

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología  
Subárea Neurociencias

**ESTUDIO PRE-CLÍNICO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA  
DEPENDENCIA A PASTA BASE DE COCAÍNA.  
ROL DE LA CAFEÍNA COMO PRINCIPAL ADULTERANTE**

Lic. José Pedro Prieto

Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Departamento de Neurofarmacología Experimental  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Junio 2015

## AGRADECIMIENTOS

Que el trabajo condensado en esta Tesis, así como la Tesis misma, se haya podido realizar fue debido a los aportes y el apoyo de varias personas, con quienes estoy enormemente agradecido.

Los miembros del tribunal, Pablo, Daniel y Rudy, se tomaron el tiempo de corregir esta Tesis, realizaron contribuciones importantes y me marcaron caminos por dónde seguir explorando.

Cecilia me dio la oportunidad de dedicarme a la investigación y desde hace años me impulsa a desarrollar mi vocación. En este período he aprendido muchísimo de ella, y me ha ayudado a superarme, confiando en que podría con desafíos aun cuando yo dudaba. Su preocupación constante por que podamos trabajar en ciencia hizo posible esta maestría.

Mis compañeros de laboratorio, Jess, Xime, Martín, Analía, Gaby, las dos Paolas, Mica y Mónica me brindaron una ayuda inconