dosis-respuesta. Posteriormente, se evaluó su capacidad de atenuar la hiperactividad aguda inducida por CocCaf.

Los resultados indicaron que los animales tratados con CocCaf desarrollaron la sensibilización locomotora. Dicho efecto se acompañó de un aumento en la inmunorreactividad para Iba-1, en las subregiones *core* y *shell* del NAcc, sin alterar el número de células positivas para Iba-1. Aunque CBD no atenuó, en términos generales, el desarrollo de la sensibilización locomotora, en un análisis específico se identificaron 3 grupos de animales en los que CBD parece atenuar, potenciar el efecto de CocCaf, o no inducir ningún efecto. No se evidenciaron cambios significativos en la señal Iba-1, ni en los niveles de citoquinas plasmáticas. Por otro lado, únicamente las dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg de NBTI no indujeron un efecto *per se*, aunque no bloquearon la hiperactividad locomotora inducida por el tratamiento agudo de CocCaf.

El conjunto de resultados presentados en esta tesis profundiza el estudio de los efectos inducidos por la combinación de cocaína y cafeína sobre el fenómeno de la sensibilización locomotora y los procesos inflamatorios asociados. Se destaca la importancia de estudiar más a fondo el efecto de CBD en ambos procesos, identificando la necesidad de realizar otros protocolos experimentales que contemplen mayor duración del tratamiento o aumento de dosis de CBD, o la inclusión de un periodo de abstinencia y la evaluación de CBD en la expresión de la sensibilización. Los hallazgos de esta tesis sientan las bases para estudios futuros que permitan comprender mejor el impacto de CBD en la neurobiología y tratamiento del SUD.

Presentación de Tesis

En la última década, la investigación sobre las propiedades terapéuticas de CBD ha aumentado significativamente, habiendo alcanzado su aplicación clínica para el tratamiento de ciertos tipos de epilepsias. Por otro lado, varias evidencias preclínicas, y algunas clínicas, han demostrado que CBD puede ser útil para el manejo de estrés postraumático, ansiedad y psicosis, y escasos estudios preclínicos disponibles sugieren o hipotetizan un papel prometedor de CBD en la farmacoterapia particularmente relacionados con el trastorno por consumo de cocaína (CUD) y otras drogas psicoestimulantes. Esta Tesis se basa en dicha hipótesis y se abordó mediante la evaluación de los efectos de CBD sobre el fenómeno de sensibilización comportamental y procesos inflamatorios inducidos por la combinación de cocaína y cafeína, un modelo realista que refleja el contenido químico de muestras incautadas en el Uruguay de una forma fumable de cocaína, la pasta base de cocaína. A su vez, esta tesis es parte de una serie de trabajos del laboratorio a través de los cuales continuamos aportando conocimiento original sobre la neurobiología asociada al CUD y su potenciación por cafeína, y avanzó en la exploración del potencial terapéutico de CBD en el tratamiento del CUD.

INTRODUCCIÓN

1. Reseña histórica del uso medicinal de *Cannabis sativa*

Cannabis sativa es una planta originaria de las regiones central y noroeste de Asia que ha sido utilizada por la humanidad durante milenios debido a su versatilidad, desempeñando roles destacados en contextos medicinales, recreativos e industriales (Elsohly y Slade, 2005; Fig. 1). Los registros más antiguos de sus aplicaciones medicinales se encuentran en tratados médicos y de farmacopea de la Antigua China (2737 a.E.C.), del Antiguo Egipto (1550 a.E.C.) y de la Antigua India (1500 a.E.C.), donde se documenta su uso para tratar síntomas de malaria, dolor, inflamación, glaucoma, ansiedad y afecciones respiratorias. Posteriormente, en el año 1025 E.C., se continúan encontrando nuevas referencias a sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias en los registros de la medicina islámica medieval (Hossain y Chae, 2024).



Figura 1: A) La antigua diosa egipcia Seshat (diosa de la sabiduría, el conocimiento, la escritura y la arquitectura) es representada posiblemente con una hoja de cannabis arriba de su cabeza (A; tomado de Bonini y cols. 2018). B) Plantación de cannabis en Uruguay bajo regulación de la Ley 19.172 (fotografía de 2024).

Hacia el siglo XIX, la medicina occidental comenzó a reconocer el potencial terapéutico de *C. sativa* (*Cannabis sativa*), en gran medida debido al avance en la caracterización de su composición química. Se han descubierto más de 500 compuestos, de los cuales aproximadamente 130 son cannabinoides, además de terpenoides, flavonoides y otros (Odieka y cols. 2022). De estos compuestos, especialmente los cannabinoides (también llamados *fitocannabinoides*) han sido propuestos como agentes terapéuticos para diversas patologías (Murillo-Rodríguez y cols. 2021). Los primeros cannabinoides aislados de la planta fueron cannabinoil (CBN) en 1899 y cannabidiol (CBD)

en 1940 (Elsohly y Slade, 2005). En 1964, Gaoni y Mechoulam identificaron a Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), compuesto que se describió como el principal responsable de los efectos psicotrópicos de *C. sativa* (Di Marzo, 2006), definidos por la aparición de ansiedad, paranoia, alteraciones perceptivas y déficits cognitivos (Howlett y cols. 2004).

La presencia de estos efectos psicotrópicos condujo a la instauración de restricciones legales durante gran parte del siglo XX, limitando el uso medicinal de *C. sativa*, a pesar de que tanto el acervo histórico como los avances científicos sugerían su potencial terapéutico (Hossain y Chae, 2024). Sin embargo, a principios de la década de 1990, el descubrimiento del sistema endocannabinoide (SeCB) (Devane y cols. 1992; Matsuda y cols. 1990), mediador de varias de las respuestas farmacológicas del cannabis y cannabinoides, marcó un punto de inflexión en la comprensión de sus mecanismos de acción y renovó el interés en su aplicación clínica (Di Marzo, 2006). Este interés se vio reforzado en 1996 tras la legalización del cannabis con fines medicinales en California, EE. UU. (Hossain y Chae, 2024). A su vez, el caso de Charlotte Figi, una niña con síndrome de Dravet que experimentó una reducción drástica de sus convulsiones epilépticas tras el tratamiento con una cepa rica en CBD, atrajo la atención de la comunidad científica sobre el potencial terapéutico del cannabis (Maa y Figi, 2014; Karimi-Haghighi y cols. 2022). Además, este suceso contribuyó al desarrollo de Epidiolex, un extracto de CBD purificado, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento de epilepsias resistentes, como los síndromes de Dravet y Lennox-Gastaut (Peng y cols. 2022). Estos avances representan algunos de los usos más consolidados de CBD en la práctica clínica actual.

En la siguiente sección se presentará a CBD como un potencial agente terapéutico de interés preclínico y clínico, abordando sus principales sitios de acción, tanto en el sistema SeCB como en otros objetivos moleculares, junto con las propiedades terapéuticas asociadas a dichos blancos en diversas neuropatologías y trastornos neuropsiquiátricos.

2. Cannabidiol (CBD): mecanismos de acción y potencial terapéutico

En las últimas décadas, CBD, junto a THC han sido los fitocannabinoides más investigados debido a su abundancia relativa en la planta, y sus propiedades farmacológicas únicas (Murillo-Rodríguez y cols. 2021). Aunque ambos comparten una estructura química similar, pequeñas variaciones en su configuración determinan las diferencias significativas en su actividad biológica (Martinez-Naya, 2024). Si bien, THC se ha investigado por su utilidad en el manejo del dolor, las náuseas y el aumento del apetito (Hossain y Chae, 2024), sus efectos psicotrópicos y reforzadores (Halbout y cols. 2023;

Orihuel y cols. 2021) han limitado su aplicación clínica, desviando el interés hacia fitocannabinoides que no presentan este efecto, como es el caso de CBD (Gonzalez-Cuevas y cols. 2021; Izzo, 2009).

Estudios preclínicos confirmaron que CBD no presenta potencial de abuso, ya que no induce preferencia por lugar condicionado, síntomas de abstinencia y no aumenta la auto-administración (Viudez-Martinez y cols. 2019). Además, estudios en humanos han demostrado que CBD es bien tolerado incluso en dosis elevadas (hasta 1,500 mg/día), sin afectar parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea o la temperatura corporal, y no altera funciones psicomotoras, ni psicológicas como la ansiedad (Machado Bergamaschi y cols. 2011).

El perfil seguro de CBD habilitó la investigación de su potencial terapéutico en diversas patologías, incluyendo trastornos inflamatorios, neurodegenerativos, psiquiátricos y del dolor crónico (Campos y cols. 2016; Fiani y cols. 2020; Rezende, 2023). Entre sus efectos fisiológicos se destacan sus propiedades ansiolíticas, neuroprotectoras, antioxidantes, antiinflamatorias, antieméticas y antipsicóticas, reportadas tanto en estudios preclínicos como en ensayos clínicos (Fiani y cols. 2020; Yndart Arias y cols. 2024). Estas características han posicionado a CBD como un compuesto de interés terapéutico en diversos contextos clínicos, lo cual promovió el estudio de sus mecanismos de acción.

2.1 CBD y sistema endocannabinoide

Para comprender los efectos de CBD es fundamental considerar su interacción con el SeCB, un sistema de señalización crucial en la regulación de varios procesos fisiológicos y patofisiológicos (Pacher y cols. 2006). El SeCB es un modulador esencial del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), implicado en la regulación de la liberación de neurotransmisores, la plasticidad sináptica y las respuestas inflamatorias (Solinas y cols. 2008; Marco y cols. 2011). Está compuesto principalmente por los receptores cannabinoides CB1 y CB2, los endocannabinoides anandamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG), y las enzimas responsables de su síntesis y degradación, como la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Izzo y cols. 2009; Castillo-Arellano y cols. 2023).

Los receptores cannabinoides de tipo 1 (CB1) y 2 (CB2) son proteínas acopladas a proteínas G, localizados en su mayoría en la membrana presináptica, que regulan la liberación de neurotransmisores en forma retrógrada (Fiani y cols. 2020). Los receptores CB1 se expresan predominantemente en el cerebro, modulando funciones como el estado de ánimo, la memoria y la percepción del dolor, mientras que los CB2 están principalmente

en células inmunitarias, microglía y algunas neuronas, desempeñando un papel clave en la neuroinflamación (Fiani y cols. 2020; Rezende, 2023).

A diferencia del compuesto THC, cuyo efecto psicotrópico se debe a su agonismo total sobre el receptor CB1 (McPartland y cols. 2007), CBD tiene una baja afinidad tanto por CB1 como por CB2, lo que contribuye a su perfil seguro y no psicotrópico (Lago-Fernández y cols. 2021). En el caso del receptor CB2, aunque su afinidad es reducida, CBD actúa como un modulador alostérico negativo o agonista parcial (Fig. 2), lo que puede influir en la migración de células inmunitarias y en la modulación de la inflamación (Lago-Fernández y cols. 2021; Pertwee, 1997).

En lugar de unirse eficazmente a los receptores CB1 y CB2, CBD modula su actividad de forma indirecta. Su acción incluye la inhibición de FAAH y MAGL, enzimas responsables de la degradación de AEA y 2-AG, respectivamente (Fig. 2; Echeverry y cols. 2021). Esto se traduce en un aumento de los niveles de estos endocannabinoides, modulando la señalización del SeCB y la interacción de estos con otros receptores, como el receptor de potencial transitorio vaniloide de tipo 1 (TRPV1) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ) (Di Marzo, 2008).

Investigaciones recientes han identificado que, además de CB1 y CB2, otros receptores acoplados a proteínas G, como GPR55, GPR3, GPR6, GPR12 y GPR19, también pueden interactuar con los cannabinoides lo que ha ampliado significativamente la comprensión del SeCB. Esto llevó a algunos autores, como Echeverry y cols. (2021; 2023) a incluir a GPR55 dentro del SeCB junto con CB1 y CB2, como se representa a la izquierda de la Fig. 2. Además, CBD interactúa con otros sistemas de señalización fuera del SeCB según autores como Echeverry y cols. (2012; 2023), como el receptor serotoninérgico 5-HT1A (representados a la derecha de la Fig. 2).

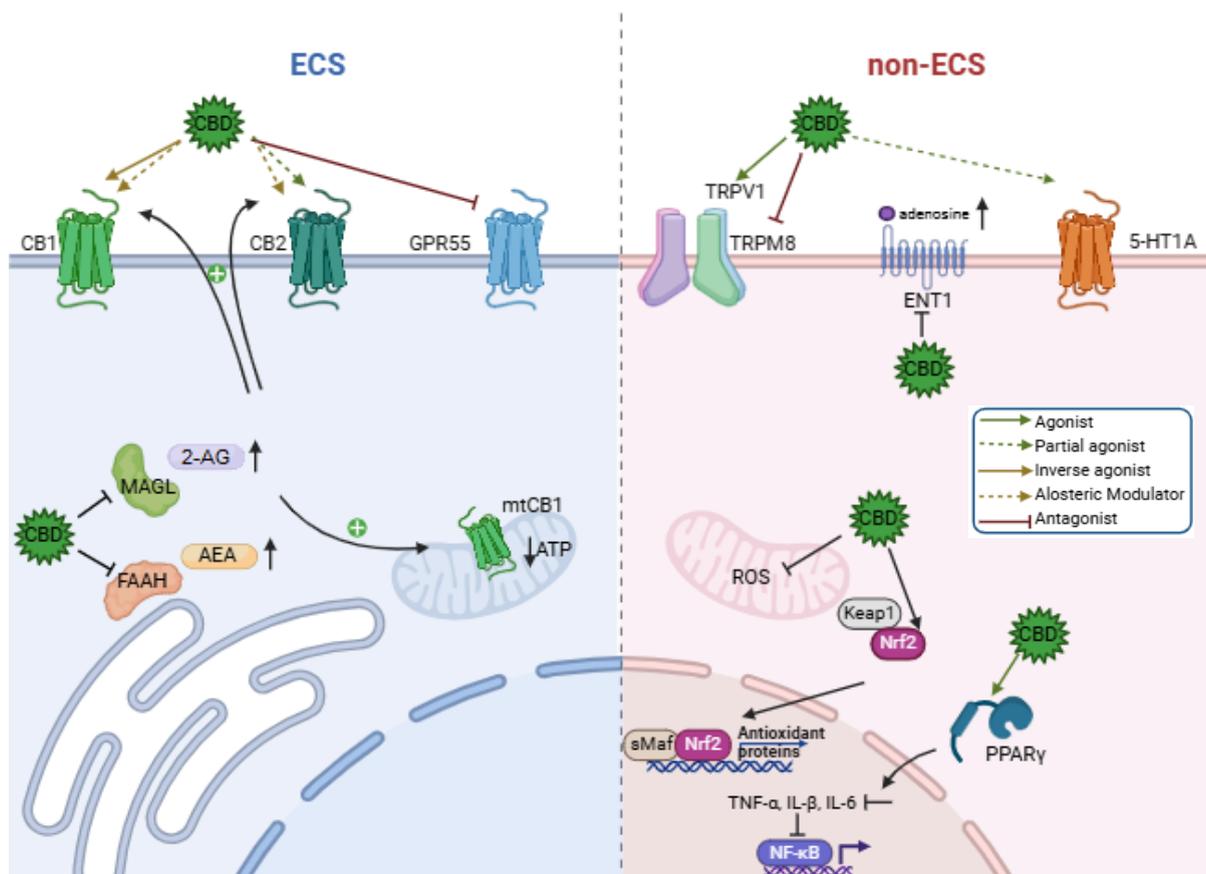


Figura 2: El esquema representa los principales sitios de acción de CBD mediados por el SeCB (izquierda) y los mecanismos no mediados por el SeCB (derecha) (tomado y modificado de Echeverry y cols. 2023).

Dado los múltiples sitios de acción con los que interaccionan los mediadores del SeCB más allá de los receptores cannabinoideos, se empleó el término “endocannabinoide” para incluir otros sistemas de señalización (Cristino y cols. 2020; Rezende, 2023). Este término se asocia al concepto de SeCB ampliado, en contraposición al SeCB clásico, el cual abarca una red extendida de mediadores relacionados, que incluye enzimas, proteínas y otras vías metabólicas que modulan su actividad y contribuyen a la homeostasis del organismo (Cristino y cols. 2020). Dentro de este SeCB ampliado, diversas moléculas endocannabinoideas y afines, incluso CBD, pueden interactuar con blancos moleculares adicionales, como GPR55, TRPV1 y PPAR γ (Schouten y cols. 2024).

La complejidad del SeCB ampliado representa tanto un desafío como una oportunidad para el desarrollo de fármacos selectivos, y en este contexto, el estudio de compuestos como CBD, ha demostrado un potencial terapéutico relevante para trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos (Cristino y cols. 2020). Esta perspectiva del SeCB ampliado favorece el fin de comprender los efectos de CBD en contextos neuropsiquiátricos

y neuroinflamatorios (Rezende, 2023; Solinas y cols. 2008; Vecchini-Rodríguez y cols. 2021; Cristino y cols. 2020) como en el que se enmarca esta tesis.

2.2 Potencial terapéutico de CBD en trastornos neurológicos y psiquiátricos, y sus blancos asociados

Estudios preclínicos han identificado más de 65 blancos moleculares de CBD en el SNC, incluidos los receptores cannabinoides CB1 y CB2, el receptor TRPV1 y el receptor 5-HT1A (Castillo-Arellano y cols. 2023; Ibeas Bih y cols. 2015; Izzo y cols. 2009). Esta versatilidad farmacológica ha generado un interés creciente en su potencial terapéutico para abordar condiciones como la epilepsia, la ansiedad, la depresión y el trastorno por uso de sustancias (SUD por *Substance Use Disorder*) (Kessler y cols. 2021; Chye y cols. 2019).

Dentro del SeCB clásico, en el SNC, los efectos de CBD sobre CB1 se asocian con la regulación de la ansiedad y el dolor neuropático, mientras que su modulación alostérica en CB2, predominantemente en células inmunes, está vinculado a efectos antiinflamatorios (Malvestio y cols. 2021; Pertwee, 2008).

Más allá del SeCB clásico, en el SeCB ampliado, CBD ejerce efectos analgésicos en modelos de dolor neuropático a través de la desensibilización de los canales de potencial transitorio (TRP), en particular TRPV1, TRPV2 y TRPA1 (Costa y cols. 2004; Muller y cols. 2019). Además, sus efectos antiinflamatorios han sido asociados con su acción como antagonista de GPR55 (Lin y cols. 2011), mientras que su capacidad para modular la inflamación y la neuroprotección se ha relacionado con su actividad como agonista parcial de PPAR γ (Esposito y cols. 2011). Asimismo, sus efectos ansiolíticos y antidepresivos están mediados por su acción agonista sobre el receptor 5-HT1A (Russo y cols. 2005), y sus propiedades anticonvulsivas y ansiolíticas han sido vinculadas con su modulación alostérica positiva de los receptores GABA-A (Bakas y cols. 2017).

El creciente cuerpo de evidencia preclínica y clínica sugiere que CBD podría ser una herramienta terapéutica prometedora para el manejo del SUD, particularmente debido a su capacidad para reducir la búsqueda compulsiva (*craving*), la impulsividad y la vulnerabilidad a la recaída (Gonzalez-Cuevas y cols. 2018; Chye y cols. 2019). En estudios clínicos, CBD ha mostrado efectos beneficiosos al reducir el consumo y la sintomatología de abstinencia en personas con adicción a cannabis y tabaco (Hindocha y cols. 2018; Freeman y cols. 2020), así como el *craving* y la ansiedad inducidos en pacientes con trastorno por consumo de heroína (Hurd y cols. 2019), lo que sugiere un posible rol en el tratamiento del SUD (Schouten y cols. 2024; Fiani y cols. 2020; Navarrete y cols. 2021a).

No obstante, la traslación de CBD al tratamiento clínico del SUD enfrenta desafíos importantes. En estudios preclínicos, la variabilidad en modelos experimentales y regímenes de dosificación limita la comparación de los hallazgos. En estudios clínicos, aún no se ha establecido una dosis óptima estandarizada, ya que los ensayos han utilizado rangos de dosificación muy amplios (por ejemplo, entre 200 mg y 800 mg/día). Además, la necesidad de ensayos clínicos controlados a gran escala representa otra barrera para su implementación terapéutica (Karimi-Haghighi y cols. 2022).

La próxima sección abordará los aspectos neurobiológicos del trastorno por uso de sustancias, SUD, con el objetivo de focalizar el potencial terapéutico de CBD en la adicción a psicoestimulantes.

3. Trastorno por uso de sustancias: enfoque en psicoestimulantes

El SUD constituye una de las principales preocupaciones en salud pública a nivel mundial (WHO, 2024). Es una patología crónica y multifactorial, caracterizada por la búsqueda compulsiva de la sustancia y un uso continuo a pesar de las consecuencias negativas, con cambios a largo plazo en el cerebro (American Psychiatric Association, 2013; Olsen, 2022). Clínicamente, el SUD implica un ciclo de tres etapas: (1) atracón/intoxicación, una persona consume y experimenta efectos gratificantes o placenteros, (2) abstinencia/afecto negativo, la etapa en la que el individuo sufre un estado emocional negativo, como anhedonia, ansiedad, irritabilidad y síntomas físicos en ausencia de la sustancia, (3) preocupación/anticipación en la que la persona busca la sustancia nuevamente después de un período de abstinencia (Koob, 1997; Koob, 2010; Everitt, 2014; Volkow y Blanco, 2023). Cada una de estas etapas están asociadas a cambios en regiones o circuitos específicos (Fig. 3).

Aunque las regiones cerebrales involucradas en el SUD están fuertemente interconectadas, se puede reconocer la participación de vías neuronales específicas para cada etapa. Además, cada etapa está asociada principalmente con características conductuales como la recompensa y la motivación, la persistencia para responder para evitar el estado emocional negativo y la compulsividad o pérdida de control, respectivamente (Maldonado y cols. 2021). La recompensa o motivación por las drogas se basa en la activación de la vía mesolímbica que involucra a las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el área tegmental ventral (ATV) y que se proyectan al núcleo accumbens (NAcc). Este circuito está involucrado críticamente en la conducta dirigida a objetivos ante reforzadores naturales (p. ej., comida, sexo, interacciones sociales), y media los efectos reforzadores y euforogénicos de cocaína (Kelley y Berridge, 2002; Nestler, 2005).

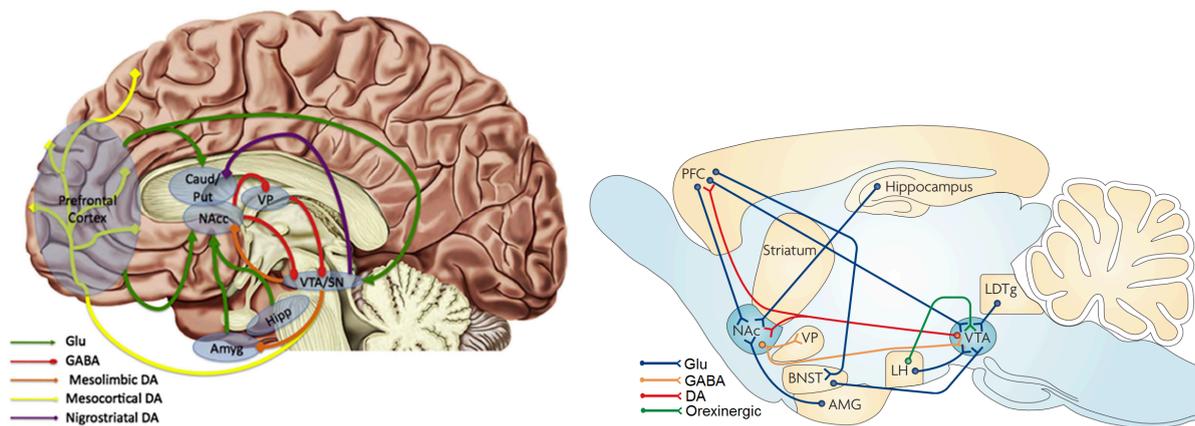


Figura 3: Esquema simplificado de las regiones y circuitos que subyacen a las etapas de la adicción a drogas de abuso, en el cerebro de humano (A) y rata (B). Se destaca el circuito mesocorticolímbico de recompensa conformado por NAcc, ATV y CPF. AMG, amígdala; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; LDTg, núcleo tegmental laterodorsal; LH, hipotálamo lateral; PFC, corteza prefrontal; VP, pálido ventral; VTA, área tegmental ventral (izquierda tomado de Dichter y cols. 2012; derecha tomado de Kauer y Malenka, 2007).

A medida que progresa el consumo de la sustancia, la motivación cambia del refuerzo positivo al refuerzo negativo. Durante la abstinencia, la reducción en la actividad del sistema de recompensa y la activación de circuitos del estrés, como la amígdala extendida, contribuyen a la persistencia del trastorno (Koob, 2010; Koob y Volkow, 2016). Posteriormente, en la etapa de preocupación/anticipación, la activación de la CPF, la amígdala basolateral y el hipocampo facilita la restauración del consumo ante estímulos asociados a la droga, lo que aumenta la vulnerabilidad a la recaída (Everitt y Robbins, 2005; Robinson y Berridge, 1993). Además, la disfunción en los circuitos de control ejecutivo compromete la inhibición de impulsos, favoreciendo la búsqueda compulsiva de la sustancia (Everitt y Robbins, 2016).

Este ciclo perpetúa el SUD, donde las modificaciones neurobiológicas dificultan la interrupción del consumo y explican la elevada tasa de recaídas, que alcanza hasta un 75 % de los casos (Andersson, 2019; Navarrete y cols. 2021a). Actualmente, aunque existen tratamientos farmacológicos aprobados para ciertos trastornos por uso de sustancias, como los opioides, las opciones para otras adicciones son limitadas y a menudo carecen de eficacia suficiente para prevenir la recaída sin efectos adversos significativos (Volkow y Blanco, 2023). Esta situación resalta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, incluyendo aquellas dirigidas a la modulación de procesos neuroinflamatorios.

Entre las sustancias que representan un desafío creciente para la salud pública se encuentran los psicoestimulantes de abuso, como la cocaína y las anfetaminas, debido a su

alta prevalencia y a las consecuencias neuropsiquiátricas asociadas, como la dependencia, la recaída y el deterioro cognitivo (Volkow y cols. 2011). Se trata de un grupo de drogas de abuso que incrementan la actividad del SNC, produciendo activación conductual, aumento del estado de alerta y de la actividad motora. Además de sus efectos sobre el SNC, estos compuestos también poseen una acción simpaticomimética, lo que resulta en una activación del SNP con respuestas como el aumento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la vasoconstricción (Koob y cols. 2020).

Dentro del espectro del SUD, el trastorno por uso de psicoestimulantes (PSUD) involucra el uso de sustancias como la cocaína y las anfetaminas, y se caracteriza por cambios persistentes en redes cerebrales relacionadas con la recompensa y el control de impulsos. Estas modificaciones favorecen el consumo compulsivo y la recaída incluso tras períodos prolongados de abstinencia (Volkow y Blanco, 2023). Entre estos cambios neuroadaptativos, particularmente en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, están vinculados a fenómenos como la sensibilización locomotora y procesos patológicos como la inflamación, que desempeñan un papel clave en la progresión del PSUD (Kalivas y O'Brien, 2008; LaVoie y cols. 2004; Thomas y cols. 2008).

3.1 Modelo de sensibilización locomotora inducida por psicoestimulantes

En el amplio espectro de fenómenos conocidos como sensibilización comportamental, la sensibilización locomotora es un modelo preclínico ampliamente utilizado para estudiar la neuroadaptación inducida por psicoestimulantes. Esta se define como un aumento progresivo y sostenido de la actividad locomotora tras exposiciones repetidas a una misma dosis de un compuesto psicoestimulante. Este fenómeno incluye una fase de desarrollo, que comprende cambios moleculares inmediatos, principalmente en neuronas dopaminérgicas del ATV, que inician la sensibilización. Posteriormente, tras un periodo de abstinencia, se manifiesta la fase de expresión, de tal manera que cuando el animal es re-expuesto a la droga, su actividad locomotora es significativamente mayor que la de los animales que reciben la droga por primera vez. Esta fase refleja las consecuencias a largo plazo de estos cambios y se asocia con una mayor liberación de dopamina en el NAcc y en el estriado dorsal (Kalivas y Stewart, 1991). La sensibilización locomotora se considera un modelo preclínico relevante para estudiar la neuroplasticidad asociada al PSUD, ya que refleja los cambios plásticos y duraderos producidos por psicoestimulantes en el circuito motivacional que subyacen a los comportamientos adictivos (Pierce, Kalivas, 1997; Robinson y Berridge, 1993).

Además de los cambios neuroplásticos en el circuito dopaminérgico, la sensibilización inducida por psicoestimulantes como la cocaína ha sido asociada con alteraciones en la inmunorreactividad periférica. Estas incluyen cambios en la proliferación de linfocitos y en la producción de citoquinas por esplenocitos, lo que sugiere una posible interacción entre las adaptaciones conductuales y el sistema inmune periférico (Kubera y cols. 2004).

4. Inflamación asociada al PSUD

La inflamación es una respuesta biológica compleja del sistema inmune frente a estímulos nocivos, como infecciones, lesiones o toxinas, caracterizada por la activación de células inmunes, la liberación de citoquinas proinflamatorias y cambios en la permeabilidad vascular (Medzhitov, 2008). En el SNC, este proceso se conoce como neuroinflamación e implica un estado reactivo de células gliales, la producción de mediadores inflamatorios (como citoquinas y quimioquinas) y la disrupción de la homeostasis neuronal, lo que puede contribuir a la disfunción sináptica y a procesos neurodegenerativos (Martínez-Tapiaa y cols. 2018; Shabab y cols. 2017).

Evidencia preclínica y clínica sugiere que la inflamación, tanto periférica como central, juega un papel clave en la progresión del PSUD (Lacagnina, 2017; Tortorelli, 2015). Se ha identificado que los consumidores crónicos de psicoestimulantes, como cocaína y metanfetamina, presentan niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en plasma y en regiones cerebrales, sugiriendo que la activación del sistema inmune podría estar implicada en la persistencia del trastorno y en la vulnerabilidad a la recaída (Clark y cols. 2013).

4.1 Inflamación sistémica inducida por PSUD

El impacto inflamatorio del consumo crónico de psicoestimulantes ha sido observado en humanos. Estudios clínicos han identificado que los consumidores crónicos de cocaína y metanfetamina presentan niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en sangre, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, lo que sugiere un estado de inflamación sistémica sostenida (Clark y cols. 2013; Moreira y cols. 2016; Stamatovich y cols. 2020). En esta línea, se ha encontrado una correlación entre niveles elevados de citoquinas plasmáticas y síntomas específicos asociados al PSUD. En consumidores de metanfetamina, los niveles de IL-6 se han correlacionado con síntomas cognitivos. En el caso de la cocaína, se ha observado una relación entre niveles elevados de IL-8 con la intensidad de los síntomas de abstinencia, y de IL-1 β con la gravedad del trastorno por consumo de esta droga (da Silva y cols. 2023). Araos y cols. (2014) también encontraron que consumidores de cocaína presentan

alteraciones en citoquinas plasmáticas y quimioquinas, con una correlación positiva entre la severidad del trastorno y niveles elevados de IL-1 β , CX3CL1 (fractalkina) y CXCL12 (SDF-1).

A nivel preclínico, se ha demostrado en modelos animales que la exposición a psicoestimulantes induce una activación periférica del sistema inmune, promoviendo un perfil proinflamatorio en plasma (Clark y cols. 2013). Kubera y cols. (2004) encontraron que la sensibilización locomotora inducida por cocaína en ratones se asocia con cambios en señales pro y antiinflamatorias en plasma, como por ejemplo, un aumento en la producción de IFN- γ y una disminución de IL-10, respectivamente, reflejando un desequilibrio inflamatorio sistémico. Además, Tortorelli y cols. (2015) demostraron que la administración de cocaína junto con un estímulo inflamatorio sistémico, inducido por lipopolisacárido (LPS), potencia la sensibilización locomotora, sugiriendo que la activación periférica del sistema inmune puede influir en la neuroplasticidad inducida por cocaína. Otros estudios preclínicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la cocaína y la metanfetamina pueden afectar la barrera hematoencefálica (BHE), facilitando la comunicación entre inflamación sistémica y neuroinflamación. En particular, se ha reportado que la cocaína activa la vía de señalización c-*Src* kinase/NF- κ B en pericitos de la BHE, promoviendo la secreción de la quimioquina CXCL10 (involucrada en la inflamación de la BHE), lo que contribuye a la alteración de la integridad de la BHE (Niu y cols. 2019; Sil y cols. 2018).

En su conjunto, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la inflamación sistémica podría ser un biomarcador del PSUD, además de contribuir a la persistencia del trastorno. En línea con estos hallazgos, se ha reportado que niveles elevados de IL-6 periférica en consumidores de metanfetamina se correlacionan con alteraciones en la conectividad funcional entre el NAcc, la amígdala y el hipocampo, lo que sugiere que la inflamación sistémica podría contribuir a la disfunción neurocognitiva observada en el PSUD (Kohno y cols. 2018).

4.2 Neuroinflamación en el SNC inducida por PSUD

La inflamación sistémica y la neuroinflamación inducidas por psicoestimulantes están estrechamente relacionadas, promoviendo un estado reactivo de células gliales, lo cual impacta en la plasticidad neuronal (Ahearn y cols. 2021).

En humanos, estudios de neuroimagen funcional han arrojado evidencia mixta respecto a la activación microglial inducida por psicoestimulantes. En consumidores crónicos de metanfetamina, estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) revelaron un aumento marcado de la activación microglial en el estriado, la corteza

orbitofrontal, la ínsula, el mesencéfalo y el tálamo, incluso tras períodos prolongados de abstinencia, indicando un estado neuroinflamatorio sostenido (Sekine y cols., 2008). Sin embargo, la evidencia sobre cocaína es menos consistente que la de metanfetamina. Mientras que estudios *post mortem* han reportado un aumento en la reactividad microglial en el cerebro de usuarios de cocaína, estudios PET no han encontrado diferencias significativas en los niveles de la proteína translocadora TSPO, una proteína altamente expresada en microglías y astrocitos y considerada un biomarcador de neuroinflamación. Se ha propuesto que estas discrepancias podrían explicarse por variaciones en los patrones de consumo, el tiempo de abstinencia y la presencia de policonsumo (Kohno y cols. 2019; Narendran y cols., 2014).

Por su parte, Lewitus y cols. (2016) reportaron que la administración repetida de cocaína en ratones provoca un aumento en la reactividad microglial en el NAcc, acompañado de una mayor producción de TNF- α , un mediador inflamatorio que modula la plasticidad sináptica en el PSUD. Por otro lado, Muñiz y cols. (2016) encontraron que la exposición crónica a cocaína y cafeína (un psicoestimulante legal, ampliamente consumido y de bajo poder reforzador) induce astrogliosis en el estriado dorsal, lo que sugiere un estado neuroinflamatorio sostenido (Daly y Fredholm, 1998; Fredholm y cols. 1999).

Otras evidencias utilizando modelos animales han identificado que la cocaína activa el inflammasoma NLRP3 (complejo proteico que responde al estrés celular y contribuye a la inflamación) en microglía, promoviendo la liberación de IL-1 β e IL-18, citoquinas clave en la respuesta neuroinflamatoria (Chivero y cols. 2021). Además, la activación del receptor TLR4 (receptor de reconocimiento de patrones expresado en microglía, que responde a moléculas asociadas a daño celular, patógenos y compuestos exógenos) ha sido implicada en este proceso, ya que su inhibición reduce la expresión de IL-1 β , sugiriendo una interconexión entre TLR4 y NLRP3 en la neuroinflamación inducida por cocaína (Chivero y cols. 2021). Por otro lado, Northcutt y cols. (2015) encontraron que la administración sistémica de cocaína aumenta la expresión del ARN mensajero (ARNm) de IL-1 β en el ATV y contribuye a un aumento de dopamina en el NAcc, un efecto que puede ser bloqueado mediante la administración sistémica de un antagonista del receptor TLR4, como (+)-naloxona. Este efecto redujo la auto-administración de cocaína en modelos animales, por lo que estos hallazgos sugieren que los fármacos dirigidos a TLR4 podrían representar una nueva estrategia terapéutica para el PSUD (Northcutt y cols. 2015). Adicionalmente, se ha propuesto que la activación de TLR4 podría contribuir a la disrupción de la BHE inducida por cocaína, facilitando la infiltración de células inmunes en el SNC y amplificando la neuroinflamación (da Silva y cols. 2023). Estos hallazgos sugieren que los fármacos

dirigidos a reducir la inducción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo vía TLR4, podrían representar una nueva estrategia terapéutica para el PSUD (Northcutt y cols. 2015).

Basándose en estudios previos sobre los efectos neuroinflamatorios de la cocaína, Harricharan y cols. (2017) ilustraron la relación entre la exposición repetida a cocaína, la activación microglial y la producción de citoquinas, evidenciando su contribución a un estado neuroinflamatorio y a la disfunción de circuitos implicados en la adicción (Fig. 4).

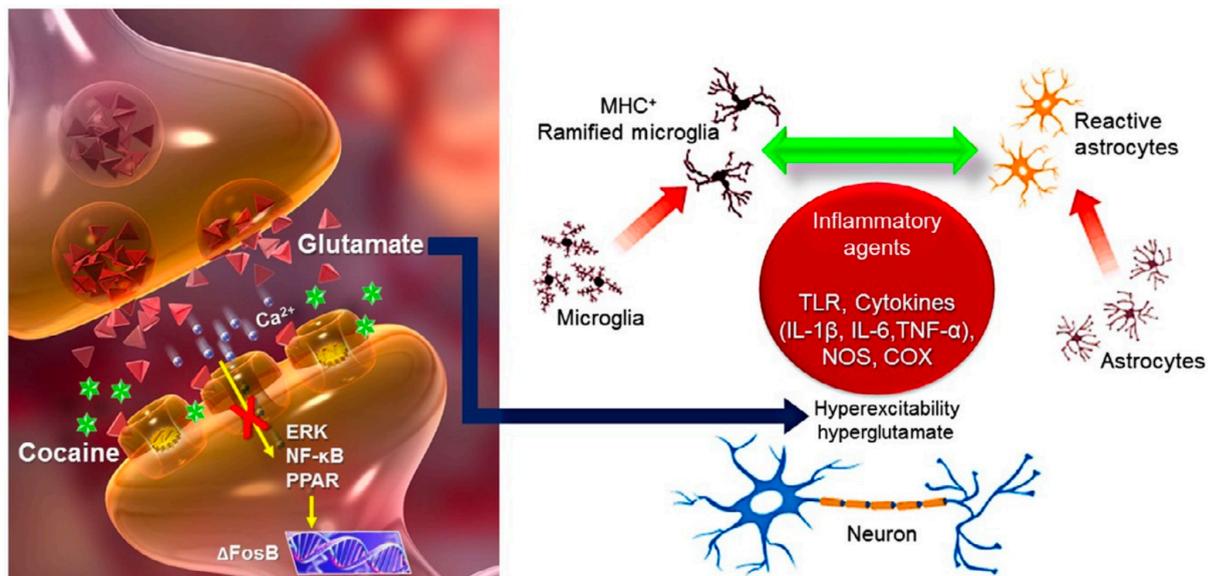


Figura 4: Representación esquemática de la activación glial inducida por cocaína. La exposición repetida a cocaína induce una liberación extracelular de glutamato, lo que contribuye a la activación microglial y la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6). Estos procesos generan un estado neuroinflamatorio que impacta la plasticidad neuronal y puede estar vinculado con la inducción del factor de transcripción Δ FosB, un factor clave en la neuroadaptación a psicoestimulantes (tomada de Harricharan y cols. 2017).

Dado que la neuroinflamación y la activación del sistema inmune juegan un papel clave en la progresión del PSUD, su modulación ha sido propuesta como una estrategia terapéutica prometedora (Clark y cols. 2013). Sin embargo, actualmente no existen tratamientos farmacológicos efectivos para la adicción a psicoestimulantes (Ronsley y cols. 2020).

En este contexto, CBD ha surgido como un candidato prometedor debido a su propiedad antiinflamatoria y su potencial para modular la activación glial y la producción de citoquinas proinflamatorias (Dos-Santos-Pereira y cols. 2019; Navarrete y cols. 2021a). Sin embargo, los estudios sobre su eficacia en el contexto del PSUD son contradictorios, lo que resalta la necesidad de investigaciones adicionales para determinar su potencial terapéutico en este trastorno.

5. Potencial terapéutico de CBD en el trastorno por uso de sustancias psicoestimulantes (PSUD)

CBD ha emergido como un agente terapéutico prometedor en el tratamiento del PSUD gracias a su perfil seguro y a sus efectos neuroprotectores, ansiolíticos y antiinflamatorios, al interactuar con múltiples blancos moleculares y modular procesos neurobiológicos clave relacionados con la adicción (Calpe-López y cols. 2019; Chye y cols. 2019; Navarrete y cols. 2021a). Su capacidad para interactuar con múltiples sistemas neuroquímicos sugiere un potencial terapéutico amplio que podría contribuir a la reducción del craving, la prevención de recaídas y la atenuación de la sensibilización comportamental inducida por psicoestimulantes (Kessler y cols. 2021).

5.1 Efectos conductuales de CBD en el PSUD

Estudios en humanos han reportado que CBD reduce el craving y la ansiedad inducidos por señales asociadas al consumo de heroína, lo que refuerza su potencial para modular procesos implicados en contexto de adicciones, incluyendo potencialmente al PSUD (Hurd y cols. 2019). Sin embargo, se requieren más estudios sobre su efecto beneficioso en consumidores de psicoestimulantes para confirmar el potencial terapéutico en PSUD.

Estudios preclínicos evaluaron los efectos de CBD en las conductas desencadenadas por drogas psicoestimulantes, como la cocaína y la anfetamina. Los resultados han demostrado que CBD reduce la autoadministración de las drogas, la preferencia condicionada por el lugar (CPP) y la restauración del comportamiento de búsqueda de drogas, lo que sugiere su potencial para disminuir el craving y prevenir recaídas al inhibir la consolidación de recuerdos relacionados con la droga, facilitando la extinción de memorias asociadas a su acción recompensante (Galaj y cols. 2020; González-Cuevas y cols. 2018; Luján y cols. 2018; Parker y cols. 2004). Además, se ha observado que el pretratamiento con CBD disminuye la sensibilización comportamental inducida por la cocaína, un fenómeno vinculado a la plasticidad sináptica y a la vulnerabilidad a la recaída (Galaj y cols. 2020).

Estos efectos conductuales están mediados, al menos en parte, por la acción de CBD sobre diferentes sistemas neuroquímicos, como el dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, endocannabinoide entre otros. Un resumen de estos mecanismos puede verse en la Fig. 5. Se ha observado que CBD atenúa la señalización dopaminérgica inducida por cocaína y anfetaminas en ratas, reduciendo la liberación de dopamina en NAcc

y CPF, lo que sugiere una modulación de los circuitos de recompensa, la motivación y el aprendizaje (Renard y cols. 2016; Galaj y cols. 2020). Además, se ha reportado que CBD regula la expresión del transportador de dopamina (DAT), lo que podría contribuir a la reducción de la acumulación de dopamina extracelular inducida por psicoestimulantes y a una menor hiperactivación del sistema mesocorticolímbico (Gasparyan y cols. 2020). Se ha descrito que CBD actúa como agonista del receptor PPAR- γ , el cual ha sido identificado en regiones cerebrales clave en la adicción, como el ATV (Melis y cols. 2010; Moreno y cols. 2004). La activación de PPAR- γ ha sido propuesta como una estrategia terapéutica en el tratamiento de la adicción, y se ha reportado que su estimulación con otros agonistas atenúa la sensibilización inducida por metanfetamina y cocaína en modelos preclínicos (Maeda y cols. 2007; Miller y cols., 2018). En este contexto, CBD, como modulador de PPAR- γ (Jadoon y cols. 2016), podría desempeñar un papel en la regulación de la plasticidad dopaminérgica inducida por psicoestimulantes, aunque se requieren más estudios para confirmar su relevancia específica en el PSUD (Karimi-Haghighi y cols. 2022). A su vez, el receptor CB2, tradicionalmente asociado al sistema inmunológico, también ha sido identificado en el sistema mesolímbico y parece desempeñar un papel regulador en la actividad dopaminérgica (Laksmidewi y Soejitno, 2021). Se ha encontrado que el bloqueo farmacológico del CB2 en ratas anula los efectos CBD sobre la autoadministración de cocaína, lo que sugiere que CBD podría actuar en parte como un agonista funcional del CB2 para modular la adicción (Navarrete y cols. 2021b).

Otro sistema relevante en la modulación del PSUD por CBD es el serotoninérgico. Se ha encontrado que el receptor 5-HT_{1A}, juega un papel clave en el desarrollo y mantenimiento del SUD a través de la regulación del estado de ánimo, la ansiedad y la impulsividad (Navarrete y cols. 2021a). Esto ha sido revisado recientemente por Castillo-Arellano y cols. (2023), quienes discutieron que la implicancia del receptor 5-HT_{1A} en los efectos antiadictivos de CBD es la única que se ha demostrado desde un enfoque farmacológico. En el contexto del PSUD, estudios preclínicos han demostrado que el bloqueo selectivo de este receptor revierte los efectos de CBD sobre la autoadministración de cocaína y la modulación del efecto de recompensa (Galaj y cols. 2020). Además, en otros modelos de adicción, como opioides y alcohol, el receptor 5-HT_{1A} también ha sido implicado en los efectos de CBD. En estos modelos, el bloqueo del receptor 5-HT_{1A} previno los efectos de CBD sobre la modulación del refuerzo inducido por morfina en la autoestimulación intracraneal (ICSS) (Katsidoni y cols. 2013) y en la reducción de la autoadministración de etanol (Viudez-Martínez y cols. 2018). Además de su acción sobre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, CBD influye en la plasticidad glutamatérgica y la neurogénesis, mecanismos clave en la consolidación de memorias adictivas y la

vulnerabilidad a la recaída. En un modelo preclínico de autoadministración de cocaína, se ha demostrado que CBD reduce la ingesta voluntaria de cocaína y aumenta la neurogénesis en el hipocampo, específicamente incrementando la proliferación de células progenitoras neuronales y la expresión del receptor CB1 en esta región (Luján y cols. 2018). Estos efectos sugieren que CBD puede interferir en la consolidación de memorias asociadas al consumo de cocaína, promoviendo la flexibilidad cognitiva y facilitando el desaprendizaje de asociaciones condicionadas con la droga.

Por último, el receptor TRPV1 también ha sido implicado en los efectos de CBD sobre el PSUD. Se ha reportado que el bloqueo de TRPV1 con un antagonista selectivo previene los efectos de CBD sobre la autoadministración de cocaína, lo que sugiere que la activación de este receptor contribuye a la modulación de la recompensa y el comportamiento de búsqueda de drogas (Iannotti y cols. 2014; Galaj y cols. 2020). Además, se ha propuesto que CBD podría influir en los niveles de glutamato y GABA a través de la activación de TRPV1, aunque el mecanismo exacto sigue en estudio (Batalla y cols. 2021).

Si bien todos estos estudios aportan evidencia relevante sobre los efectos de CBD en el PSUD así como sus sitios de acción, escasos estudios han explorado su acción comportamental en modelos animales *in vivo* con cocaína y que medien el sistema adenosinérgico. Es importante tener en cuenta que los mismos han sido realizados en modelos que no consideran la presencia de adulterantes activos, como la cafeína, que interfiere con el sistema adenosinérgico a través del antagonismo de los receptores A1 y A2A (Ferré, 2016; Gorská y Gołembiowska, 2015). Esto resalta la necesidad de continuar explorando otros blancos moleculares que puedan mediar los efectos de CBD en el PSUD.

5.2 Propiedad antiinflamatoria de CBD en modelos experimentales de PSUD

Dado que CBD se ha destacado por su potente acción antiinflamatoria, esta podría ser clave para su eficacia en el manejo del PSUD, al reducir la sensibilización comportamental y mitigar los efectos inflamatorios relacionados (Calpe-López y cols. 2019; Navarrete y cols. 2021a; Pavlovsky y cols. 2022). CBD ha demostrado propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias en el SNC, promoviendo la neurogénesis y reduciendo la inflamación cerebral en diferentes modelos experimentales (Peng y cols. 2022; Schouten y cols. 2024). Otros estudios preclínicos han evidenciado que CBD atenúa déficits cognitivos inducidos por metanfetamina y reduce la neuroinflamación en el hipocampo (Razavi y cols. 2020).

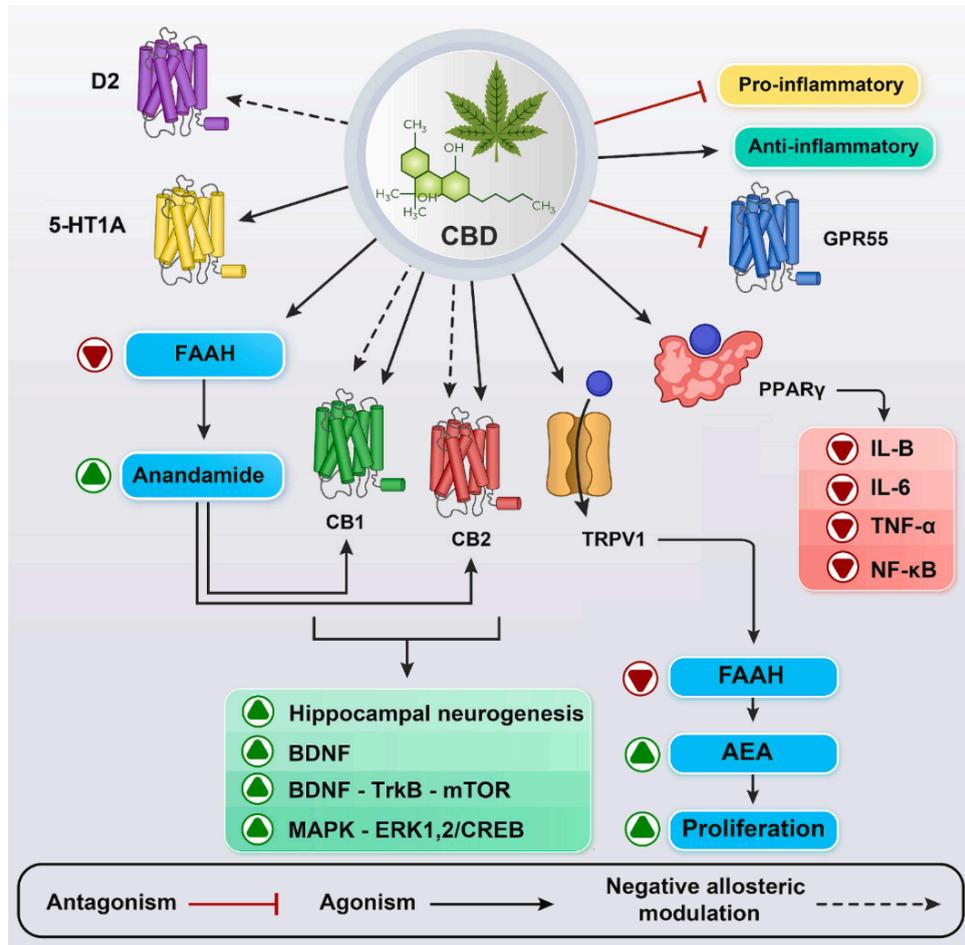


Figura 5: Mecanismos neuroquímicos propuestos para CBD en el contexto del SUD. La imagen ilustra la interacción de CBD con distintos sistemas neurobiológicos, incluyendo el sistema endocannabinoide, dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico y TRPV1, entre otros. Además, se muestra su papel en la promoción de procesos antiinflamatorios y la atenuación de respuestas neuroinflamatorias. Adaptado de Karimi-Haghighi y cols. (2022).

Estudios preclínicos han evidenciado que CBD regula la respuesta inflamatoria inducida por psicoestimulantes. En un modelo de exposición a metanfetamina en ratas, el tratamiento con CBD normalizó el aumento en la expresión génica de IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α en la corteza prefrontal e hipocampo de ratas (Karimi-Haghighi y Haghparast, 2019). Otro estudio demostró que CBD redujo la reactividad microglial inducida por la abstinencia de nicotina en ratones (Saravia y cols. 2019). Estos efectos sugieren que CBD podría desempeñar un papel neuroprotector al limitar la cascada inflamatoria desencadenada por la exposición a psicoestimulantes. Se ha planteado que estos efectos podrían depender, en parte, de la capacidad de CBD para reducir la recaptación de AEA y aumentar el tono endocannabinoide, así como de su acción moduladora en receptores TRPV1 y 5-HT1A (Navarrete y cols. 2021a).

Además de estos mecanismos, Carrier y cols. (2006) han propuesto que CBD ejerce parte de su acción antiinflamatoria a través de su acción sobre el transportador equilibrativo

de nucleósidos tipo 1 (ENT1), proteína que regula la recaptación extracelular de adenosina, un neuromodulador con propiedades antiinflamatorias bien establecidas (Cronstein, 1994). Utilizando modelos *in vitro* de microglía y macrófagos, demostraron que la inhibición de ENT1 por CBD incrementó la disponibilidad extracelular de adenosina, facilitando la activación de los receptores A2A y promoviendo la supresión de la liberación de citoquinas proinflamatorias. En el mismo estudio, estos hallazgos fueron confirmados en un modelo *in vivo* de inflamación sistémica inducida por LPS en ratones, donde CBD también promovió una mayor señalización adenosinérgica a través del bloqueo de la recaptación de adenosina, reduciendo la inflamación periférica (Carrier y cols. 2006). De manera similar, en un modelo *in vivo* de inflamación retiniana inducida por LPS, se ha reportado que CBD redujo la reactividad microglial a través de este mismo mecanismo, sugiriendo un posible papel neuroprotector (Liou y cols. 2008). Este estudio también demostró que la inhibición de ENT1 por CBD aumentó la biodisponibilidad de adenosina en la retina, lo que facilitó la activación de A2A y suprimió la producción de TNF- α , un mediador clave de la neuroinflamación. Sin embargo, aún no se ha estudiado si este mecanismo opera en el contexto del PSUD, lo que representa una brecha en el conocimiento que requiere mayor investigación.

Los receptores A2A han sido ampliamente estudiados en el contexto de la adicción a psicoestimulantes, debido a su capacidad para modular la neurotransmisión dopaminérgica a través de su interacción con los receptores D2 en el NAcc (Ballesteros-Yáñez y cols. 2018). La activación de A2A en esta región se ha asociado con la reducción de la excitabilidad neuronal y la inhibición de la neurotransmisión dopaminérgica, lo que podría contrarrestar la hiperactivación del sistema mesocorticolímbico inducida por psicoestimulantes como la cocaína y las anfetaminas (Ferre y cols. 2018). Adicionalmente, la activación de A2A en interneuronas glutamatérgicas podría desempeñar un papel en la regulación de la plasticidad sináptica alterada por la exposición repetida a psicoestimulantes, favoreciendo mecanismos de control homeostático en los circuitos de recompensa (Orrú y cols. 2011). Si bien está reportado que la activación de A2A está involucrada en la reducción de la sensibilización locomotora inducida por cocaína (Filip y cols. 2006), aún no se ha estudiado en profundidad si estos efectos dependen de la modulación de ENT1, lo que representa una brecha en el conocimiento que requiere mayor investigación.

6. Antecedentes de trabajo

6.1 Formas de consumo de cocaína: composición y efectos de la pasta base de cocaína (PBC)

Este trabajo de tesis se enmarca en el estudio de los efectos neurobiológicos inducidos por una droga de abuso denominada pasta base de cocaína (PBC). Al igual que el crack, PBC es una forma fumable de cocaína, ya que se consume a través de la vía inhalación pulmonar (Hatsukami, 1996). Su origen es vegetal y, a diferencia del crack, la PBC es uno de los productos intermedios obtenidos durante las fases iniciales de la extracción y purificación del clorhidrato de cocaína, considerándose una droga psicoestimulante de baja pureza (Castaño, 2000). A diferencia del clorhidrato de cocaína, su uso crónico resulta en un desarrollo más rápido de la adicción, altas tasas de recaída y un deterioro psicofísico severo, que impacta negativamente en la salud del consumidor y su entorno social (Pascale y cols. 2010; Triaca y cols. 2009). Esta vía de administración genera un efecto inmediato y transitorio, lo que se asocia con un alto poder de refuerzo y una mayor probabilidad de desarrollar dependencia en comparación con otras vías de administración, como la intranasal (Strang y cols. 1998; Samaha y Robinson, 2005). Si bien está demostrado que la vía de administración es un factor que explica el poder adictivo de la cocaína fumable, la composición química también es un factor a tener en cuenta. Resultados de nuestro grupo han determinado que la cafeína es un adulterante frecuente en muestras de PBC incautadas en Uruguay y que influye significativamente en las propiedades adictivas de cocaína (Abin-Carriquiry y cols. 2018; López-Hill y cols. 2011; Prieto y cols. 2015, 2016, 2020).

6.2 Rol de la cafeína, como adulterante, en la potenciación de los efectos de la PBC

La presencia de cafeína como adulterante frecuente de PBC captó el interés de nuestro grupo de investigación para estudiar su capacidad como potenciador de los efectos farmacológicos de cocaína (Galvalisi y cols. 2017; López-Hill y cols. 2011; Muñiz y cols. 2016; Scorza y cols. 2022). Su principal mecanismo de acción en el SNC es el antagonismo sobre los receptores de adenosina A1 y A2 (Ferré, 2016). Cuando está presente como adulterante en la PBC, diversos resultados han demostrado que actúa como un potenciador de los efectos estimulantes de cocaína (López-Hill y cols. 2011). Utilizando dosis de cocaína y cafeína que refleja la proporción más representativa en las muestras de PBC incautadas (2:1), animales fueron inyectados en forma sistémica aguda con la combinación de cocaína y cafeína a dosis de 5 y 2.5 mg/kg, respectivamente (CocCaf). Se observó que la presencia

de cafeína potenció la activación locomotora inducida por cocaína, generando un efecto estimulante superior al de la cocaína sola. Además, se observó un incremento significativo en la actividad locomotora en animales tratados con PBC adulteradas, con diferentes cantidades de cafeína, confirmando que cafeína intensifica los efectos producidos por PBC (López-Hill y cols. 2011; Scorza y cols. 2023). A su vez, hemos demostrado que cafeína no solo potencia la respuesta conductual a la cocaína, sino que también modula la expresión de genes asociados a la plasticidad sináptica en el núcleo accumbens, favoreciendo adaptaciones neurobiológicas que podrían contribuir a la dependencia (Prieto y cols. 2020a).

En otro estudio, evaluamos el efecto de la cafeína en la sensibilización locomotora inducida por la cocaína en ratas (Prieto y cols. 2015). Administrando de forma repetida dos dosis de cocaína, 10 y 5 mg/kg, i.p., combinadas respectivamente con cafeína (2.5 mg/kg, i.p.), se observó el desarrollo y expresión de la sensibilización locomotora, la que no fue inducida por la administración de cocaína sola a la misma dosis. Estos hallazgos sugieren que cafeína colabora con la inducción de los cambios neuroplásticos que llevan al desarrollo y expresión de la sensibilización locomotora inducida por cocaína y podría desempeñar un papel clave en la rápida dependencia observada en los consumidores de PBC.

En línea con estos hallazgos, en otro estudio, a través de un modelo de autoadministración intravenosa en ratas, también demostramos que la presencia de cafeína es capaz de modular el refuerzo y la motivación inducidos por la cocaína (Prieto y cols. 2016). Se encontró que la combinación de CocCaf aumentó significativamente la motivación por la droga, evidenciado por un "breaking point" más alto en el esquema de razón progresiva en comparación con la cocaína sola. Además, aunque la cafeína no mantuvo la autoadministración por sí sola, sí prolongó la búsqueda de droga en la fase de extinción, sugiriendo que puede actuar como un estímulo asociado a la recompensa de la cocaína. Estos resultados refuerzan la idea de que la cafeína es un adulterante activo (Evrard y cols. 2010) sino que potencia el refuerzo y la motivación por la cocaína, lo que sugiere que su presencia podría contribuir a la alta dependencia observada en consumidores de PBC (Prieto y cols. 2016).

La estrategia terapéutica actual para los usuarios de PBC es poco específica y se centra principalmente en el tratamiento de los síntomas, como la agitación y la ansiedad (Barrenechea y cols. 2007). Esto resalta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan un abordaje más eficaz para esta población.

6.3 Potencial terapéutico de CBD como tratamiento para el consumo de PBC

El uso de CBD con fines terapéuticos ha aumentado rápidamente luego de la regulación de varios mercados de cannabis en el mundo (Brown y Winterstein, 2019). En este sentido, en los últimos 10 años, ha habido un gran aumento en los reportes sobre el estudio de los efectos de CBD asociados a distintas patologías incluyendo el SUD (González-Cuevas y cols. 2023), consecuente con la necesidad de contar con evidencia sólida y consistente para poder apoyar ensayos clínicos, y eventualmente su aplicabilidad terapéutica en SUD.

En Uruguay, la ley de regulación del mercado de cannabis promulgada en 2014, se generó con el fin de contribuir en el control del mercado ilícito de cannabis, y también de promover la investigación en cannabis y cannabinoides, facilitando el estudio de compuestos como CBD y su potencial terapéutico en diversas patologías, incluyendo SUD.

Si bien se han realizado estudios sobre el papel de CBD en la adicción a la cocaína, estos no han considerado el impacto de los adulterantes presentes en la PBC. En particular, dado que la cafeína puede potenciar los efectos neuroquímicos y conductuales de la cocaína, su presencia en muestras de PBC podría influir en la eficacia de CBD como posible estrategia terapéutica. Esto resalta la necesidad de estudios que evalúen cómo CBD interactúa con la combinación de cocaína y cafeína, un factor aún poco explorado en la literatura. En consecuencia, la investigación sobre los efectos de CBD en modelos animales expuestos a la combinación de cocaína y cafeína sigue siendo limitada.

Interesados en estudiar el potencial efecto terapéutico de CBD para el PSUD, en particular al inducido por PBC, recientemente hemos demostrado que el co-tratamiento con CBD (20 mg/kg, i.p.) en ratas previene la expresión de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf (5 y 2.5 mg/kg, i.p.) y recuperó los cambios metabólicos en el CPF medial y el NAcc, (Prieto y cols. 2020b). Estos hallazgos reforzaron el concepto del potencial terapéutico de CBD para el tratamiento del uso problemático de PBC, aunque el mecanismo subyacente aún no ha sido completamente elucidado.

6.4 Mecanismo de acción de CBD: inhibición del transportador de adenosina y la relación con su propiedad antiinflamatoria

Los niveles intra- o extracelulares de adenosina son controlados por su síntesis, enzimas de degradación y por la acción bidireccional de los transportadores ENT1/2 (Gray y cols. 2004). Los receptores de adenosina A1 y A2A, acoplados a proteína G, median los efectos inhibitorios y excitatorios, respectivamente. Ambos receptores están expresados en

regiones del SNC vinculadas al control motor (estriado dorsal) y los efectos reforzadores (NAcc) de drogas de abuso (Ferré y cols. 1997; Lopes y cols. 2011). Los receptores A2A juegan un rol relevante en la regulación de la señalización dopaminérgica, influyendo en los procesos reforzadores de drogas psicoestimulantes (Ferré y cols. 2016). De hecho, la activación de receptores A2A bloquea la sensibilización motora (Pierce, Kalivas, 1997), sugiriendo un potencial terapéutico para los agonistas de receptores A2A en el tratamiento del SUD asociado a cocaína (Filip y cols. 2006).

Se demostró que CBD posee una relación indirecta con los receptores A2A, ya que es capaz de modular el sistema adenosinérgico a través de su capacidad de unirse al subtipo 1 de ENT (ENT1) bloqueándolo y así inhibir la recaptación de adenosina y activar de forma indirecta los receptores A2A (Carrier y cols. 2006; Aso y cols. 2019; Pinto-Duarte y cols. 2005). Es así que, la inhibición de ENT1 por CBD y la modulación de la neurotransmisión adenosinérgica, podrían asociarse a su potencial terapéutico para el PSUD. Es plausible pensar que CBD, a través del bloqueo de ENT1 aumente la transmisión adenosinérgica y atenuar las acciones estimulantes de cafeína.

A su vez, se sabe que los niveles endógenos de adenosina aumentan en sitios inflamados (Brown y Short, 2008; Haskó y Cronstein, 2004). En este contexto, Carrier y cols. (2006) demostraron que la inhibición de ENT1 aumenta la disponibilidad de adenosina (in vitro) y que el efecto de CBD en disminuir la producción de TNF-alfa evocado por el tratamiento *in vivo* con LPS es dependiente de receptores A2A y no A1 (Carrier y cols. 2006). Este estudio vincula fuertemente la propiedad antiinflamatoria de CBD mediada por la transmisión adenosinérgica, dependiente de receptores A2A. Todos estos datos se relacionan con el planteo de Calpe-López y cols. (2019) acerca de que compuestos con acciones antioxidantes y antiinflamatorias podrían mostrar un potencial terapéutico para el SUD (Calpe-López y cols. 2019). Además, Clark y cols. (2013) proponen que el uso de antiinflamatorios en la fase temprana de abstinencia a drogas podría atenuar la respuesta microglial inducida, que lleva a la recaída (Clark y cols. 2013). Estudios sobre la acción atenuadora de CBD sobre procesos de neuroinflamación inducidos por drogas de abuso son escasos, y la participación del ENT1 en el potencial terapéutico de CBD en el SUD a psicoestimulantes no ha sido investigada.

7. Hipótesis y Objetivos

7.1 Hipótesis

Basados en nuestros antecedentes y evidencias de la literatura, en el presente proyecto hipotetizamos que: 1) la sensibilización locomotora inducida por la administración repetida de CocCaf se asocia a procesos inflamatorios; 2) CBD atenúa la sensibilización locomotora a través de su propiedad antiinflamatoria; 3) el bloqueo de ENT1 es un mecanismo que media la acción de CBD sobre los efectos comportamentales de CocCaf.

7.2 Objetivo general

El objetivo de la presente Tesis fue estudiar los efectos comportamentales motores e inflamatorios inducidos por el tratamiento repetido de la combinación de CocCaf en ratones, y evaluar la capacidad de CBD de atenuar ambos procesos a través de su propiedad antiinflamatoria vía el bloqueo de ENT1.

7.3 Objetivos específicos

1. Estudio del efecto comportamental motor inducido por el tratamiento repetido de CocCaf y los procesos inflamatorios asociados.

1.1 Evaluación de la inducción del desarrollo de la sensibilización locomotora mediante el tratamiento repetido con CocCaf utilizando el modelo Campo Abierto (CA).

1.2 Determinación de la reactividad microglial en el NAcc mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Iba-1 como marcador de inflamación.

2. Estudio de la acción de CBD sobre el efecto comportamental motor inducido por el tratamiento repetido de CocCaf y los procesos inflamatorios asociados.

2.1 Evaluación de la acción de CBD sobre la sensibilización locomotora inducida por el tratamiento repetido de CocCaf utilizando el modelo CA.

2.2. Determinación de la acción de CBD sobre la reactividad microglial en el NAcc, mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Iba-1 como marcador de inflamación.

2.3 Determinación de la acción de CBD sobre el efecto inducido por CocCaf sobre los niveles plasmáticos de citoquinas pro- y antiinflamatorias mediante el uso de citometría de flujo.

3. Estudio del papel de ENT1 en la acción de CBD mediante el uso de Nitrobenzylthioinosine (NBTI), un inhibidor selectivo de ENT1.

3.1 Evaluación del efecto comportamental motor de NBTI mediante el modelo CA. Curva dosis-respuesta para la identificación de una dosis que no altere la actividad locomotora basal de los animales.

3.2 Evaluación del efecto agudo de NBTI sobre la actividad locomotora inducidas por el tratamiento agudo de CocCaf mediante el modelo de CA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6, de 10 a 12 semanas de edad con un peso de entre 25 y 30 g, adquiridos de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay). Los animales fueron mantenidos en condiciones de luz-oscuridad 12:12 (7:00 AM - 7:00 PM), con agua y alimento *ad libitum*.

Todo el cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo conforme a la Ley Nacional N°18.611 de experimentación animal de Uruguay, y el protocolo experimental contó con la aprobación del Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

2. Drogas

Se utilizó una combinación de clorhidrato de cocaína (5 mg/kg) y cafeína (2.5 mg/kg) (CocCaf), a dosis equivalentes a las proporciones detectadas en muestras incautadas de PBC en Uruguay, según estudios previos de nuestro laboratorio (Abin-Carriquiry y cols. 2018; Prieto y cols. 2015; Prieto y cols. 2016). Estas drogas fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (USA), disueltas en solución salina estéril y administradas a un volumen de inyección de 4 mL/kg. Las alícuotas de CocCaf se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

CBD, con una pureza del 95%, fue donado por Phytoplant Research S.R.L. y se preparó según estudios previos a una dosis de 20 mg/kg en una solución de Tween 80 al 3% en salino estéril (vehículo), 24 horas antes de su uso (Prieto y cols. 2020b). Asimismo, Nitrobenzylthioinosine (NBTI), un inhibidor selectivo de ENT1, se obtuvo de Sigma-Aldrich (USA) y se preparó bajo las mismas condiciones 24 horas antes de su administración y se administró a un volumen de inyección de 4 mL/kg.

3. Evaluación comportamental

3.1 Modelo de Campo Abierto

El modelo de CA se utilizó para evaluar la actividad locomotora de los animales tras la administración farmacológica de las drogas de interés (Gould y cols. 2009; Walsh y Cummins, 1976). El CA consiste en una caja de acrílico de 30 cm x 40 cm x 35 cm de alto, donde cada ratón se desplaza libremente. Se dispuso de cuatro cajas de CA para utilizar en simultáneo, permitiendo administrar y registrar cuatro ratones por cada ensayo experimental

(Fig. 6). El CA fue limpiado con etanol al 30 % entre cada ensayo, para evitar que los rastros de animales anteriores interfirieran con los resultados. Los tratamientos y las evaluaciones comportamentales se realizaron diariamente entre las 9:00 y las 15:00 h, correspondientes al período entre ZT2 y ZT8 (según *Zeitgeber Time*, donde ZT0 marca el inicio del ciclo de luz).

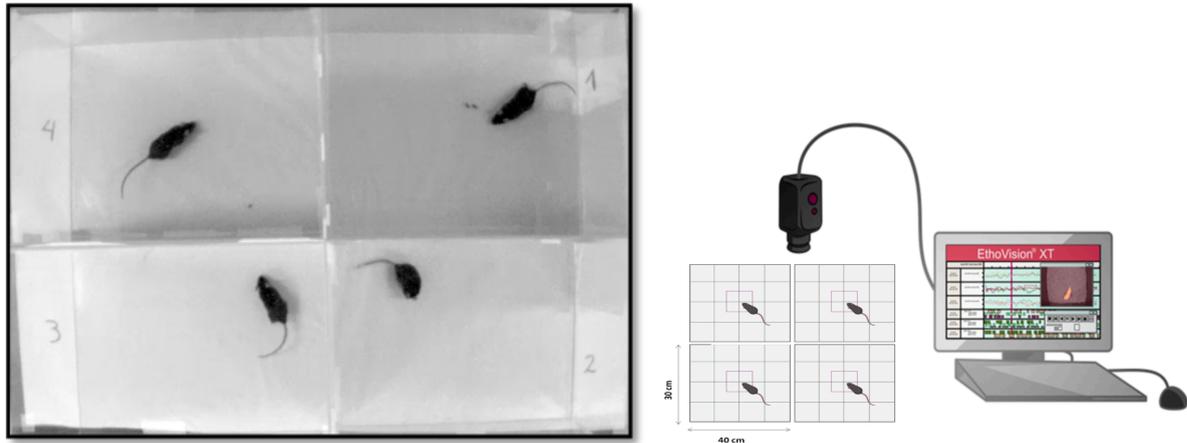


Figura 6: Configuración del test de campo abierto (CA) y del sistema de seguimiento automatizado EthoVision XT 17. La foto muestra una captura de pantalla del software con la vista aérea de los cuatro CA utilizados simultáneamente en cada tanda experimental. El esquema representa la cámara de video conectada a una computadora que ejecuta el software de análisis. Se registraban cuatro ratones por tanda, colocando a cada uno en una arena independiente para registrar la distancia recorrida. Para evitar interacciones visuales entre los animales, la parte externa de las paredes de cada CA fueron cubiertas con papel.

3.2 Cuantificación de la actividad locomotora mediante EthoVision

El CA estaba equipado con una cámara de video conectada al software de seguimiento automatizado EthoVision XT 17 (Noldus), utilizado para registrar y cuantificar la distancia recorrida como parámetro de actividad locomotora (Fig. 6). La distancia recorrida se cuantificó en bloques de 5 min, lo que permitió analizar tanto la distancia total en cada sesión, como la dinámica temporal de la locomoción en intervalos más pequeños.

3.3 Protocolo experimental de sensibilización locomotora

El paradigma experimental de sensibilización locomotora, adaptado de estudios previos (Prieto y cols. 2015, 2020b), consistió en la administración intraperitoneal (i.p.) diaria de CocCaf o solución salina (control) durante 5 días (día 1 hasta día 5), seguida del registro de la distancia recorrida en un CA durante sesiones de 60 min. En los días 1 y 5, se registró la actividad locomotora basal en un período de habituación de 15 min previos a la

administración de CocCaf, antes del inicio de la sesión de 60 min. Veinticuatro horas antes de la primera administración, los animales fueron habituados al CA durante 60 min (día 0) (Fig. 7). Todos los animales fueron llevados al cuarto de experimentación 24 hs antes de dar inicio a los experimentos para que se habitúen al lugar. Los grupos experimentales fueron: Veh/Salino y Veh/CocCaf.

Los animales fueron sacrificados inmediatamente después del quinto día de administración para evaluar reactividad microglial como indicador de inflamación (ver sección 4). Se optó por omitir la fase de abstinencia y reexposición, dado que esta podría interferir con los procesos inflamatorios inducidos por CocCaf.



Figura 7: Esquema del protocolo experimental para evaluar la sensibilización locomotora y procesos inflamatorios inducidos por la combinación de cocaína y cafeína (CocCaf). El protocolo incluye un día 0 de habituación y cinco días de tratamiento diario con la combinación o solución salina. En el día 0, y durante los 5 días inmediatamente después de la administración, se registra la actividad locomotora en un CA durante 60 min. Además, en los días 1 y 5 se registran los 15 min previos a la administración de CocCaf. Al finalizar la evaluación comportamental, los cerebros se disecaron para evaluar la reactividad microglial en el núcleo accumbens mediante inmunofluorescencia, como señal de inflamación.

3.4 Protocolo experimental: efecto de CBD en la sensibilización locomotora

Para evaluar el efecto de CBD en el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf, se utilizó el mismo protocolo descrito en el apartado 3.3, con la diferencia de que los animales recibieron una administración i.p. de CBD (20 mg/kg) o su vehículo 30 min antes de cada administración de CocCaf o solución salina. Se mantuvieron las mismas condiciones de habituación y registro de actividad locomotora (Fig. 8). Los grupos experimentales fueron: Veh/Salino, CBD/Salino, Veh/CocCaf y CBD/CocCaf.

Los animales fueron sacrificados inmediatamente después del quinto día de administración para evaluar reactividad microglial y los niveles plasmáticos de citoquinas como indicadores de inflamación (ver secciones 4 y 5, respectivamente).

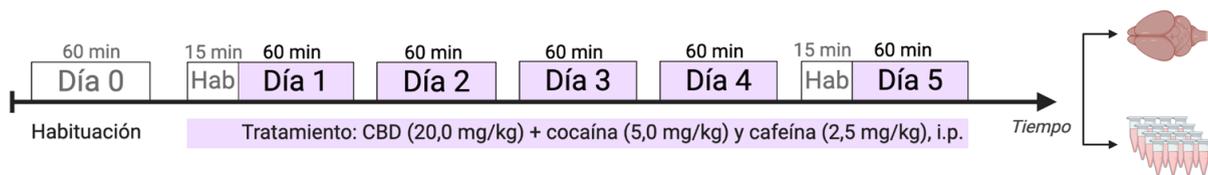


Figura 8: Esquema del protocolo experimental para evaluar los efectos de cannabidiol (CBD) sobre la sensibilización locomotora y procesos inflamatorios inducidos por la combinación de cocaína y cafeína (CocCaf). El protocolo incluye un día 0 de habituación y cinco días de tratamiento diario con CBD o su vehículo, seguido 30 min después de una administración de CocCaf o solución salina, e inmediatamente se registra la actividad locomotora en un CA durante 60 min. Además, en los días 1 y 5 se registran los 15 min previos a la administración de CocCaf. Al finalizar la evaluación comportamental, los cerebros se disecaron para evaluar la reactividad microglial en el núcleo accumbens mediante inmunofluorescencia, y se colectó sangre para medir los niveles plasmáticos de citoquinas mediante citometría de flujo.

3.5 Protocolo experimental: efecto agudo de NBTI en la hiperlocomoción inducida por CocCaf

En un grupo independiente de animales, se caracterizó el efecto agudo del NBTI sobre la actividad locomotora mediante una curva dosis-respuesta en un rango de dosis bajas (0,1, 0,5, 2,5, 5,0 mg/kg, i.p.) y uno de dosis altas (10,0 y 20,0 mg/kg, i.p.), siguiendo protocolos previos para la inhibición de ENT1 (Xu y cols. 2015; Huang y cols. 2017). Treinta minutos después de la administración de NBTI, se registró la distancia recorrida en un CA durante sesiones de 60 min (Fig. 9A).

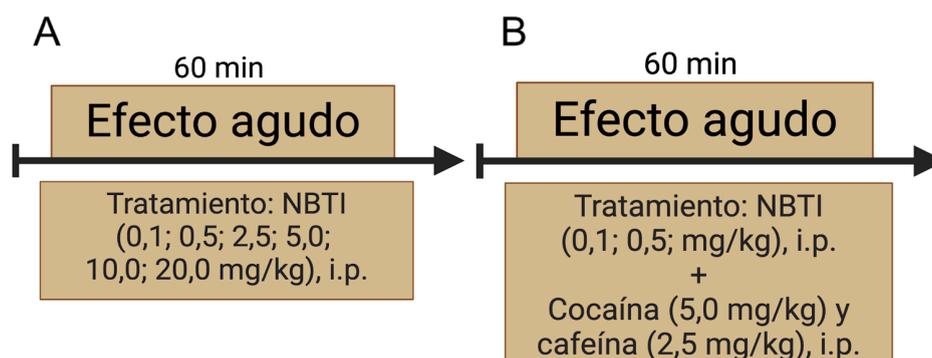


Figura 9: Esquema del protocolo experimental para evaluar el efecto agudo de Nitrobenzylthioinosine (NBTI; un inhibidor selectivo de ENT1) sobre la actividad locomotora. (A) Para evaluar su efecto *per se*, los animales recibieron una administración de NBTI, y 30 min después se registró la actividad locomotora en un CA durante 60 min. (B) Para evaluar su efecto sobre la hiperlocomoción inducida por la combinación de cocaína y cafeína (CocCaf), los animales recibieron una administración de NBTI, seguido 30 min después de una administración de CocCaf, e inmediatamente se registró la actividad locomotora en un CA durante 60 min.

A partir de la curva dosis-respuesta, las dosis que no tuvieron un efecto *per se* sobre la actividad locomotora, fueron seleccionadas para evaluar su interacción con la administración aguda de CocCaf. Para ello, dos grupos de animales fueron administrados con CocCaf 30 min después de la administración de las dosis de NBTI sin efecto locomotor *per se* (0,1 y 0,5 mg/kg), y se registró la distancia recorrida en un CA durante sesiones de 60 min con el objetivo de analizar su efecto sobre la hiperlocomoción inducida por la combinación (Fig. 9B). Los grupos experimentales fueron: Veh/Salino, NBTI/Salino, Veh/CocCaf y NBTI/CocCaf.

4. Evaluación de la reactividad microglial mediante inmunofluorescencia para Iba-1

4.1 Obtención y procesamiento de los tejidos

La reactividad microglial en el NAcc se evaluó mediante la técnica de inmunofluorescencia en flotación libre utilizando un anticuerpo específico para la proteína adaptadora de unión al calcio ionizado 1, Iba-1, un marcador específico de microglía (Ito y cols. 1998), siguiendo protocolos ya establecidos en el laboratorio (Richeri y cols. 2005; Fig. 10).

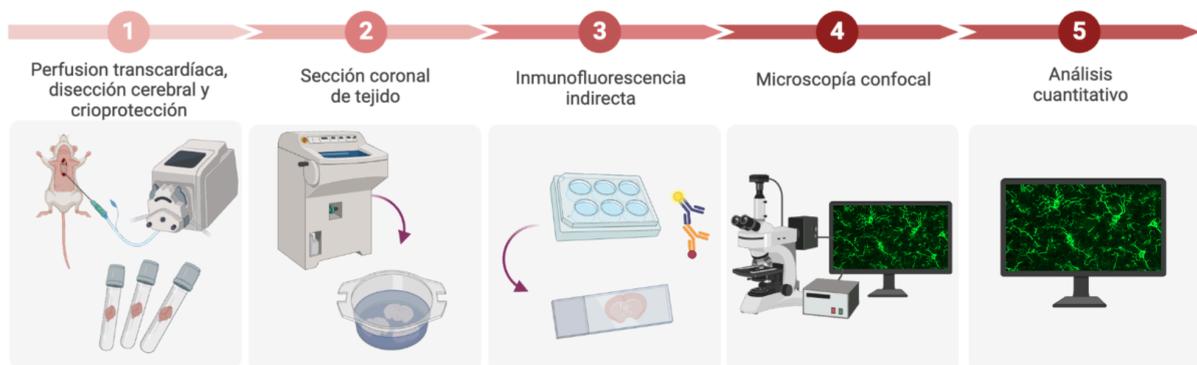


Figura 10: Esquema de los materiales y procedimientos utilizados en la evaluación de la reactividad microglial en el NAcc. (1) Se realizó perfusión transcardíaca con PFA al 4 %, seguida de disección cerebral y crioprotección en sacarosa. (2) Se obtuvieron secciones coronales de 40 μm del core y shell del NAcc mediante criostato. (3) Se realizó inmunofluorescencia indirecta anti-Iba-1, con detección mediante anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488. (4) Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal (LSM ZEISS 800), obteniendo mosaicos y z-stacks. (5) Se realizó el análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia y conteo celular utilizando el software ImageJ.

Para ello, al finalizar los ensayos comportamentales, los animales fueron anestesiados con uretano (2,0 ml/kg, i.p.) y se realizó una perfusión transaórtica con 40 mL

de PFA al 4 % en PBS a un flujo de administración de 5 ml/min. Posteriormente se disecaron los cerebros y se sometieron a crioprotección con sacarosa (20 % en PBS a 4 °C por 24 horas, y 30 % en PBS por 72 horas), tras la cual fueron congelados a -80 °C en bloques con medio de inclusión (Tissue-Tek). Secciones coronales de 40 µm de espesor que contenían al NAcc (de acuerdo a Bregma +1,42 según el atlas de Paxinos y Franklin, 2007) fueron obtenidas utilizando un criostato (Leica Alemania) a -22 °C. Las secciones fueron recolectadas en PBS 1x y sometidas a tres lavados de 5 min cada uno. Luego, las secciones se dejaron en medio OLMOS a 4 °C durante toda la noche y posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

4.2 Detección de Iba-1 mediante inmunofluorescencia indirecta

El día previo al ensayo, los cortes seleccionados se trasladaron a PBS a 4 °C durante toda la noche, para eliminar el OLMOS. El día del ensayo, se realizaron tres lavados en PBS de 10 min cada uno.

Para la permeabilización de las membranas, las secciones fueron incubadas con PBS + Tritón 0,5 % (Sigma-Adrich) (PBST) durante 30 min a temperatura ambiente (Tamb.). Posteriormente se realizó el bloqueo para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios, mediante incubación con suero normal de cabra 10 % (Gibco) + BSA 2 % + PBST durante 60 min a Tamb.

A continuación las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-Iba-1 generado en conejo (#019-19741, Wako, EE.UU.), a una concentración de 1:2000 en PBS + Tritón 0,2 %, durante toda la noche a 4 °C. Luego de 3 lavados de 15 min en PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra y conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (A11008; Invitrogen, EE.UU.) a una concentración de 1:400 en PBST, durante 60 min a Tamb. Las secciones fueron sometidas a 3 lavados de 15 min en PBS, y durante el segundo lavado se incubaron con Hoechst 33258 (marcador nuclear) (1 ng/mL) a Tamb.

Finalmente, las secciones fueron montadas en portaobjetos de vidrio cargados y se dejaron secar durante 2 horas. Una vez secas, fueron cubiertas con medio de montaje Citifluor AF1 (UK) y cubreobjetos lavados con alcohol al 95 %, para su posterior almacenamiento a -20 °C hasta la adquisición de imágenes por microscopía confocal.

4.3 Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal LSM ZEISS 800 de la Plataforma de Microscopía Confocal y Epifluorescencia del IIBCE utilizando un objetivo 40X para obtener z-stacks de secciones ópticas de 1 μm de una grilla de 200x200 μm . Para cada animal, se adquirieron imágenes de ambos hemisferios en conjunto, de las subregiones core y shell del NAcc, en tres secciones de la región cerebral de interés (Fig. 11). Para identificar las subregiones se tomaron en cuenta estructuras anatómicas como la comisura anterior, los ventrículos laterales y la forma y tamaño del cuerpo calloso (Fig 11; Paxinos y Franklin, 2007). La visualización de la marcación de núcleos con Hoechst también se utilizó para la identificación de las subregiones.

Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (*mean gray value*, en unidades arbitrarias, u.a.) para Iba-1. El número total de células positivas para Iba-1 se cuantificó manualmente tomando en cuenta la co-localización de Iba-1 y Hoechst, y se promediaron las tres secciones de un mismo animal para obtener un promedio de cada individuo. El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó a ciegas, utilizando el software ImageJ (Schindelin y cols. 2012).

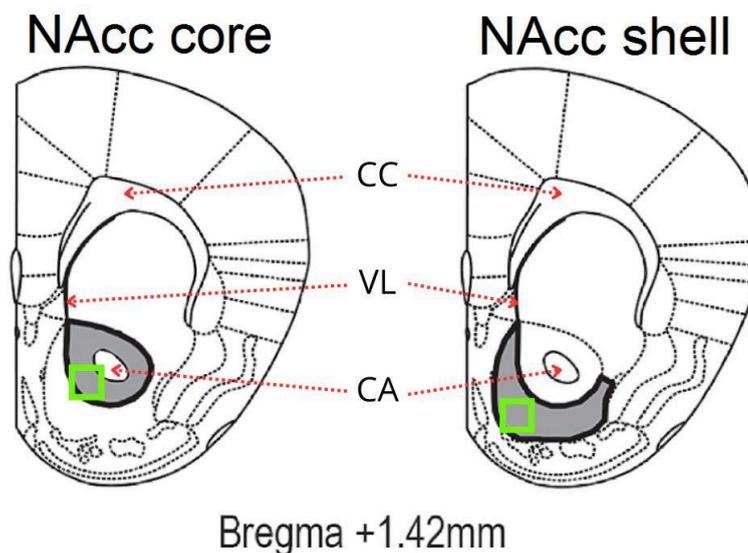


Figura 11: Región en las cuales se determinó la inmunorreactividad para Iba-1 por inmunofluorescencia. Los recuadros marcan la ubicación y forma aproximada de las grillas utilizadas. El área gris representa a las subregiones core (izquierda) y shell (derecha) del núcleo accumbens (NAcc). CC: Cuerpo calloso; VL: Ventrículo lateral; CA: Comisura anterior.

5. Evaluación de la concentración de citoquinas plasmáticas

5.1 Obtención de plasma

Se evaluaron los niveles plasmáticos de citoquinas plasmáticas pro- y antiinflamatorias utilizando un inmunoensayo *multiplex* adecuadas para su uso en citometría de flujo. Este ensayo *multiplex* permite analizar múltiples citoquinas en una muestra.

Para la cuantificación de citoquinas pro- y antiinflamatorias mediante citometría de flujo, se realizó la extracción de sangre directa del corazón inmediatamente después de haber realizado la dislocación cervical (Briceño y cols. 2018) en tubos con EDTA como anticoagulante. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C, y el plasma obtenido fue almacenado a -80 °C hasta el día del ensayo multiplex para determinar la concentración de citoquinas.

5.2 Determinación de la concentración de citoquinas mediante citometría de flujo

La cuantificación de 6 citoquinas plasmáticas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , MCP-1, IL-23 e IL-6) y una anti-inflamatoria (IL-10) se realizó utilizando el kit Mouse Inflammation Panel 13-plex (Biolegend, San Diego, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Este ensayo multiplex emplea perlas de poliestireno marcadas con anticuerpos específicos para cada citoquina de interés, permitiendo su detección mediante citometría de flujo (Fig. 12).

En la placa de 96 pocillos con *fondo en V* se incubaron 25 μ L de plasma con las perlas durante 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar las 2 horas se realizó un lavado con la solución de lavado proporcionada por el kit, y se agregó el anticuerpo de detección. Se dejó incubar una hora para permitir la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente se añadió estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) para marcar los complejos antígeno-anticuerpo. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas y la intensidad de fluorescencia emitida por los complejos antígeno-anticuerpo fue analizada mediante citometría de flujo.

5.3 Adquisición y análisis de concentraciones de citoquinas

Las mediciones de fluorescencia se adquirieron en un citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) equipado con un autosampler, perteneciente a la Plataforma de Citometría de Flujo del Institut Pasteur Montevideo. Para la detección de perlas se utilizó el

láser de 638 nm con el filtro de banda 670/14 (canal de clasificación de perlas) y el láser de 561 nm con el filtro de banda 585/16 (canal de cuantificación de los analitos). Para cada muestra, se adquirieron 4000 eventos totales, seleccionados en función de su perfil en un gráfico de dispersión frontal (FSC, *Forward Scatter*) versus dispersión lateral (SSC, *Side Scatter*). En este gráfico, el parámetro FSC refleja el tamaño relativo de las partículas, mientras que el SSC indica su complejidad estructural o granularidad. Esta estrategia permite discriminar las perlas fluorescentes de posibles artefactos o detritos, garantizando una adquisición precisa de los datos.

Para el análisis cuantitativo, los datos obtenidos fueron analizados con el software LEGENDplex™ de BioLegend, generando curvas estándar para calcular las concentraciones de citoquinas expresadas en pg/mL.

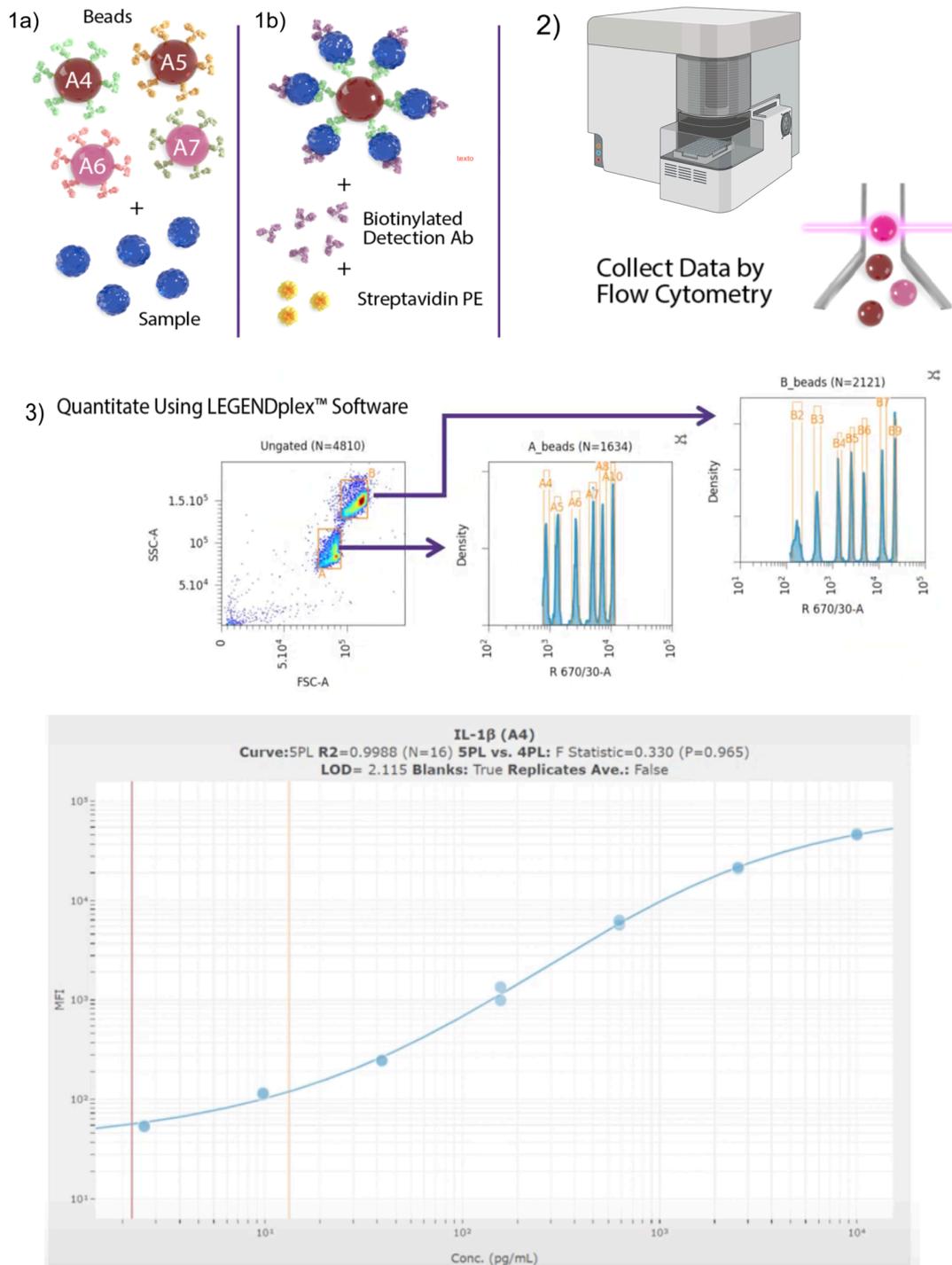


Figura 12: Esquema del ensayo multiplex y obtención y análisis de datos para la cuantificación de citoquinas plasmáticas mediante citometría de flujo usando el Mouse Inflammation Panel (BioLegend). 1a) Las perlas marcadas con diferentes intensidades de fluorescencia se unen a citoquinas específicas presentes en la muestra de plasma. 1b) Se añade un anticuerpo de detección biotinilado, seguido de Estreptavidina-Ficoeritrina (SA-PE), formando el complejo perla-citoquina-anticuerpo. 2) La muestra es analizada en un citómetro de flujo, donde un láser excita cada perla, identificando su fluorescencia y permitiendo la detección simultánea de múltiples

citoquinas. 3) Los datos obtenidos son procesados mediante el software de BioLegend, generando curvas estándar para cuantificar las concentraciones de citoquinas en pg/mL.

6. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media \pm el error estándar de la media (EEM) y fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (tratamiento) o dos vías (tiempo y tratamiento) seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En algunos casos se utilizó la prueba t de Student para datos no pareados. Cuando la distribución de los datos no fue normal, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis seguida de una prueba de Dunn. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el software GraphPad Prism 7.0 para Windows. La significancia estadística fue considerada con un $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. Objetivo específico: estudio del efecto comportamental motor inducido por el tratamiento repetido de CocCaf y los procesos inflamatorios asociados.

1.1 Evaluación de la inducción del desarrollo de la sensibilización locomotora mediante el tratamiento repetido con CocCaf utilizando el modelo CA

En la Fig. 13 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad motora luego del tratamiento repetido con CocCaf y el grupo control. Se observó que CocCaf indujo un aumento significativo en la distancia recorrida total (0-60 min) de los animales en cada uno de los 5 días del ensayo en comparación con el grupo control, la cual a su vez fue aumentando a lo largo de los días (Fig. 13 A) consistente con el desarrollo del fenómeno de sensibilización locomotora. Complementando el análisis, si se compara la distancia recorrida del grupo tratado con CocCaf del día 1 al 5, se observa una diferencia significativa entre ambos, característica del desarrollo de la sensibilización locomotora (Fig. 13 A y B). El aumento en la actividad locomotora alcanzó la significancia estadística con respecto al control únicamente en el día 5, tanto en el acumulado de 60 min (Fig. 13 B), como en dos períodos de 30 min (Fig. 13 D y F). Para visualizar estos resultados, en el siguiente enlace se puede acceder a un video representativo de 5 min de registro de la actividad locomotora en el último día de tratamiento, comparando los grupos experimentales tratados con CocCaf y Salino: www.youtube.com/watch?v=5PajC-YoWng.

De manera interesante se puede observar que los animales tratados con CocCaf muestran un aumento desde el día 1 al 3 respecto al control, diferenciándose en forma estadísticamente significativa a partir del día 3 con respecto al primer día de tratamiento (Fig. 13 A). Este efecto se observa en el periodo total de registro, de 0-60 min, así como en el periodo de 0-30 min (Fig. 13 C), tendiendo a desaparecer entre los 30-60 min (Fig. 13 E) Este efecto sugiere que los cambios para desarrollar la sensibilización se hacen notorios a partir del día 3, manteniéndose hasta el día 5.

Figura 13

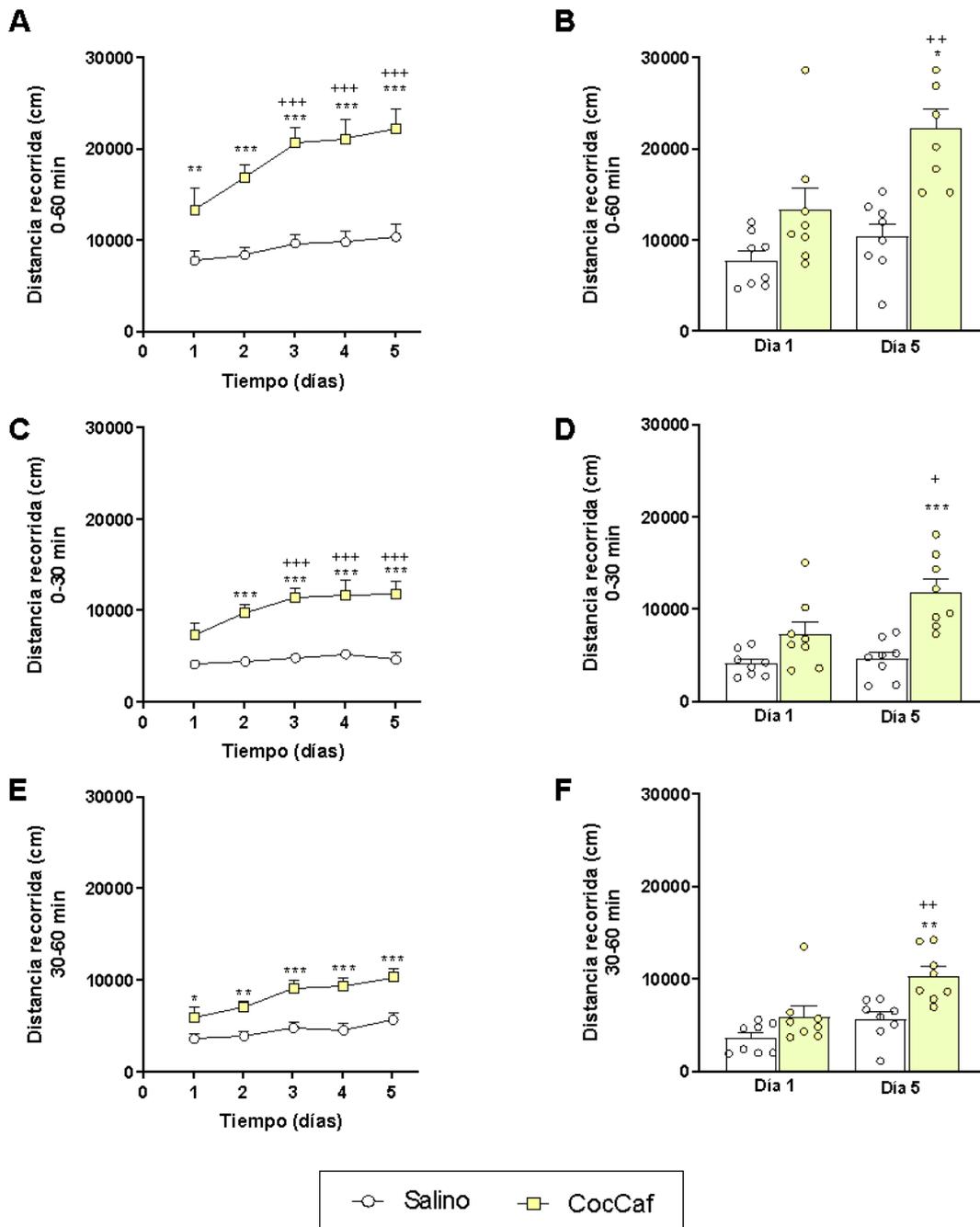


Figura 13: Efecto del tratamiento repetido de CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) o salino (grupo control) sobre la actividad motora durante los 5 días de registro (A-F). El registro de la distancia recorrida se realizó de 0-60 min y fue analizada en tres periodos: 0-60 min (A y B), 0-30 min (C y D) y 30-60 min (E y F). Los tratamientos se compararon en los días 1 y 5 (B, D, F). Los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como Media \pm EEM. ANOVA de una o dos vías seguido del test de Tukey. * = vs Salino; + = vs CocCaf día 1. *, + = $p < 0.05$; **, ++ = $p < 0.01$; ***, +++ = $p < 0.001$. N = 8 por grupo experimental.

En forma complementaria, la Fig. 14 muestra la actividad de los animales tratados con CocCaf en comparación con el grupo control en cada uno de los días de la evaluación y 60 min de registro. Se puede apreciar que la activación significativa de los animales del grupo CocCaf comienza en forma significativa a partir del día 2 (Fig. 14 B) y se mantiene hasta el día 5 (Fig. 14 C-E), confirmando la acción estimulante del tratamiento y el desarrollo de la sensibilización. La actividad del grupo control es relativamente estable a lo largo del tiempo y de los días (Fig. 14 A-F), sugiriendo que el efecto novedad al ambiente no está influyendo en el resultado del tratamiento.

Figura 14

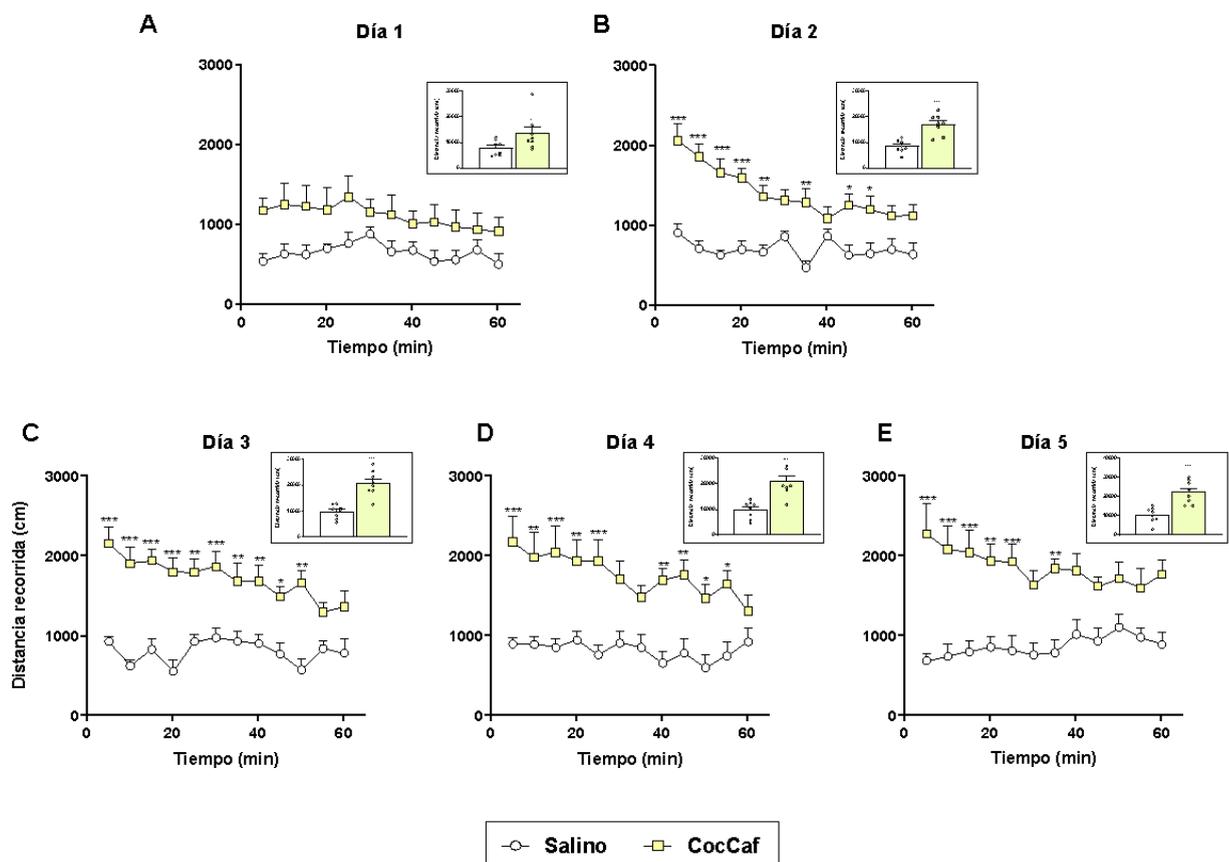


Figura 14: Efecto del tratamiento repetido de CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) o salino (grupo control) sobre la actividad locomotora durante los 5 días de registro (A-E). El registro de la distancia recorrida se realizó de 0-60 min. En el *inset* se muestra la actividad motora total del grupo salino y CocCaf. Los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como Media \pm EEM. ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey. *Insets* analizados por Student *t*-test. * = vs Salino. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. N = 8 por grupo experimental.

Por otro lado, si analizamos los primeros 5 min de registro, en los que podría estar influyendo la novedad del ambiente, se observó que los animales del grupo control no

cambian su actividad a lo largo de los días, mientras que, el efecto significativo del tratamiento comienza a evidenciarse en el día 2 con respecto al grupo control, siendo el día 3 el que demuestra el cambio significativo en el grupo tratado con CocCaf (Tabla 1).

Tabla 1- Promedio de actividad motora en los primeros 5 min de registro

Tratamiento	Tiempo				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Salino	546.8 ± 93.1	912.7 ± 108.1	934.0 ± 64.9	901.0 ± 79.4	691.3 ± 84.6
CocCaf	1180.5 ± 157.1	2067.2 ± 207.9**	2163.0 ± 207.8***+	2177.0 ± 324.3***+	2279.0 ± 374***++

Tabla 1: Efecto del tratamiento repetido de CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) o salino (grupo control) sobre la actividad locomotora durante los 5 min iniciales de registro en los días 1 al 5. Datos están expresados como Media ± EEM. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. * = vs. Salino (grupo control); + = vs. CocCaf. *, + = P < 0.05; **, ++ = P < 0.05; *** = p < 0.001.

Adicionalmente se analizaron los datos en relación a la habituación de los animales al CA. Se sabe que la sensibilización locomotora se evidencia cuando los animales desarrollan el fenómeno de la asociación al contexto o condicionamiento al ambiente (Robinson & Berridge, 1993). La Fig. 15 muestra el análisis de la actividad locomotora basal registrada antes de la administración de CocCaf los días 0, 1 y 5. La Fig. 15 A muestra que 24 h antes de recibir salino o CocCaf, los animales no poseen diferencias significativas en su actividad motora registrada en 60 min. Se puede apreciar que ambos grupos experimentales poseen el mismo perfil de habituación al CA ya que disminuyen significativamente su actividad motora basal a lo largo del tiempo de registro (día 0, Fig. 15 A). Este dato complementa lo observado para el grupo control en la Tabla 1, ya que una vez que el animal se habitúa, no modifica su actividad a lo largo de los días de registro. A su vez, confirma que el efecto del aumento de la actividad durante los días de tratamiento corresponde al efecto farmacológico de CocCaf y no al efecto novedad del ambiente. Al analizar los dos periodos adicionales de habituación de 15 min de registro del día 1 y 5, se observa que ambos grupos disminuyen progresivamente su actividad en ambos días de forma significativa (Fig. 15 B y C). Además, se observa que los animales tratados con CocCaf desarrollan el fenómeno de asociación de contexto evidenciado por un aumento significativo en la actividad motora entre el día 1 y 5 (Fig. 15 D).

Figura 15

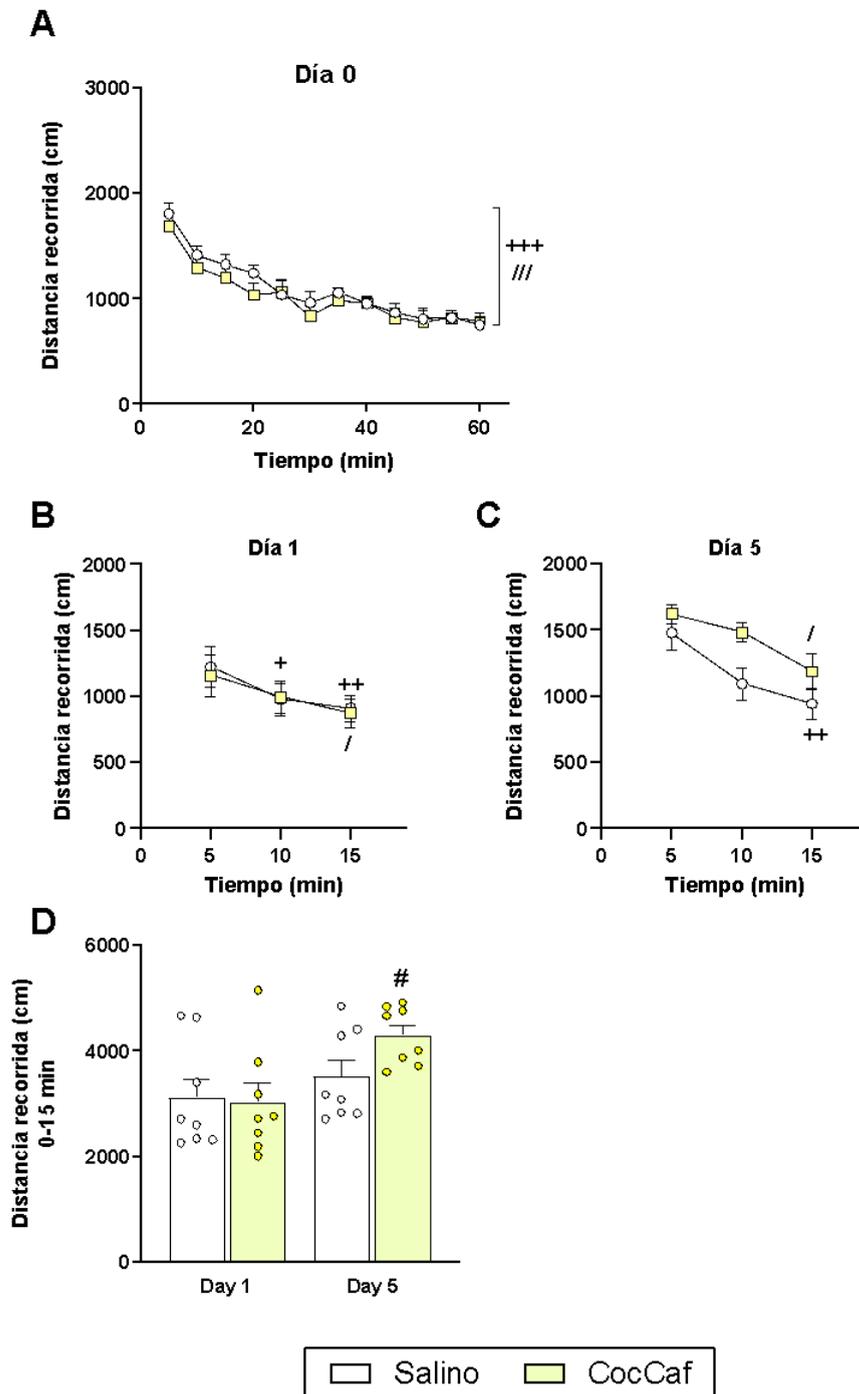


Figura 15: Actividad locomotora basal registrada durante el período de habituación al CA en el día 0 (A; 60 min) y en los días 1 y 5 (B y C; 15 min) previos a la administración CocCaf. En D, los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como Media \pm EEM. ANOVA de una o dos vías seguido del test de Tukey. + = vs día 0, 1 y 5 para grupo salino; / = vs. día 0, 1 y 5 grupo CocCaf. # = vs día 1. +, /, # = $P < 0.05$; ++ = $P < 0.01$; /// = $p < 0.001$. N = 8 por grupo experimental.

1.2 Determinación de la reactividad microglial en el núcleo accumbens mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Iba-1 como marcador de inflamación

La Fig. 16 muestra el efecto del tratamiento con CocCaf sobre la reactividad glial evaluada a través de la inmunorreactividad para el anticuerpo anti-Iba-1 en el NAcc core y shell. El análisis de cuantificación mostró que el tratamiento de los animales con CocCaf no indujo diferencias significativas en el número total de células positivas para Iba-1 en NAcc shell o core (Fig. 16 B) en relación al grupo control. Sin embargo, los animales tratados con CocCaf evidenciaron un aumento significativo en la intensidad media de fluorescencia, expresada como porcentaje respecto a la media del grupo control indicativo de una mayor inmunorreactividad para Iba-1 (Fig. 16 B).

Figura 16

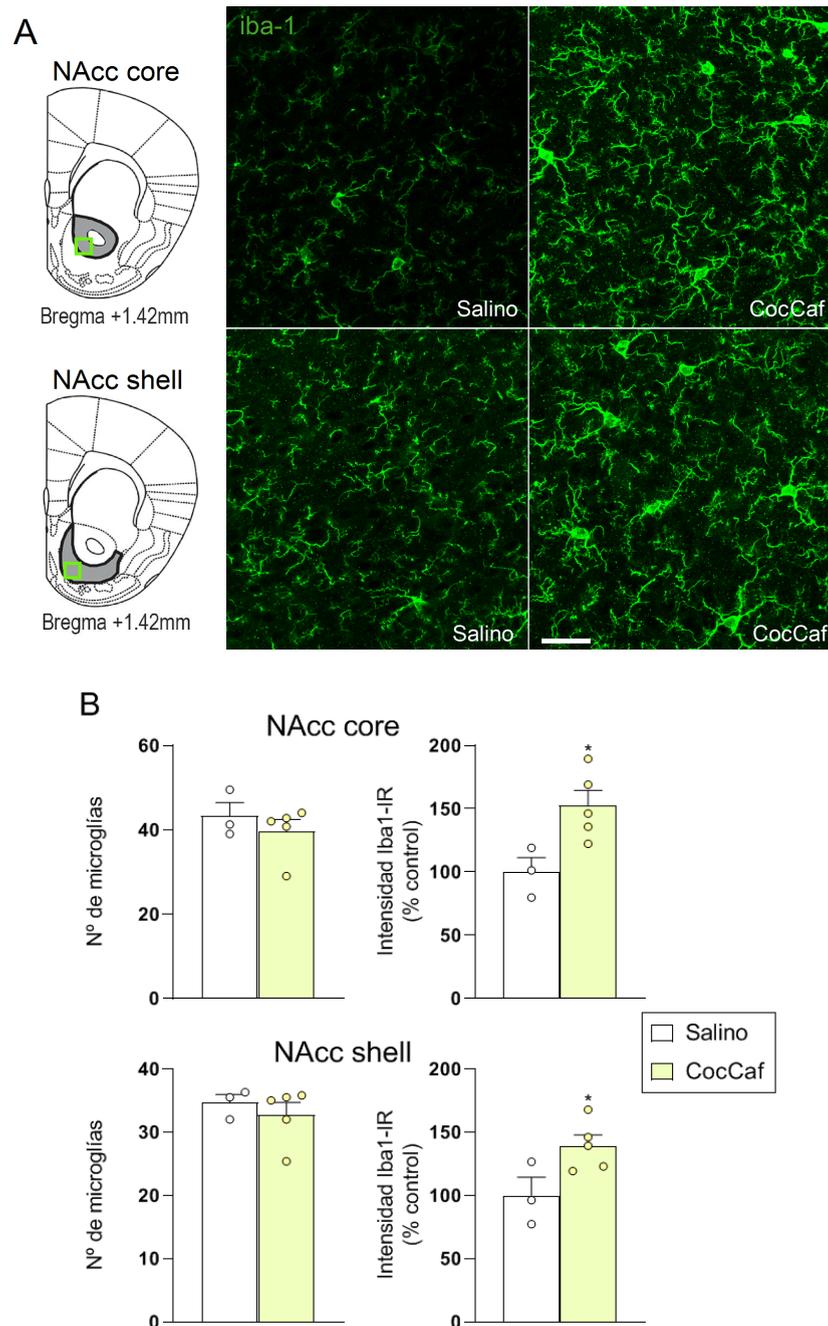


Figura 16: Efecto del tratamiento repetido de CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) o salino (grupo control) sobre la reactividad de la microglia a través de la inmunorreactividad para iba-1 en núcleo accumbens core (NAcc core) y shell (NAcc shell). En A se muestra un diagrama esquemático de sección coronal del hemisferio de ratón señalando las áreas muestreadas de NAcc core y shell (rectángulo verde) y las imágenes de microscopía confocal de NAcc core (arriba) y NAcc shell (abajo); barra de calibración de 20 μ m. En B, se muestra la evaluación cuantitativa utilizando el software ImageJ; los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como promedio \pm EEM para el número de células iba-1 y % respecto a la media del control para la intensidad de fluorescencia iba-1. Student *t*-test. * = vs salino; $p < 0.05$; N = 3-5 por grupo experimental.

2. Objetivo específico: estudio de la acción de CBD sobre el efecto comportamental motor inducido por el tratamiento repetido de CocCaf y los procesos inflamatorios asociados.

2.1 Evaluación de la acción de CBD sobre la sensibilización locomotora inducida por el tratamiento repetido de CocCaf utilizando el modelo CA

En la Fig. 17 se muestran los resultados de la acción de CBD en el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf. El tratamiento repetido con CocCaf indujo un aumento significativo en la distancia recorrida total (0-60 min) en cada uno de los 5 días del ensayo, en relación con el grupo control (Fig. 17 A). Si se compara la distancia recorrida del día 1 vs. día 5 de los animales tratados con CocCaf, se observa un cambio significativo, consistente con el desarrollo del fenómeno de sensibilización comportamental identificado en el objetivo 1 (Fig. 13 A-F). El tratamiento con CBD no indujo cambios significativos en relación al control, indicando que la dosis seleccionada del compuesto no genera un efecto *per se*. Contrario a lo esperado, CBD no atenuó el efecto sensibilizador inducido por CocCaf. Dicho efecto se puede apreciar en la Fig. 17 A, donde el grupo co-tratado con CBD y CocCaf mantiene un aumento significativo en cada uno de los 5 días del ensayo en comparación con el grupo control, al igual que sucede con el grupo tratado solo con CocCaf. Además, esta diferencia de ambos grupos respecto al control, se mantiene si se analizan los registros de 0-30 y 30-60 min (Fig. 17 C y E). Para visualizar estos resultados, en el siguiente enlace se puede acceder a un video representativo de 5 min de registro de la actividad locomotora en el último día de tratamiento, comparando los grupos experimentales tratados con CBD+CocCaf y Veh+CocCaf: www.youtube.com/watch?v=GgN1RF7GoE8.

Complementando este análisis, si se compara la distancia recorrida de 0-60 min para ambos grupos tratados con CocCaf del día 1 al 5, se observa que ambos muestran un incremento significativo respecto a su respectivo día 1, característico de la sensibilización locomotora (Fig. 17 B). Este incremento se mantiene para ambos grupos en los periodos de 0-30 y 30-60 min, tendiendo a desaparecer en el segundo periodo (Fig. 17 D y F).

En conjunto, estos resultados refuerzan la observación de que la administración repetida de CocCaf generó un aumento sostenido en la actividad locomotora y que el co-tratamiento con CBD no parece alterar este incremento.

Figura 17

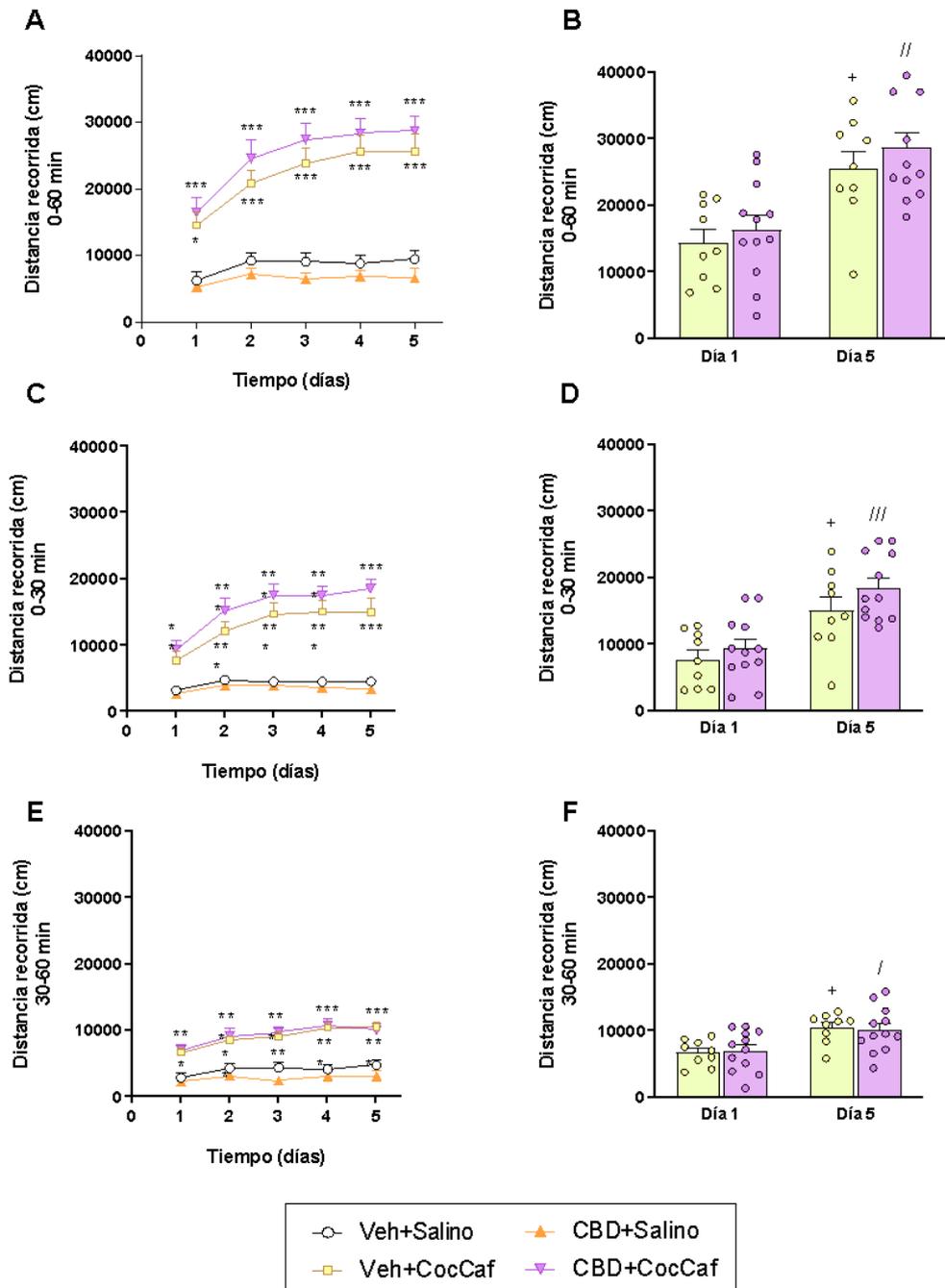


Figura 17: Efecto de la acción de CBD (20 mg/kg) sobre el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) durante los 5 días de registro. El registro de la distancia recorrida se realizó durante 60 min y fue analizada en tres períodos: 0-60 min (A y B), 0-30 min (C y D) y 30-60 min (E y F). Los tratamientos se compararon en los días 1 y 5 (B, D y F). Los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como Media \pm EEM. ANOVA de una o dos vías seguido del test de Tukey. * = vs. Veh+Salino; + = vs. Veh-CoCaf; / = vs CBD+CocCaf. * = $p < 0.05$; **, ++, // = $p < 0.01$; ***, +++, /// = $p < 0.001$. N = 9-12 por grupo experimental.

En forma complementaria, la Fig. 18 muestra los resultados del efecto de CBD en el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf en cada uno de los días de la evaluación y 60 min de registro. A partir del primer día de tratamiento, se observó un incremento en la actividad locomotora en ambos grupos que recibieron CocCaf en comparación con el control (Fig. 18 A). Esta diferencia fue más pronunciada en los días sucesivos, donde la distancia recorrida por ambos grupos tratados con CocCaf se mantuvo elevada en comparación con los grupos salinos (Fig. 18 B-E). Ambas observaciones son características de la sensibilización locomotora.

Figura 18

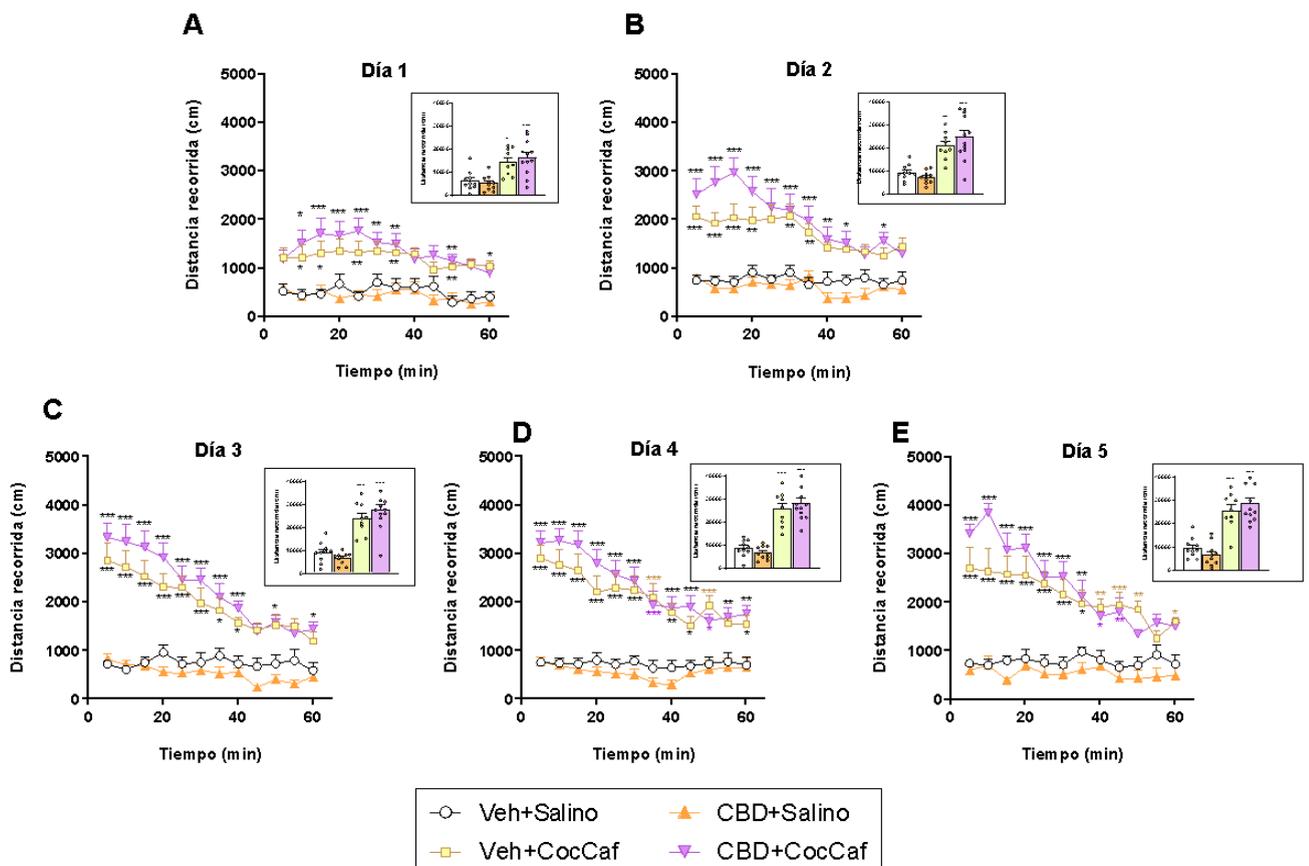


Figura 18: Efecto de la acción de CBD (20 mg/kg) sobre el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) durante los 5 días de registro (A-E). El registro de la distancia recorrida se realizó de 0-60 min. En el *inset* se muestra la actividad motora total de los grupos experimentales. Los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como Media \pm EEM. ANOVA de una vía (insets) o de dos vías seguido del test de Tukey. * = vs. Veh+Sal. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. N = 9-12 por grupo experimental. Por claridad, únicamente se muestran las diferencias significativas en relación a la variable tratamiento.

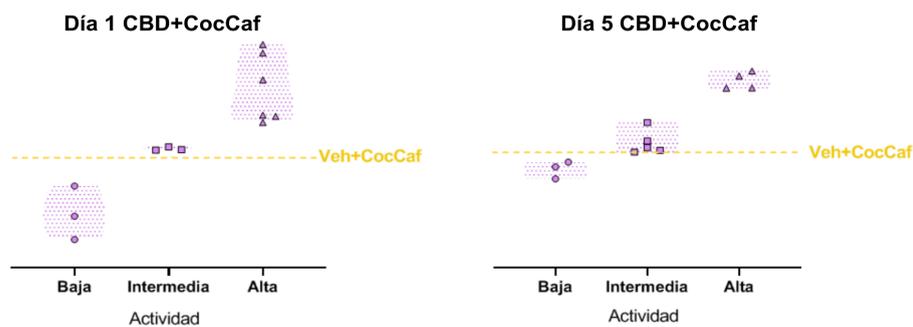
Por otro lado, si analizamos los primeros 5 min de registro, en los que podría estar influyendo la novedad del ambiente, se observó que los animales del grupo control y del

grupo CBD no cambian su actividad a lo largo de los días, mientras que, el efecto significativo de ambos grupos tratados con CocCaf respecto al grupo control se evidencia en los 5 días de tratamiento (Fig. 18 A-E).

Los resultados de la Fig. 18 mostraron que los grupos tratados con CocCaf presentaron un aumento sostenido en la actividad locomotora a lo largo del protocolo en comparación con sus respectivos controles.

Si bien no se evidenció un efecto significativo de CBD en la atenuación de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf (Fig. 17 A y B y Fig. 18), un análisis adicional permitió identificar que algunos animales respondieron de manera diferente al co-tratamiento con CBD, detectándose tres subgrupos de animales según su nivel de actividad locomotora en relación al grupo CocCaf (Veh+CocCaf) (Esquema 1).

Esquema 1



Esquema 1: Efecto de CBD (20 mg/kg) sobre el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) durante los 60 min de registro en el CA en los días 1 y 5 de tratamiento. En comparación con el promedio del grupo tratado con CocCaf, se identifican tres tipos de respuesta en los animales co-administrados con CBD: 1) Actividad disminuída, 2) Sin efecto, 3) Actividad aumentada. Los puntos indican los sujetos individuales.

Para la clasificación, se estableció un criterio basado en la desviación estándar del promedio del grupo CocCaf. Se identificaron tres subgrupos de animales co-tratados con CBD-CocCaf: 1) Con disminución de la actividad locomotora, cuando la distancia recorrida fue menor en más de una desviación estándar respecto al promedio del grupo CocCaf, 2) Sin efecto aparente, cuando la distancia recorrida se mantuvo dentro del rango de una desviación estándar del promedio del grupo CocCaf y 3) Con aumento de la actividad locomotora, cuando la distancia recorrida superó en más de una desviación estándar el promedio del grupo CocCaf. Estos resultados indican una variabilidad interindividual en respuesta a CBD durante los días 1 y 5 del tratamiento que podría explicarse por varios factores (ver sección Discusión).

Adicionalmente se analizaron los datos en relación a la habituación de los animales al CA. La Fig. 19 A-D muestra el análisis de la actividad locomotora basal registrada antes de la administración de CBD y/o CocCaf, los días 0, 1 y 5.

En el día 0, correspondiente al período de habituación al CA, no se observaron diferencias evidentes en la actividad locomotora entre los grupos experimentales. La Fig. 19 A muestra que los animales que van a ser inyectados con CBD y/o CocCaf no poseen diferencias significativas en su actividad motora registrada en los 60 min. Se aprecia que los cuatro grupos experimentales poseen el mismo perfil de habituación al CA ya que disminuyen significativamente su actividad motora basal a lo largo del tiempo de registro. Este resultado confirma que el efecto del aumento de la actividad corresponde al efecto farmacológico del tratamiento CBD y/o CocCaf y no al efecto novedad del ambiente.

Al analizar los dos periodos adicionales de habituación de 15 min de registro del día 1 y 5, se observa que los cuatro grupos disminuyen progresivamente su actividad en ambos días (Fig. 19 B y C). Además, se observa que los animales tratados con CBD y/o CocCaf desarrollan el fenómeno de asociación de contexto mediado por un aumento significativo en la actividad motora entre el día 1 y 5 (Fig. 19 D).

Figura 19

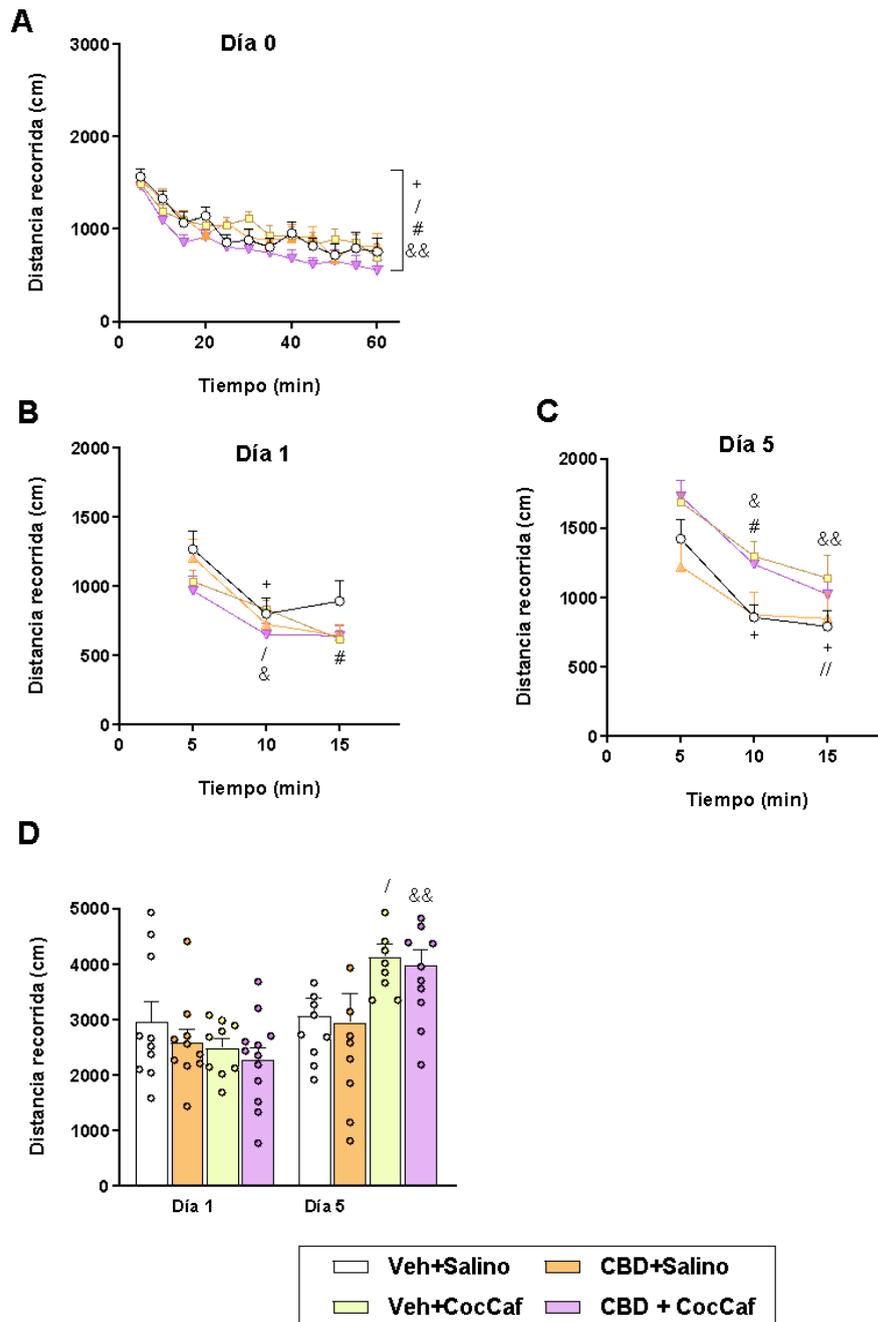


Figura 19: Actividad locomotora basal registrada durante el período de habituación al CA en el día 0 (A; 60 min) y en los días 1 y 5 (B y C; 15 min) previos a la administración de CBD (20 mg/kg) y CocCaf (5 y 2,5 mg/kg). En D, los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como Media \pm EEM. ANOVA de una o dos vías seguido del test de Tukey. + = vs día 0, 1 y 5 para grupo salino; / = vs día 0, 1 y 5 grupo CocCaf. # = vs día 0, 1 y 5 CocCaf. & = vs día 0, 1 y 5 grupo CBD+CocCaf. +, /, #, & = P < 0.05; ++, //, && = P < 0.01. N = 9-12 por grupo experimental.

2.2 Determinación de la acción de CBD sobre la reactividad microglial en el núcleo accumbens, mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Iba-1 como marcador de inflamación

La Fig. 20 muestra el efecto del co-tratamiento repetido de CBD y CocCaf o salino (grupo control) sobre la reactividad microglial evaluada a través de la inmunorreactividad para Iba-1 en el NAcc core y shell.

Las imágenes representativas de la Fig. 20 A ilustran la inmunorreactividad promedio para Iba-1 en las subregiones core y shell del NAcc en los cuatro grupos de tratamiento. El análisis de cuantificación de las imágenes mostró que el tratamiento de los animales con CBD y/o CocCaf no indujo diferencias significativas en el número total de células positivas para Iba-1 en NAcc core o shell (Fig. 20 B) en relación al grupo control.

Tampoco se evidenciaron diferencias significativas en la intensidad media de fluorescencia de Iba-1, expresada como porcentaje respecto a la media del grupo control, entre los grupos tratados con CBD y/o CocCaf (Fig. 20 B).

Figura 20

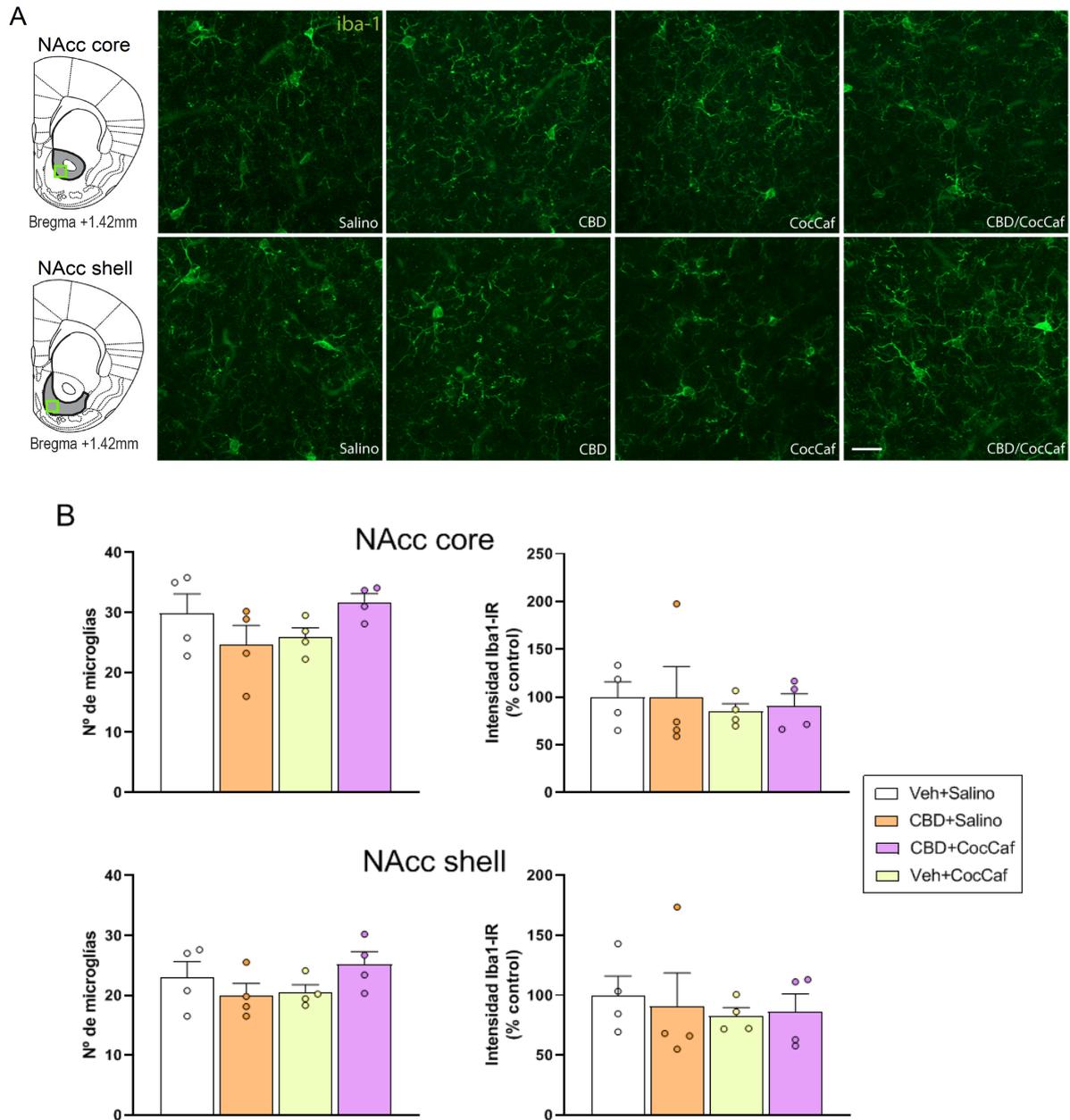


Figura 20: Efecto del co-tratamiento repetido de CBD (20 mg/kg) y CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) o salino (grupo control) sobre la reactividad de la microglia a través de la inmunoreactividad para iba-1 en núcleo accumbens core (NAcc core) y shell (NAcc shell). En A se muestra un diagrama esquemático de sección coronal del hemiserebro de ratón señalando las áreas muestreadas de NAcc core y shell (rectángulo verde) y las imágenes de microscopía confocal de NAcc core (arriba) y NAcc shell (abajo). En B, se muestra la evaluación cuantitativa utilizando el software ImageJ; los puntos indican los sujetos individuales. Kruskal Wallis seguido del test de Dunn. Datos expresados como promedio \pm EEM para el número de células iba-1 y % respecto a la media del control para la intensidad de fluorescencia iba-1. N = 4 por grupo.

2.3 Determinación de la acción de CBD sobre el efecto inducido por CocCaf sobre los niveles plasmáticos de citoquinas pro- y antiinflamatorias mediante el uso de citometría de flujo

La cuantificación de citoquinas proinflamatorias a nivel plasmático (TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , MCP-1, IL-23, IL-6, IL-27), no mostró diferencias estadísticas entre los cuatro grupos experimentales (Fig. 21 A-G). Sin embargo, en el grupo tratado con CocCaf se puede observar una tendencia hacia un aumento en el nivel de IL-27 (Fig. 21 G), y una tendencia hacia la baja en el nivel de TNF- α (Fig. 21 A) en comparación con el control tratado con salino. Mientras que en el grupo coadministrado con CBD y CocCaf, se puede observar una tendencia hacia un aumento en los niveles de TNF- α , IL-1 β , MCP-1 e IL-23 (Fig. 21 A-B, D-E), y una tendencia hacia la baja en los niveles de IL-1 α e IL-6 (Fig. 21 C y F) en comparación con el control tratado con salino.

En la evaluación de la citoquina antiinflamatoria IL-10, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 21 H).

Además, para el grupo tratado solamente con CBD se puede observar una tendencia hacia un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , MCP-1, IL-23 e IL-27 (Fig. 21 A-E y G), y una tendencia hacia la baja en el nivel de IL-6 (Fig. 21 F). Mientras que para el nivel de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Fig. 21 H) se puede observar una tendencia hacia un aumento.

Si bien algunas de estas tendencias sugieren posibles variaciones en la concentración de ciertas citoquinas en respuesta al tratamiento con CocCaf o al co-tratamiento con CBD, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística en las condiciones evaluadas.

Figura 21

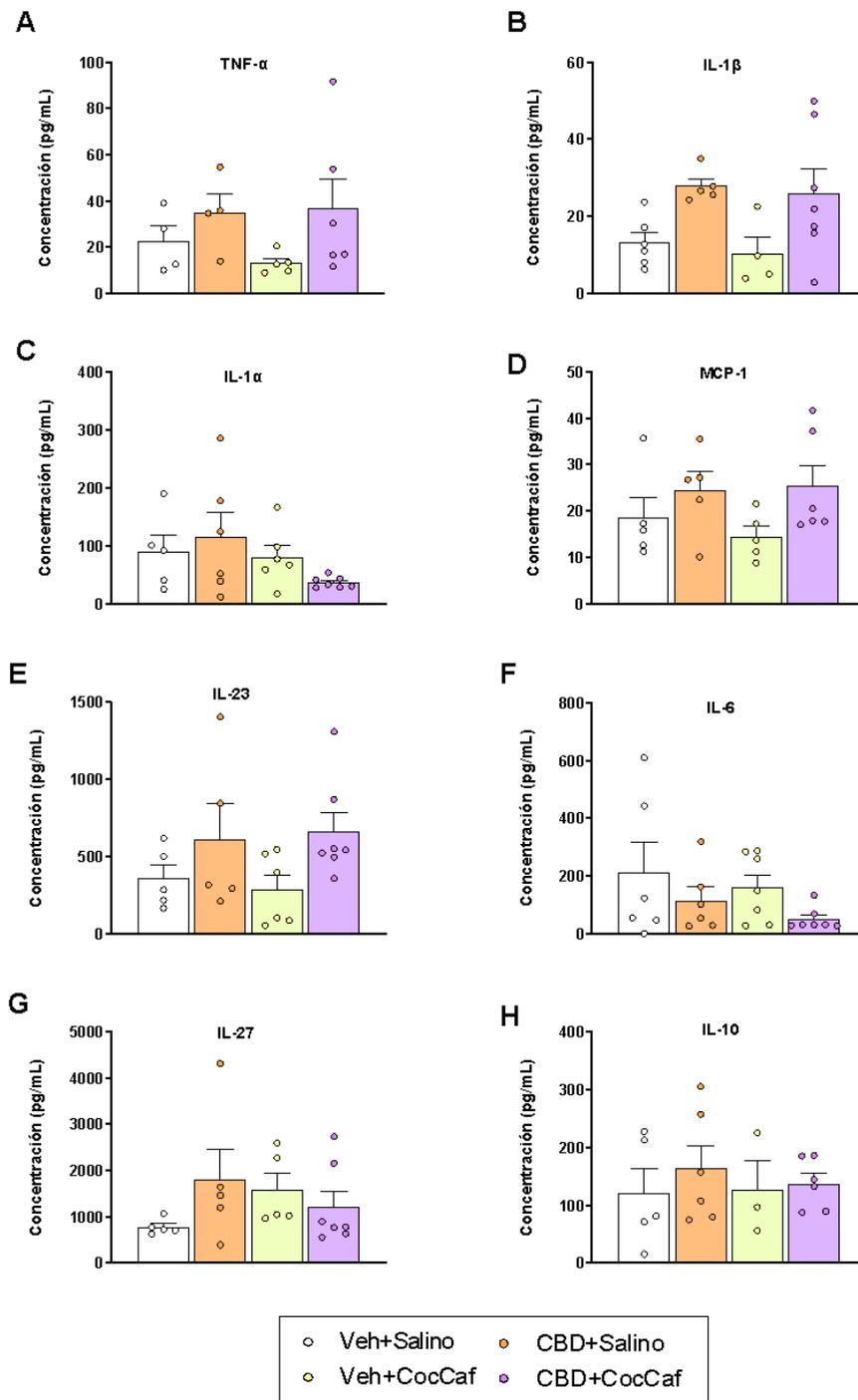


Figura 21: Efecto del co-tratamiento de CBD (20 mg/kg) y CocCaf (5 y 2,5 mg/kg) sobre los niveles plasmáticos de seis citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , MCP-1, IL-23, IL-6, IL-27, IL-10) y una antiinflamatoria (IL-10), determinados mediante un ensayo multiplex por citometría de flujo. Los puntos indican los sujetos individuales. Los resultados se expresan como concentraciones en pg/mL para cada grupo experimental. Datos expresados como promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. N = 3-7 animales por grupo experimental.

3. Objetivo específico: estudio del papel de ENT1 en la acción de CBD mediante el uso de Nitrobenzylthioinosine (NBTI), un inhibidor selectivo de ENT1.

3.1 Evaluación del efecto comportamental motor de NBTI mediante el modelo CA. Curva dosis-respuesta para la identificación de una dosis que no altere la actividad locomotora basal de los animales

La Fig. 22 representa la curva dosis-respuesta para NBTI. Los primeros resultados obtenidos, en la Fig. 22 A, muestran que las dosis más altas, de 10,0 y 20,0 mg/kg indujeron la mayor reducción de la actividad motora basal de los animales. Dado que aún las dosis más bajas afectaron *per se* la actividad locomotora (Fig. 22 B), se eligieron dosis de orden de magnitud menores para evaluar el efecto agudo de NBTI sobre la hiperlocomoción inducida por CocCaf.

Figura 22

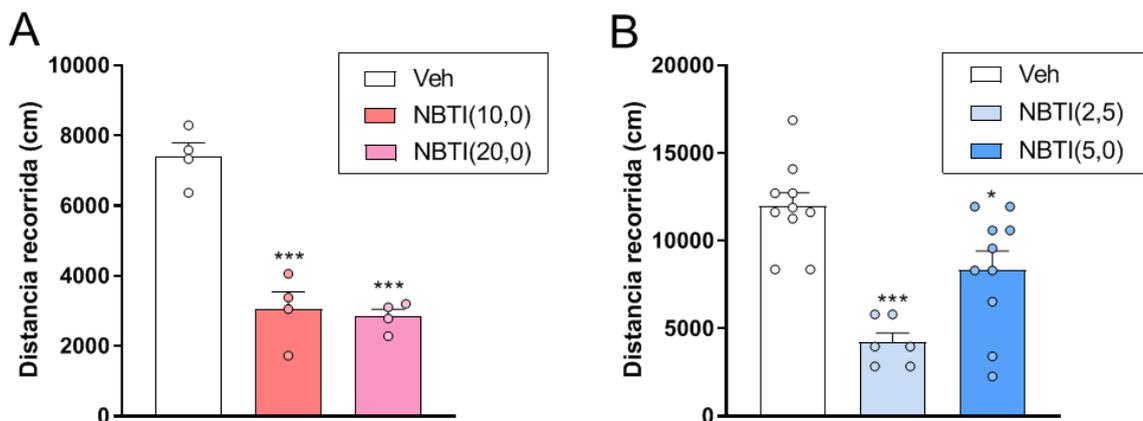


Figura 22: Caracterización de la curva dosis-respuesta en el efecto agudo de NBTI (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mg/kg) evaluada a través de la actividad locomotora basal. Los puntos indican los sujetos individuales. Datos expresados como promedio ± EEM. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. * = vs Veh. * = P < 0.05; *** = p < 0.001. N = 4-6 animales por grupo experimental.

3.2 Evaluación del efecto agudo de NBTI sobre la actividad locomotora inducidas por el tratamiento agudo de CocCaf mediante el modelo de CA

En la Fig. 23 A se observa que en este protocolo de doble administración, las dosis de 0,1 y 0,5 mg/kg no tuvieron efecto *per se* sobre la actividad locomotora, por lo que fueron seleccionadas para evaluar su impacto sobre la acción psicoestimulante de CoCaf. La Fig.

23 B muestra el efecto de NBTI a las dosis de 0,1 y 0,5 mg/kg sobre la hiperlocomoción inducida por la administración aguda de CocCaf.

El análisis de la actividad locomotora evidenció que la administración aguda de CocCaf indujo un aumento significativo en la distancia recorrida en comparación con los grupos control. Y contrario a lo esperado, la coadministración en agudo de NBTI, a las dosis ensayadas, no produjo reducción significativa de la hiperlocomoción inducida por CocCaf. Los valores de distancia recorrida en estos grupos fueron comparables a los del grupo CocCaf, sin evidenciar reducciones marcadas en la actividad motora.

Figura 23

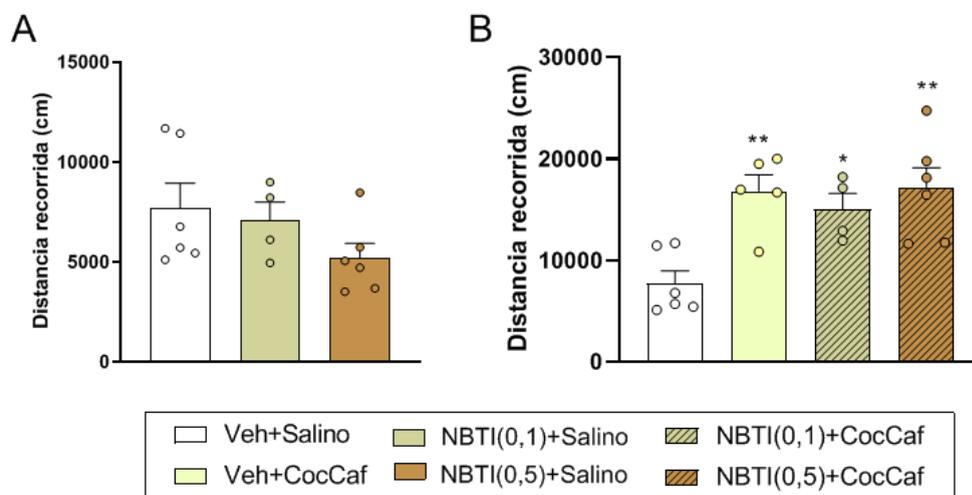


Figura 23: Efecto agudo de las dosis de NBTI (0,1 y 0,5 mg/kg) sobre la actividad locomotor *per se* (A) y sobre la hiperlocomoción inducida por CocCaf (B). Los puntos indican los sujetos individuales. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey. Datos expresados como promedio \pm EEM. * = Veh+Salino. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$. N = 4-6 animales por grupo experimental.

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial terapéutico de CBD en un modelo preclínico basado en la administración repetida de CocCaf, diseñado para inducir sensibilización locomotora y procesos inflamatorios, y así aportar conocimiento a las neuroadaptaciones asociadas al PSUD. Se postuló que la administración repetida de CocCaf induciría sensibilización locomotora y reactividad microglial, que CBD atenuaría estos efectos debido a su propiedad antiinflamatoria, y que ENT1 jugaría un papel clave en esta modulación.

Nuestros hallazgos confirmaron que el protocolo experimental fue adecuado para inducir sensibilización locomotora y cambios en la reactividad microglial, validando el modelo empleado. Sin embargo, el co-tratamiento con CBD no previno la aparición del desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf. En cuanto a la reactividad microglial inducida por CocCaf, no se logró replicar su inducción en el experimento del segundo objetivo como si se había observado en el primer objetivo. Tampoco se identificaron cambios en los niveles de citoquinas plasmáticas. Por estas razones no fue posible evaluar si CBD atenuaba la inflamación. Por otro lado, dentro del rango de dosis probadas de NBTI no se logró establecer una dosis que permitiera evaluar el papel de ENT1 en la sensibilización locomotora sin alterar la actividad basal de los animales. A continuación, se discuten la relevancia de estos hallazgos en el contexto de la literatura existente y sus implicancias en la comprensión del papel de CBD en el PSUD.

1. Sensibilización locomotora e inflamación inducidas por CocCaf (Objetivo 1)

El protocolo de administración repetida de CocCaf indujo un aumento progresivo en la actividad locomotora, confirmando el desarrollo de la sensibilización locomotora. Este efecto es consistente con los mecanismos de plasticidad neuronal asociados a la exposición repetida a psicoestimulantes. Estos resultados coinciden con estudios previos de nuestro grupo, los cuales han demostrado que la coadministración de cocaína con cafeína potencia la sensibilización locomotora en un modelo murino (Prieto y cols. 2015).

Asimismo, se observó un aumento en la inmunorreactividad para el marcador microglial Iba-1 en el NAcc, sin cambios en el número total de células microgliales. Este hallazgo sugiere que la exposición repetida a CocCaf induce un fenotipo microglial reactivo sin proliferación celular evidente. Esta activación microglial podría estar asociada a cambios en la plasticidad sináptica inducidos por CocCaf, en concordancia con estudios previos que

demonstraron que esta combinación modula la expresión de genes en el NAcc (Prieto y cols. 2020a). Dichas modificaciones moleculares podrían estar vinculadas con la activación microglial observada en el presente estudio, sugiriendo una interacción entre la neuroinflamación y la plasticidad sináptica en el contexto del PSUD. Aunque Prieto y cols. (2020a) no evaluó directamente microglía, otros trabajos han reportado que la activación microglial inducida por cocaína puede estar relacionada con cambios en la plasticidad sináptica y la progresión del PSUD (Lewitus y cols. 2016; Harricharan y cols. 2017; Da Silva y cols. 2023).

El presente estudio, adaptado de Prieto y cols. (2015, 2020b), se diseñó para evaluar la inflamación inducida por CocCaf inmediatamente después del tratamiento crónico, omitiendo la fase de abstinencia y la reexposición a la droga. La decisión metodológica de diseccionar los cerebros el quinto día de tratamiento responde a la necesidad de capturar los cambios inflamatorios asociados al desarrollo de la sensibilización locomotora sin una posible reversión de los procesos inflamatorios que podría ocurrir tras la interrupción del tratamiento. En modelos de dolor inflamatorio, se ha reportado que la reactividad microglial y astrocitaria puede modificarse con el tiempo tras la eliminación del estímulo inflamatorio (Romero-Sandoval y cols. 2008). Si bien los mecanismos involucrados en la inflamación inducida por psicoestimulantes pueden diferir de otros modelos inflamatorios, este antecedente apoya la elección del protocolo de 5 días para evaluar la neuroinflamación en la fase de desarrollo de la sensibilización locomotora.

Nuestros resultados del objetivo 1 refuerzan la utilidad del modelo preclínico basado en la administración repetida de CocCaf para evaluar la capacidad terapéutica de CBD para mitigar tanto la sensibilización locomotora como los procesos inflamatorios relacionados con el PSUD.

2. Efecto de CBD en la sensibilización locomotora y en marcadores inflamatorios (Objetivo 2)

2.1 Falta de efecto de CBD en bloquear la sensibilización locomotora

El presente estudio encontró que CBD no atenuó la sensibilización locomotora inducida por CocCaf en los 5 días de tratamiento. Por una parte, esto es consistente con el resultado obtenido por Luján y cols (2018) donde CBD no atenuó la sensibilización locomotora inducida por cocaína durante los 5 días de tratamiento. Por otro lado, este hallazgo refuerza el resultado de Prieto y cols. (2020b), donde se vio que CBD no atenuó la sensibilización locomotora inducida por CocCaf en un protocolo de 3 días de tratamiento. En

particular, Prieto y cols. (2020b) utilizaron un modelo de coadministración de CocCaf en ratas, similar al modelo validado en la presente tesis, reforzando la solidez del hallazgo. Estos resultados sugieren que, al menos durante la fase inicial de administración de la droga, CBD no modula significativamente los mecanismos neuroadaptativos que subyacen al desarrollo de la sensibilización locomotora.

Sin embargo, estudios previos han sugerido que CBD podría tener efectos en etapas más tardías de la adicción. Prieto y cols. (2020b) encontraron que CBD atenúa la expresión de la sensibilización locomotora tras un período de abstinencia, lo que indica que su acción podría estar más relacionada con la plasticidad neuronal a largo plazo. Ledesma y cols. (2021) también reportaron que CBD reduce los efectos locomotores estimulantes de la cocaína y previene el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína, pero sin afectar su adquisición o expresión. Si bien en esta tesis se extendió el protocolo utilizado por Prieto y cols. (2020b) de 3 a 5 días de tratamiento, esto no fue suficiente para que CBD atenúe el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf. En este estudio, la evaluación se centró en la fase de desarrollo de la sensibilización locomotora, sin incluir una etapa de abstinencia que interfiera en los procesos inflamatorios subyacentes, lo que podría explicar la ausencia de efectos de CBD en este contexto. A su vez, es posible que CBD presente un efecto a nivel de los procesos inflamatorios que puedan estar subyaciendo al desarrollo de la sensibilización y que a nivel comportamental se evidencie en la fase de expresión de la sensibilización.

En relación con la asociación de contexto, estudios previos han reportado que CBD modula este proceso en la prueba de CPP inducida por cocaína. Por ejemplo, Luján y cols. (2018) encontraron que CBD bloquea la CPP, sugiriendo que podría interferir con la formación o expresión de asociaciones contextuales con la droga. Chesworth y Karl (2020) reportaron un efecto similar en la consolidación de la memoria asociada a la cocaína en etapas tardías, mientras que Ledesma y cols. (2021) encontraron que CBD previene el restablecimiento de la CPP inducida por cocaína, aunque no afecta su adquisición ni expresión. Sin embargo, Briânis y cols. (2024) no encontraron un efecto significativo de CBD en la CPP, lo que sugiere que su eficacia podría depender del modelo experimental y las condiciones del tratamiento. Aunque la presente tesis no utilizó un protocolo diseñado para evaluar la CPP, sí se observó que los animales tratados con CocCaf desarrollaron una asociación de contexto reflejada en el aumento de la actividad locomotora basal entre los días 1 y 5. La coadministración de CBD no bloqueó este fenómeno, lo que sugiere que bajo estas condiciones experimentales CBD no previno la asociación entre el contexto y el efecto

de la droga. Esto refuerza la importancia de explorar en qué condiciones CBD puede influir en la memoria asociada a las drogas de abuso (Ledesma y cols. 2021; Luján y cols. 2018).

En concordancia con nuestros datos, Luján y cols. (2018) tampoco encontraron efectos atenuadores de CBD sobre la sensibilización locomotora inducida por cocaína y sugirieron que este resultado podría deberse a una baja biodisponibilidad de CBD. Nosotros descartamos que la biodisponibilidad de CBD fuera un factor limitante en este estudio, ya que algunos animales tratados con CBD sí presentaron efectos. Esto también puede sugerir que el tiempo de administración podría no haber sido el adecuado para modular el fenómeno de sensibilización, y sería necesaria la fase de abstinencia.

Desde esta perspectiva, el análisis de los subgrupos identificados en el Esquema 1 revela que CBD no ejerce un efecto uniforme sobre la sensibilización locomotora inducida por CocCaf, sino que su impacto varía entre individuos. Esto sugiere que existen factores biológicos que modulan la respuesta al CBD, como diferencias en la expresión de receptores o en la farmacocinética del compuesto. Este hallazgo es consistente con el estudio de Chesworth y Karl, (2020) quienes propusieron que los efectos de CBD sobre la locomoción inducida por cocaína pueden ser bifásicos, con una fase inicial de aumento en la actividad seguida de una disminución en fases posteriores. Si CBD modula la sensibilización locomotora de manera bifásica o si su acción depende de la fase del proceso adictivo, es posible que los efectos no hayan sido completamente capturados en este estudio, que se centró en la fase inicial de la sensibilización. En este sentido, nuestros resultados resaltan la necesidad de estudios adicionales para caracterizar mejor los factores que determinan la direccionalidad del efecto de CBD en cada individuo. Identificar marcadores biológicos que predigan la respuesta diferencial al CBD podría ser clave para su potencial uso terapéutico en el PSUD. A su vez, la dosificación plasmática o cerebral de CBD será necesaria en próximos experimentos.

2.2 Falta de efecto de CBD en atenuar la inflamación

Los resultados obtenidos en el objetivo 2 no replicaron el aumento de reactividad microglial inducido por CocCaf observado en los experimentos del objetivo 1. Esto puede deberse principalmente a que en la inmunofluorescencia del objetivo 2 se utilizó un lote de anticuerpos diferentes al utilizado en el objetivo 1, cuya sensibilidad haya sido distinta entre experimentos. Además, el grupo tratado solo con CocCaf tampoco mostró cambios en los niveles plasmáticos de citoquinas, lo que sugiere que este modelo podría no haber generado una inflamación sistémica suficientemente robusta como para ser detectada mediante esta metodología.

Si bien estudios preclínicos han propuesto que la sensibilización locomotora inducida por psicoestimulantes está estrechamente relacionada con la activación microglial y la producción de citoquinas proinflamatorias en el SNC (Lewitus y cols. 2016), en este estudio no se detectaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de citoquinas tras la administración de CBD. No obstante, en el objetivo 1, se validó este modelo tanto para la sensibilización locomotora como para la inflamación, lo que indica que la falta de efecto de CBD no se debe a una ausencia de respuesta inflamatoria inducida por CocCaf.

La falta de cambios en citoquinas plasmáticas sugiere que los efectos de CBD podrían depender de un contexto inflamatorio más pronunciado, lo cual no se evidenció a nivel sistémico. Sin embargo, no se evaluaron los niveles de citoquinas a nivel cerebral, lo que representa una limitación, ya que CBD podría haber modulado la neuroinflamación de manera localizada en regiones específicas como el NAcc. Estudios previos han demostrado que los psicoestimulantes pueden inducir una respuesta neuroinflamatoria en esta región, ya sea modulada por la activación de la microglía, lo cual confirmamos en el objetivo 1, así como en la producción de citoquinas proinflamatorias (Araos y cols. 2015; Lewitus y cols. 2016). Dado que la cocaína aumenta la expresión de IL-1 β en el NAcc y la corteza prefrontal (Araos y cols. 2015), evaluar estos cambios a nivel cerebral proporcionaría una mejor comprensión del impacto de CBD en la neuroinflamación inducida por CocCaf.

Además, estudios previos de nuestro laboratorio han reportado que CBD previene alteraciones metabólicas en el NAcc inducidas por la coadministración de CocCaf (Prieto y cols. 2020b), lo que sugiere que su acción moduladora podría extenderse a otros procesos fisiopatológicos relevantes en el PSUD.

Si bien CBD ha demostrado propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras en otros modelos experimentales, la mayoría de estos estudios se han realizado en modelos de inflamación sistémica o neuroinflamación inducida por LPS (Dos-Santos-Pereira y cols. 2019), y no en modelos específicos de psicoestimulantes. Esto subraya la necesidad de explorar diferentes dosis, protocolos de administración más prolongados o la inclusión de un período de abstinencia para evaluar su impacto en la sensibilización locomotora y los marcadores inflamatorios asociados al PSUD.

3. Implicancias del papel de ENT1 y dificultades con NBTI (Objetivo 3)

En este estudio, la inhibición de ENT1 por NBTI no mostró un efecto sobre la hiperlocomoción inducida por CocCaf. Se ha propuesto que la inhibición de ENT1 aumenta

la disponibilidad de adenosina extracelular, promoviendo la activación de los receptores A2A, lo que podría reducir la sensibilización locomotora inducida por psicoestimulantes (Sánchez-Fernández y cols. 2024). Sin embargo, la capacidad de CBD para influir en este mecanismo aún es debatida. Aunque estudios *in vitro* han demostrado que CBD inhibe ENT1 y potencia la señalización adenosinérgica (Carrier y cols. 2006; Pandolfo y cols. 2011), estudios en modelos *in vivo* no han logrado replicar este efecto de manera consistente (Xiao y cols. 2023).

Una posible explicación para estas discrepancias es que la función de ENT1 podría depender del contexto fisiológico y de su interacción con otros sistemas neuroquímicos, como los receptores CB1 y A2A (Carriba y cols. 2007; Ferré y cols. 2010; Aso y cols. 2019). En futuras investigaciones, el uso de modelos genéticos para manipular la actividad de ENT1 en el NAcc y la evaluación de otros biomarcadores de la actividad adenosinérgica podrían proporcionar una mejor comprensión del papel de ENT1 en la neuroinflamación y la sensibilización locomotora. Además, el bloqueo de ENT1 podría requerir un tratamiento repetido para generar efectos significativos sobre la sensibilización locomotora inducida por CocCaf. Alternativamente, el uso de otros inhibidores como el Dipyridamole, cuya capacidad para bloquear ENT1/2 *in vivo* en ratones ha sido reportada previamente (Noji y cols. 2002), podría ayudar a esclarecer este mecanismo.

4. Relevancia y limitaciones del estudio

Este estudio aporta nueva evidencia sobre la acción de CBD en la sensibilización locomotora y la inflamación inducida por psicoestimulantes. Aunque no se logró determinar un efecto claro sobre estos procesos, nuestros hallazgos sugieren que su acción podría ser dependiente del contexto, la fase del trastorno y la dosis empleada. La falta de efecto de CBD en la sensibilización locomotora no descarta su posible influencia en otras manifestaciones del PSUD, como la memoria asociativa o la neuroinflamación.

Entre las limitaciones del estudio, se destaca la necesidad de evaluar si diferentes esquemas de administración, incluyendo tratamientos más prolongados o la evaluación en períodos de abstinencia, podrían revelar efectos que no fueron evidentes en este diseño experimental. Además, la ausencia de cambios en citoquinas plasmáticas sugiere que futuras investigaciones deberían incluir análisis a nivel cerebral para comprender mejor la acción de CBD en la neuroinflamación inducida por CocCaf.

En conjunto, estos resultados refuerzan la importancia de continuar explorando el potencial terapéutico de CBD en el PSUD, considerando no solo su acción en la

sensibilización locomotora, sino también su impacto en otras alteraciones neurobiológicas subyacentes al trastorno.

CONCLUSIONES

- Este estudio evaluó el potencial terapéutico de CBD en la sensibilización locomotora inducida por la combinación de CocCaf, su posible interacción con la inflamación neuroglial y el papel de ENT1.
- Se confirmó que este modelo fue efectivo para inducir sensibilización locomotora y cambios en la reactividad microglial, validando su utilidad para estudiar las neuroadaptaciones asociadas al PSUD.
- Los resultados indican que CBD no previno el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por CocCaf. Sin embargo, un análisis complementario reveló variabilidad interindividual, identificando subgrupos en los que CBD atenuó, potenció o no tuvo efecto sobre la sensibilización locomotora. Esto sugiere que su impacto podría depender de factores biológicos individuales, como diferencias en la expresión de sus dianas moleculares o su farmacocinética.
- Además, no se detectaron cambios en citoquinas plasmáticas, lo que sugiere que los efectos de CBD sobre la neuroinflamación podrían depender del contexto experimental y requerir evaluaciones a nivel cerebral.
- El análisis del papel de ENT1 en la sensibilización locomotora tampoco mostró resultados concluyentes, ya que la inhibición de este transportador mediante NBTI no logró modular la hiperlocomoción inducida por CocCaf. Esto plantea la necesidad de explorar su contribución mediante enfoques alternativos o en diferentes condiciones experimentales.
- En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que CBD puede no ser efectivo para atenuar el desarrollo inicial de la sensibilización locomotora, pero dejan abierta la posibilidad de que ejerza efectos en fases tardías del PSUD, como la expresión de la sensibilización o la neuroinflamación. Además, estos resultados resaltan la importancia de considerar la heterogeneidad biológica en la evaluación de CBD como potencial tratamiento para el PSUD, ya que su efecto podría no ser uniforme en todos los individuos. El diseño de futuros estudios que evalúen estos aspectos permitirá determinar con mayor precisión el potencial terapéutico de CBD en el contexto del consumo de psicoestimulantes adulterados con cafeína.

PERSPECTIVAS

Una de las principales direcciones a considerar es la evaluación del efecto de CBD en la fase de expresión de la sensibilización locomotora tras un período de abstinencia, dado que estudios previos han reportado que su impacto podría ser más evidente en etapas tardías del proceso adictivo. Futuros estudios también deberían centrarse en identificar los factores que determinan la variabilidad en la respuesta a CBD.

Asimismo, el presente estudio no encontró cambios en citoquinas plasmáticas tras la administración de CocCaf y CBD, lo que sugiere que futuros estudios deberían evaluar biomarcadores inflamatorios a nivel cerebral. La medición de citoquinas y la activación microglial en regiones clave del circuito de recompensa, como el NAcc y la corteza prefrontal, permitiría esclarecer el impacto de CBD sobre la neuroinflamación inducida por psicoestimulantes.

Otra línea de investigación importante es el papel de ENT1 como mediador de los efectos de CBD en la sensibilización locomotora y la inflamación. Si bien en este estudio la inhibición de ENT1 con NBTI no mostró un efecto modulador, la posibilidad de que CBD influya en este sistema aún no se descarta. Estudios futuros podrían considerar tratamientos más prolongados con inhibidores de ENT1 o utilizar modelos genéticos para evaluar su contribución en el PSUD.

Por último, es fundamental explorar diferentes dosis y esquemas de administración de CBD. La evidencia sugiere que su efecto puede ser dependiente de la dosis y el contexto experimental. La evaluación de protocolos con administración crónica o dosis ajustadas en función de la progresión del trastorno podría ofrecer una mejor comprensión de su potencial terapéutico en el PSUD.

REFERENCIAS

Abin-Carriquiry, J. A., Martínez-Busi, M., Galvalisi, M., Minteguiaga, M., Prieto, J. P., Scorza, M. C. (2018). Identification and quantification of cocaine and active adulterants in coca-paste seized samples: useful scientific support to health care. *Neurotoxicity Research*, 34, 295-304.

Ahearn, O. C., Watson, M. N., Rawls, S. M. (2021). Chemokines, cytokines and substance use disorders. *Drug and alcohol dependence*, 220, 108511.

Alamo, C., López-Muñoz, F., Cuenca, E. (2000). Abordaje farmacológico de las recaídas en las adicciones. *ADICCIONES*, 12(4), 527-539.

American Psychiatric Association-APA (2013) Substance-related and addictive disorders. In: Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. *Arlington, American Psychiatric Association*, pp 481-589

Andersson, H. W., Wenaas, M., Nordfjærn, T. (2019). Relapse after inpatient substance use treatment: A prospective cohort study among users of illicit substances. *Addictive behaviors*, 90, 222-228.

Araos, P., Pedraz, M., Serrano, A., Lucena, M., Barrios, V., García-Marchena, N., Campos-Cloute, R., Ruiz, J., Romero, P., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca, F. (2015). Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addiction biology*, 20(4), 756-772.

Aso, E., Fernández-Dueñas, V., López-Cano, M., Taura, J., Watanabe, M., Ferrer, I., Luján, R., Ciruela, F. (2019). Adenosine A_{2A}-cannabinoid CB₁ receptor heteromers in the hippocampus: cannabidiol blunts Δ 9-tetrahydrocannabinol-induced cognitive impairment. *Molecular Neurobiology*, 56, 5382-5391.

Bakas, T., Van Nieuwenhuijzen, P. S., Devenish, S. O., McGregor, I. S., Arnold, J. C., Chebib, M. (2017). The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABA_A receptors. *Pharmacological research*, 119, 358-370.

Ballesteros-Yáñez I, Castillo CA, Merighi S, Gessi S. (2018). The Role of Adenosine Receptors in Psychostimulant Addiction. *Frontiers in Pharmacology*, 8:985.

Barrenechea, C., Mautone, M. D. C., Triaca, J. M., Míguez, E., Pouy, A., Blanco, A., Vivas, P., Rossi, G. (2007). Programa Nacional de Atención a usuarios problemáticos de drogas.

Batalla, A., Bos, J., Postma, A., Bossong, M. G. (2021). The impact of cannabidiol on human brain function: a systematic review. *Frontiers in pharmacology*, 11, 618184.

Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its

synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology*, 134(4), 845-852.

Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of ethnopharmacology*, 227, 300-315.

Brakatselos, C., Delis, F., Asprogerakas, M. Z., Lekkas, P., Tseti, I., Tzimas, P. S., Petrakis, E., Halabalaki, M., Skaltsounis, L., Antoniou, K. (2021). Cannabidiol modulates the motor profile and NMDA receptor-related alterations induced by ketamine. *Neuroscience*, 454, 105-115.

Bri anis, R. C., Iglesias, L. P., Bedeschi, L. G., Moreira, F. A. (2024). Effects of cannabidiol on reward contextual memories induced by cocaine in male and female mice. *Acta Neuropsychiatrica*, 36(5), 299-306.

Brice o, A. M., Molina, M., Brito, Y., Moreno, Y., Bri ez, O. M., Duarte, M.  ., Esteves, C., Acosta, M. M. (2018). T cnicas de necropsia y toma de muestras en animales de experimentación: Una revisión bibliogr fica y actualizaci n. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*, 49(2).

Bros us, J., Gentile, N., Esseiva, P. (2016). The cutting of cocaine and heroin: a critical review. *Forensic science international*, 262, 73-83.

Brown, J. D., Winterstein, A. G. (2019). Potential adverse drug events and drug–drug interactions with medical and consumer cannabidiol (CBD) use. *Journal of clinical medicine*, 8(7), 989.

Brown, R. M., Short, J. L. (2008). Adenosine A2A receptors and their role in drug addiction. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(11), 1409-1430.

Calpe-López, C., García-Pardo, M. P., Aguilar, M. A. (2019). Cannabidiol treatment might promote resilience to cocaine and methamphetamine use disorders: a review of possible mechanisms. *Molecules*, 24(14), 2583.

Campos, A. C., Foga a, M. V., Sonogo, A. B., Guimarães, F. S. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological research*, 112, 119-127.

Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., M ller, C., Woods, A., Hope, B., Ciruela, F., Casadó, V., Canela, E., Lluís, C., Goldberg, S., Moratalla, R., Franco, R., Ferré, S. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2249-2259.

Carrier, E. J., Auchampach, J. A., Hillard, C. J. (2006). Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7895-7900.

Castaño, G. A. (2000). Smokable Cocaine In Latinamerica. *Adicciones*, 12(4).

Castillo-Arellano, J., Canseco-Alba, A., Cutler, S. J., León, F. (2023). The polypharmacological effects of cannabidiol. *Molecules*, 28(7), 3271.

Chesworth, R., Karl, T. (2020). Cannabidiol (CBD) reduces cocaine-environment memory in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 199, 173065.

Chivero, E. T., Thangaraj, A., Tripathi, A., Periyasamy, P., Guo, M. L., Buch, S. (2021). NLRP3 inflammasome blockade reduces cocaine-induced microglial activation and neuroinflammation. *Molecular neurobiology*, 58, 2215-2230.

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

Clark, K. H., Wiley, C. A., Bradberry, C. W. (2013). Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotoxicity research*, 23, 174-188.

Cole, C., Jones, L., McVeigh, J., Kicman, A., Syed, Q., Bellis, M. (2011). Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug testing and analysis*, 3(2), 89-96.

Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A. E., Colleoni, M. (2004). Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *British journal of pharmacology*, 143(2), 247-250.

Cristino, L., Bisogno, T., Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 9-29.

Cronstein, B. N. (1994). Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *Journal of applied Physiology*, 76(1), 5-13.

Da Silva, M. C., Iglesias, L. P., Candelario-Jalil, E., Khoshbouei, H., Moreira, F. A., de Oliveira, A. C. P. (2023). Role of microglia in psychostimulant addiction. *Current Neuropharmacology*, 21(2), 235-259.

Daly, J. W., Fredholm, B. B. (1998). Caffeine - an atypical drug of dependence. *Drug and alcohol dependence*, 51(1-2), 199-206.

Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.

Di Chiara, G., Imperato, A. (1986). Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 473(1), 367-381.

Di Chiara, G., Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), 5274-5278.

Di Marzo, V. (2006). A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in pharmacological sciences*, 27(3), 134-140.

Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nature reviews Drug discovery*, 7(5), 438-455.

Dos-Santos-Pereira, M., Guimaraes, F. S., Del-Bel, E., Raisman-Vozari, R., Michel, P. P. (2020). Cannabidiol prevents LPS-induced microglial inflammation by inhibiting ROS/NF- κ B-dependent signaling and glucose consumption. *Glia*, 68(3), 561-573.

Echeverry, C., Fagetti, J., Reyes-Prada, M., Scorza, C. (2023). Neuroprotection by the cannabis-related products, cannabidiol and cannabigerol, and their associated mechanisms of action. *Medicinal Usage of Cannabis and Cannabinoids*, 197-205.

Echeverry, C., Reyes-Parada, M., Scorza, C. (2021). Constituents of Cannabis sativa. *Cannabinoids and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*, 1-9.

EISOhly, M. A., Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*, 78(5), 539-548.

Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G. I., Latina, V., De Filippis, D., Mariateresa, C., Carratù, M. R., Iuvone, T., Steardo, L. (2011). Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PloS one*, 6(12), e28668.

Everitt, B. J. (2014). Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories—indications for novel treatments of addiction. *European Journal of Neuroscience*, 40(1), 2163-2182.

Everitt, B. J., Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience*, 8(11), 1481-1489.

Everitt, B. J., Robbins, T. W. (2016). Drug addiction: updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annual review of psychology*, 67(1), 23-50.

Evrard, I., Legleye, S., Cadet-Taïrou, A. (2010). Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy*, 21(5), 399-406.

Ferré, S., Bonaventura, J., Tomasi, D., Navarro, G., Moreno, E., Cortés, A., Lluís, C., Casadó, V., Volkow, N. D. (2016). Allosteric mechanisms within the adenosine A2A–dopamine D2 receptor heterotetramer. *Neuropharmacology*, 104, 154-160.

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

Ferré, S., Fuxe, K., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P. (1997). Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, 20(10), 482-487.

Ferré, S., Lluís, C., Justinova, Z., Quiroz, C., Orru, M., Navarro, G., Canela, E., Franco, R., Goldberg, S. R. (2010). Adenosine–cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *British journal of pharmacology*, 160(3), 443-453.

Fiani, B., Sarhadi, K. J., Soula, M., Zafar, A., Quadri, S. A. (2020). Current application of cannabidiol (CBD) in the management and treatment of neurological disorders. *Neurological Sciences*, 41, 3085-3098.

Filip, M., Frankowska, M., Zaniewska, M., Przegaliński, E., Müller, C. E., Agnati, L., Franco, R., Roberts, D., Fuxe, K. (2006). Involvement of adenosine A2A and dopamine receptors in the locomotor and sensitizing effects of cocaine. *Brain research*, 1077(1), 67-80.

Franco, R., Reyes-Resina, I., Aguinaga, D., Lillo, A., Jiménez, J., Raïch, I., Borroto-Escuela, D., Ferreira-Vera, C., Canela, E., Sánchez de Medina, V., del Ser Badia, A., Fuxe, K., Saura, C., Navarro, G. (2019). Potentiation of cannabinoid signaling in microglia by adenosine A2A receptor antagonists. *Glia*, 67(12), 2410-2423.

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews*, 51(1), 83-133.

Freeman, T. P., Hindocha, C., Baio, G., Shaban, N. D., Thomas, E. M., Astbury, D., Abigail M Freeman, A. M., Lees, R., Craft, S., Morrison, P. D., Bloomfield, M., O’Ryan, D., Kinghorn, J., Prof Morgan, C., Mofeez, A., Curran, H. V. (2020). Cannabidiol for the treatment of cannabis use disorder: a phase 2a, double-blind, placebo-controlled, randomised, adaptive Bayesian trial. *The Lancet Psychiatry*, 7(10), 865-874.

Galaj, E., Bi, G. H., Yang, H. J., Xi, Z. X. (2020). Cannabidiol attenuates the rewarding effects of cocaine in rats by CB2, 5-HT1A and TRPV1 receptor mechanisms. *Neuropharmacology*, 167, 107740.

Galvalisi, M., Prieto, J. P., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J. A., Scorza, C. (2017). Caffeine induces a stimulant effect and increases dopamine release in the nucleus accumbens shell through the pulmonary inhalation route of administration in rats. *Neurotoxicity research*, 31, 90-98.

Gasparyan, A., Navarrete, F., García-Gutiérrez, M. S., Femenía, T., Manzanares, J., Maldonado, R. (2021). Cannabidiol modulates behavioural and gene expression alterations induced by spontaneous cocaine withdrawal. *Neurotherapeutics*, 18(1), 623–635.

Gonzalez-Cuevas, G., Garcia-Gutierrez, M. S., Navarrete, F., de Guglielmo, G., Manzanares, J. (2021). Cannabidiol Treatment in Neurotherapeutic Interventions. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 752292.

Gonzalez-Cuevas, G., Navarrete, F., Garcia-Gutierrez, M. S., de Guglielmo, G., Manzanares, J. (2023). Cannabidiol treatment in neurotherapeutic interventions, volume II. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1163991.

Górska, A. M., Gołombiowska, K. (2015). The role of adenosine A1 and A2A receptors in the caffeine effect on MDMA-induced DA and 5-HT release in the mouse striatum. *Neurotoxicity research*, 27, 229-245.

Gould, T. D., Dao, D. T., Kovacsics, C. E. (2009). *Open field test*. In *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests* (pp. 1-20). Humana Press.

GraphPad Prism v 8.0.0 for Windows, Graphpad Software, San Diego, California, USA. www.graphpad.com

Gray, J. H., Owen, R. P., Giacomini, K. M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflügers Archiv*, 447, 728-734.

Halbout, B., Hutson, C., Hua, L., Inshishian, V., Mahler, S. V., Ostlund, S. B. (2023). Long-term effects of THC exposure on reward learning and motivated behavior in adolescent and adult male rats. *Psychopharmacology*, 240(5), 1151-1167.

Harricharan, R., Abboussi, O., Daniels, W. M. (2017). Addiction: A dysregulation of satiety and inflammatory processes. *Progress in brain research*, 235, 65-91.

Haskó, G., Cronstein, B. N. (2004). *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. *1187 Trends Immunol.* 25 (1), 33-39.

Hatsukami, D. K., Fischman, M. W. (1996). Crack cocaine and cocaine hydrochloride: Are the differences myth or reality?. *Jama*, 276(19), 1580-1588.

Hindocha, C., Freeman, T. P., Grabski, M., Stroud, J. B., Crudgington, H., Davies, A. C., Das, R. K., Lawn, L., Morgan, C., Curran, H. V. (2018). Cannabidiol reverses attentional bias to cigarette cues in a human experimental model of tobacco withdrawal. *Addiction*, 113(9), 1696-1705.

Hoffman, R. S., Kirrane, B. M., Marcus, S. M., Clenbuterol Study Investigators. (2008). A descriptive study of an outbreak of clenbuterol-containing heroin. *Annals of emergency medicine*, 52(5), 548-553.

Hofford, R. S., Russo, S. J., Kiraly, D. D. (2019). Neuroimmune mechanisms of psychostimulant and opioid use disorders. *European Journal of Neuroscience*, 50(3), 2562-2573.

Hossain, M. K., Chae, H. J. (2024). Medical cannabis: From research breakthroughs to shifting public perceptions and ensuring safe use. *Integrative Medicine Research*, 101094.

Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., Porrino, L. J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 47, 345-358.

Huang, H., Wang, J., Zhang, J., Luo, Z., Li, D., Qiu, X., Peng, Y., Xu, Z., Xu, P., Xu, Z. (2017). Nitrobenzylthioinosine mimics adenosine to attenuate the epileptiform discharge of hippocampal neurons from epileptic rats. *Oncotarget*, 8(22), 35573.

Hurd, Y. L., Spriggs, S., Alishayev, J., Winkel, G., Gurgov, K., Kudrich, C., Oprescu A., Salsitz, E. (2019). Cannabidiol for the reduction of cue-induced craving and anxiety in drug-abstinent individuals with heroin use disorder: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 176(11), 911-922.

Iannotti, F. A., Hill, C. L., Leo, A., Alhusaini, A., Soubrane, C., Mazzarella, E., Russo, E., Whalley, B., Di Marzo, V., Stephens, G. J. (2014). Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels *in vitro*: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS chemical neuroscience*, 5(11), 1131-1141.

Ibeas Bih, C., Chen, T., Nunn, A. V., Bazelot, M., Dallas, M., Whalley, B. J. (2015). Blancos moleculares del cannabidiol en trastornos neurológicos. *Neuroterapéuticos*, 12(4), 699-730.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular brain research*, 57(1), 1-9.

Izzo, A. A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., Mechoulam, R. (2009). Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in pharmacological sciences*, 30(10), 515-527.

Jadoon, K. A., Ratcliffe, S. H., Barrett, D. A., Thomas, E. L., Stott, C., Bell, J. D., O'Sullivan, S. E., Tan, G. D. (2016). Efficacy and safety of cannabidiol and tetrahydrocannabivarin on glycemic and lipid parameters in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group pilot study. *Diabetes care*, 39(10), 1777-1786.

Kauer, J. A., Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews neuroscience*, 8(11), 844-858.

Kalivas, P. W., O'Brien, C. (2008). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 166-180.

Kalivas, P. W., Stewart, J. (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain research reviews*, 16(3), 223-244.

Karimi-Haghighi, S., Dargahi, L., Haghparast, A. (2020). Cannabidiol modulates the expression of neuroinflammatory factors in stress- and drug-induced reinstatement of methamphetamine in extinguished rats. *Addiction biology*, 25(2), e12740.

Karimi-Haghighi, S., Razavi, Y., Iezzi, D., Scheyer, A. F., Manzoni, O., Haghparast, A. (2022). Cannabidiol and substance use disorder: Dream or reality. *Neuropharmacology*, 207, 108948.

Katsidoni, V., Anagnostou, I., Panagis, G. (2013). Cannabidiol inhibits the reward-facilitating effect of morphine: involvement of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal raphe nucleus. *Addiction biology*, 18(2), 286-296.

Kessler, F. H., von Diemen, L., Ornell, F., Sordi, A. O. (2021). Cannabidiol and mental health: possibilities, uncertainties, and controversies for addiction treatment. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 43(5), 455-457.

Kohno, M., Link, J., Dennis, L. E., McCready, H., Huckans, M., Hoffman, W. F., Loftis, J. M. (2019). Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 179, 34-42.

Kohno, M., Loftis, J. M., Huckans, M., Dennis, L. E., McCready, H., Hoffman, W. F. (2018). The relationship between interleukin-6 and functional connectivity in methamphetamine users. *Neuroscience letters*, 677, 49-54.

Koob, G. F., Arends, M. A., McCracken, M. L., Le Moal, M. (2020). *Psychostimulants* (Vol. 2). Academic Press.

Koob, G. F., Moal, M. L. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278(5335), 52-58.

Koob, G. F., Le Moal, M. (2008). Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3113-3123.

Koob, G. F., Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238.

Kubera, M., Filip, M., Basta-Kaim, A., Nowak, E., Siwanowicz, J., Zajicova, A., Holan, V., Maes, M., Lasoń, W. (2004). The effect of cocaine sensitization on mouse immunoreactivity. *European journal of pharmacology*, 483(2-3), 309-315.

Kudlacek, O., Hofmaier, T., Luf, A., Stockner, T., Nagy, C., Holy, M., Freissmuth, M., Schmid, R., Sitte, H. H. (2017). Cocaine Adulterants and Effects on Monoamine Transporters. In *The Neuroscience of Cocaine* (pp. 59-68). Academic Press.

Lacagnina, M. J., Rivera, P. D., Bilbo, S. D. (2017). Glial and neuroimmune mechanisms as critical modulators of drug use and abuse. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 156-177.

Lago-Fernandez, A., Zarzo-Arias, S., Jagerovic, N., Morales, P. (2021). Relevance of peroxisome proliferator activated receptors in multitarget paradigm associated with the endocannabinoid system. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1001.

Laksmidewi, A. P., Soejitno, A. (2021). Endocannabinoid and dopaminergic system: the pas de deux underlying human motivation and behaviors. *Journal of Neural Transmission*, 128, 615-630.

LaVoie, M. J., Card, J. P., Hastings, T. G. (2004). Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Experimental neurology*, 187(1), 47-57.

Ledesma, J. C., Manzanedo, C., Aguilar, M. A. (2021). Cannabidiol prevents several of the behavioral alterations related to cocaine addiction in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 111, 110390.

Lewitus, G. M., Konefal, S. C., Greenhalgh, A. D., Pribiag, H., Augereau, K., Stellwagen, D. (2016). Microglial TNF- α suppresses cocaine-induced plasticity and behavioral sensitization. *Neuron*, 90(3), 483-491.

Ligresti, A., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. (2016). From phytocannabinoids to cannabinoid receptors and endocannabinoids: pleiotropic physiological and pathological roles through complex pharmacology. *Physiological reviews*.

Lin, X. H., Yuece, B., Li, Y. Y., Feng, Y. J., Feng, J. Y., Yu, L. Y., Li, K. Y., Li, N., Storr, M. (2011). A novel CB receptor GPR55 and its ligands are involved in regulation of gut movement in rodents. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(9), 862-e342.

Liou, G. I., Auchampach, J. A., Hillard, C. J., Zhu, G., Yousufzai, B., Mian, S., Khan, S., Khalifa, Y. (2008). Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(12), 5526-5531.

Lopes, L., Sebastiao, A., Ribeiro, J. (2011). Adenosine and related drugs in brain diseases: present and future in clinical trials. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(8), 1087-1101.

López-Hill, X., Prieto, J. P., Meikle, M. N., Urbanavicius, J., Abin-Carriquiry, J. A., Prunell, G., Umpiérrez, E., Scorza, M. C. (2011). Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis,

stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behavioural brain research*, 221(1), 134-141.

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

Maa, E., Figi, P. (2014). The case for medical marijuana in epilepsy. *Epilepsia*, 55(6), 783-786.

Machado Bergamaschi, M., Helena Costa Queiroz, R., Waldo Zuardi, A., Crippa, A. S. (2011). Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Current drug safety*, 6(4), 237-249.

Maeda, T., Kiguchi, N., Fukazawa, Y., Yamamoto, A., Ozaki, M., Kishioka, S. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation relieves expression of behavioral sensitization to methamphetamine in mice. *Neuropsychopharmacology*, 32(5), 1133-1140.

Maldonado, R., Calvé, P., García-Blanco, A., Domingo-Rodríguez, L., Senabre, E., Martín-García, E. (2021). Vulnerability to addiction. *Neuropharmacology*, 186, 108466.

Malvestio, R. B., Medeiros, P. D., Negrini-Ferrari, S. E., Oliveira-Silva, M., Medeiros, A. C., Padovan, C. M., Luongo, L., Maione, S., Coimbra, N. C., de Freitas, R. L. (2021). Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT1A and CB1 receptors. *Brain Research Bulletin*, 174, 323-338.

Marco, E. M., García-Gutiérrez, M. S., Bermúdez-Silva, F. J., Moreira, F. A., Guimarães, F., Manzanares, J., Viveros, M. P. (2011). Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 63.

Martinez Naya, N., Kelly, J., Corna, G., Golino, M., Polizio, A. H., Abbate, A., Toldo, S., Mezzaroma, E. (2024). An Overview of Cannabidiol as a Multifunctional Drug: Pharmacokinetics and Cellular Effects. *Molecules*, 29(2), 473.

Martínez-Tapiaa, R. J., Estrada-Rojoa, F., Hernández-Chávezc, A. A., Barajas-Martíneza, A., Escotoa, S., Navarro, L., Chavarríad, A. (2018). Neuroinflamación: el ying-yang de la neuroinmunología. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 61(5).

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564.

McPartland, J. M., Glass, M., Pertwee, R. G. (2007). Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *British journal of pharmacology*, 152(5), 583-593.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.

Melis, M., Carta, S., Fattore, L., Tolu, S., Yasar, S., Goldberg, S. R., Fratta, W., Maskos, U., Pistis, M. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptors- α modulate dopamine cell activity through nicotinic receptors. *Biological psychiatry*, 68(3), 256-264.

Miller, W. R., Fox, R. G., Stutz, S. J., Lane, S. D., Denner, L., Cunningham, K. A., Dineley, K. T. (2018). PPAR γ agonism attenuates cocaine cue reactivity. *Addiction biology*, 23(1), 55-68.

Moreira, F. P., Medeiros, J. R. C., Lhullier, A. C., de Mattos Souza, L. D., Jansen, K., Portela, L. V., Lara, D., da Silva, R., Wiener, D., Oses, J. P. (2016). Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug and alcohol dependence*, 158, 181-185.

Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., Ceru, M. P. (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123(1), 131-145.

Muller, C., Morales, P., Reggio, P. H. (2019). Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 487.

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

Murillo-Rodríguez, E., Machado, S., Imperatori, C., Yamamoto, T., Budde, H. (2021). Natural cannabinoids as templates for sleep disturbances treatments. *Cannabinoids and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*, 133-141.

Narendran, R., Lopresti, B. J., Mason, N. S., Deutch, L., Paris, J., Himes, M. L., Kodavali, C., Nimgaonkar, V. L. (2014). Cocaine abuse in humans is not associated with increased microglial activation: an 18-kDa translocator protein positron emission tomography imaging study with [^{11}C] PBR28. *Journal of Neuroscience*, 34(30), 9945-9950.

Navarrete, C., García-Martín, A., Rolland, A., DeMesa, J., Muñoz, E. (2021a). Cannabidiol and other cannabinoids in demyelinating diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2992.

Navarrete, F., García-Gutiérrez, M. S., Gasparyan, A., Navarro, D., Manzanares, J. (2021b). CB2 receptor involvement in the treatment of substance use disorders. *Biomolecules*, 11(11), 1556.

Nestler, E. J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction?. *Nature neuroscience*, 8(11), 1445-1449.

Niu, F., Liao, K., Hu, G., Sil, S., Callen, S., Guo, M. L., Yang, L., Buch, S. (2019). Cocaine-induced release of CXCL10 from pericytes regulates monocyte transmigration into the CNS. *Journal of Cell Biology*.

Noji, T., Takayama, M., Mizutani, M., Okamura, Y., Takai, H., Karasawa, A., Kusaka, H. (2002). KF24345, an adenosine uptake inhibitor, suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production and leukopenia via endogenous adenosine in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1), 200-205.

Northcutt, A. L., Hutchinson, M. R., Wang, X., Baratta, M. V., Hiranita, T., Cochran, T. A., Pomrenze, M., Galer, E., Kopajtic, T., Amat, J., Li, C., Larson, G., Cooper, D., Huang, Y., O'Neill, C., Yin, H., Zahniser, N., Katz, J., Rice, K., Maier, S., Bachtell, R., Watkins, L. (2015). DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Molecular psychiatry*, 20(12), 1525-1537.

Observatorio Uruguayo de Drogas (2014). Informe Nacional sobre Drogas 2014. Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República Oriental del Uruguay.

Observatorio Uruguayo de Drogas (2020). VIII Encuesta Nacional sobre Consumo de Drogas en Estudiantes de Enseñanza Media 2018. Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República Oriental del Uruguay.

Observatorio Uruguayo de Drogas (2024). VIII Encuesta Nacional sobre Consumo de Drogas en Población General. Hoja de datos. Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República Oriental del Uruguay.

Odieka, A. E., Obuzor, G. U., Oyedeji, O. O., Gondwe, M., Hosu, Y. S., Oyedeji, A. O. (2022). The medicinal natural products of Cannabis sativa Linn.: A review. *Molecules*, 27(5), 1689.

Olsen, Y. (2022). What is addiction? History, terminology, and core concepts. *Medical Clinics*, 106(1), 1-12.

Orihuel, J., Capellán, R., Roura-Martínez, D., Ucha, M., Ambrosio, E., Higuera-Matas, A. (2021). Δ 9-Tetrahydrocannabinol during adolescence reprograms the nucleus accumbens transcriptome, affecting reward processing, impulsivity, and specific aspects of cocaine addiction-like behavior in a sex-dependent manner. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 24(11), 920-933.

Orrú, M., Quiroz, C., Guitart, X., Ferré, S. (2011). Pharmacological evidence for different populations of postsynaptic adenosine A2A receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology*, 61(5-6), 967-974.

Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 58(3), 389-462.

Pandolfo, P., Silveirinha, V., dos Santos-Rodrigues, A., Venance, L., Ledent, C., Takahashi, R. N., Cunha, R. A., Köfalvi, A., (2011) Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *European Journal Pharmacology*, 655(1-3), 38–45.

Parker, L. A., Burton, P., Sorge, R. E., Yakiwchuk, C., Mechoulam, R. (2004). Effect of low doses of Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. *Psychopharmacology*, 175, 360-366.

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

Pascale, A., Negrin, A., Laborde, A. (2010). Pasta base de cocaína: experiencia del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico. *Adicciones*, 22(3), 227-232.

Pavlovsky, F., Groisman, R., Hurtado, A. K., García, L. (2022). Cannabis de grado médico para el tratamiento de la dependencia a Δ -9-Tetrahydrocannabinol. *Vertex Revista Argentina de Psiquiatría*, 33(157, jul.-sept.), 34-43.

Paxinos, G., Franklin, K. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.

Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., Luo, J. (2022). A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 130(4), 439-456.

Pertwee, R. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 74(2), 129-180.

Pertwee, R. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. *British journal of pharmacology*, 153(2), 199-215.

Pichini, S., Busardò, F. P., Gregori, A., Berretta, P., Gentili, S., Pacifici, R. (2016). Purity and adulterant analysis of some recent drug seizures in Italy. *Drug testing and analysis*, 9(3), 485-490.

Pierce, R. C., Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain research reviews*, 25(2), 192-216.

Pinto-Duarte, A., Coelho, J. E., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M. (2005). Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 93(3), 595-604.

Prieto, J. P., Galvalisi, M., López-Hill, X., Meikle, M. N., Abin-Carriquiry, J. A., Scorza, C. (2015). Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *The American journal on addictions*, 24(5), 475-481.

Prieto, J. P., González, B., Muñiz, J., Bisagno, V., Scorza, C. (2020a). Molecular changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex associated with the locomotor sensitization induced by coca paste seized samples. *Psychopharmacology*, 237, 1481-1491.

Prieto, J. P., López Hill, X., Urbanavicius, J., Sanchez, V., Nadal, X., Scorza, C. (2020b). Cannabidiol prevents the expression of the locomotor sensitization and the metabolic changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex elicited by the combined administration of cocaine and caffeine in rats. *Neurotoxicity Research*, 38, 478-486.

Prieto, J. P., Scorza, C., Serra, G. P., Perra, V., Galvalisi, M., Abin-Carriquiry, J. A., Piras, G., Valentini, V. (2016). Caffeine, a common active adulterant of cocaine, enhances the reinforcing effect of cocaine and its motivational value. *Psychopharmacology*, 233, 2879-2889.

Razavi, Y., Shabani, R., Mehdizadeh, M., Haghparast, A. (2020). Neuroprotective effect of chronic administration of cannabidiol during the abstinence period on methamphetamine-induced impairment of recognition memory in the rats. *Behavioural Pharmacology*, 31(4), 385-396.

Renard, J., Loureiro, M., Rosen, L. G., Zunder, J., De Oliveira, C., Schmid, S., Rushlow, W., Laviolette, S. R. (2016). Cannabidiol counteracts amphetamine-induced neuronal and behavioral sensitization of the mesolimbic dopamine pathway through a novel mTOR/p70S6 kinase signaling pathway. *Journal of Neuroscience*, 36(18), 5160-5169.

Rezende, B., Alencar, A. K. N., de Bem, G. F., Fontes-Dantas, F. L., Montes, G. C. (2023). Endocannabinoid system: chemical characteristics and biological activity. *Pharmaceuticals*, 16(2), 148.

Richeri, A., Bianchimano, P., Mármol, N. M., Viettro, L., Cowen, T., Brauer, M. M. (2005). Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *Journal of anatomy*, 207(2), 125-134.

Robinson, T. E., Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain research reviews*, 18(3), 247-291.

Romero-Sandoval, A., Chai, N., Nutile-McMenemy, N., DeLeo, J. A. (2008). A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain research*, 1219, 116-126.

Ronsley, C., Nolan, S., Knight, R., Hayashi, K., Klimas, J., Walley, A., Wood, E., Fairbairn, N. (2020). Treatment of stimulant use disorder: a systematic review of reviews. *PLoS one*, 15(6), e0234809.

Russo, E. B., Burnett, A., Hall, B., Parker, K. K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochemical research*, 30, 1037-1043.

Sánchez-Fernández, N., Gómez-Acero, L., Sarasola, L. I., Argerich, J., Chevigné, A., Jacobson, K. A., Ciruela, F., Fernández-Dueña, V., Aso, E. (2024). Cannabidiol negatively modulates adenosine A_{2A} receptor functioning in living cells. *Acta Neuropsychiatrica*, 36(5), 320-324.

Saravia, R., Ten-Blanco, M., Grande, M. T., Maldonado, R., Berrendero, F. (2019). Anti-inflammatory agents for smoking cessation? Focus on cognitive deficits associated with nicotine withdrawal in male mice. *Brain, behavior, and immunity*, 75, 228-239.

Scorza, C., Prieto, J. P., Fabius, S. (2022). Caffeine as an active adulterant: implication for drugs of abuse consumption. In *Handbook of Substance Misuse and Addictions: From Biology to Public Health* (pp. 1-12). Cham: Springer International Publishing.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.

Schouten, M., Dalle, S., Mantini, D., Koppo, K. (2024). Cannabidiol and brain function: current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1328885.

Sekine, Y., Ouchi, Y., Sugihara, G., Takei, N., Yoshikawa, E., Nakamura, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K. J., Suda, S., Suzuki, K., Kawai, M., Takebayashi, K., Yamamoto, S., Matsuzaki, H., Ueki, T., Mori, N., Gold, M. S., Cadet, J. L. (2008). Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *Journal of Neuroscience*, 28(22), 5756-5761.

Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 127(7), 624-633.

Sil, S., Niu, F., Tom, E., Liao, K., Periyasamy, P., Buch, S. (2019). Cocaine mediated neuroinflammation: role of dysregulated autophagy in pericytes. *Molecular neurobiology*, 56, 3576-3590.

Solimini, R., C. Rotolo, M., Pellegrini, M., Minutillo, A., Pacifici, R., P. Busardò, F., Zaami, S. (2017). Adulteration practices of psychoactive illicit drugs: an updated review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(7), 524-530.

Solinas, M., Goldberg, S. R., Piomelli, D. (2008). The endocannabinoid system in brain reward processes. *British journal of pharmacology*, 154(2), 369-383.

Strang, J., Bearn, J., Farrell, M., Finch, E., Gossop, M., Griffiths, P., Marsden, J., Wolff, K. (1998). Route of drug use and its implications for drug effect, risk of dependence and health consequences. *Drug and Alcohol Review*, 17(2), 197-211.

Thomas, M. J., Kalivas, P. W., Shaham, Y. (2008). Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *British journal of pharmacology*, 154(2), 327-342.

Tortorelli, L. S., Engelke, D. S., Lunardi, P., e Souza, T. M., Santos-Junior, J. G., Goncalves, C. A. (2015). Cocaine counteracts LPS-induced hypolocomotion and triggers locomotor sensitization expression. *Behavioural Brain Research*, 287, 226-229.

UNODC, Cocaine – a spectrum of products, Cocaine Insights 2, UNODC, Vienna, October 2021.

Vecchini Rodríguez, C. M., Escalona Meléndez, Y., Flores-Otero, J. (2021). Cannabinoid Receptors and Ligands: lessons from CNS disorders and the quest for novel treatment venues. *Cannabinoids and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*, 43-64.

Viudez-Martínez, A., García-Gutiérrez, M. S., Fraguas-Sánchez, A. I., Torres-Suárez, A. I., Manzanares, J. (2018). Effects of cannabidiol plus naltrexone on motivation and ethanol consumption. *British journal of pharmacology*, 175(16), 3369-3378.

Viudez-Martínez, A., García-Gutiérrez, M. S., Medrano-Relinque, J., Navarrón, C. M., Navarrete, F., Manzanares, J. (2019). Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3), 358-364.

Volkow, N. D., Blanco, C. (2023). Substance use disorders: a comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. *World Psychiatry*, 22(2), 203-229.

Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R., Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56, 3-8.

Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Tomasi, D., Telang, F. (2011). Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15037-15042.

Walsh, R. N., Cummins, R. A. (1976). *The Open-Field Test: A Critical Review*. *Psychological Bulletin*, 83(3), 482–504.

World Health Organization. (2024). *Global status report on alcohol, health and treatment of substance use disorders*. World Health Organization.

Yamada, S., Van Kooten, N., Mori, T., Taguchi, K., Tsujimura, A., Tanaka, M. (2021). Efferent and afferent connections of neuropeptide Y neurons in the nucleus accumbens of mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15, 741868.

Yndart Arias, A., Vadell, K., Vashist, A., Kolishetti, N., Lakshmana, M. K., Nair, M., Liuzzi, J. P. (2024). Cannabidiol, a plant-derived compound, is an emerging strategy for treating cognitive impairments: comprehensive review of randomized trials. *Frontiers in Pharmacology*, *15*, 1403147.

Xiao, C., Gavrilova, O., Liu, N., Lewicki, S. A., Reitman, M. L., Jacobson, K. A. (2023). *In vivo* phenotypic validation of adenosine receptor-dependent activity of non-adenosine drugs. *Purinergic Signalling*, *19*(3), 551-564.

Xu, Z., Xu, P., Chen, Y., Liu, J., Zhang, Y., Lv, Y., Luo, J., Fang, M., Zhang, J., Wang, J., Wang, K., Wang, X., Chen, G. (2015). ENT1 inhibition attenuates epileptic seizure severity via regulation of glutamatergic neurotransmission. *Neuromolecular medicine*, *17*, 1-11.

FINANCIACIÓN

Beca de Maestría, ANII (2022 - 2024)

Beca para finalización de Maestría, CAP (2024 - 2025)

PEDECIBA (alícuotas 2022 - 2024)

Proyecto Fondo Clemente Estable (2022 - 2024)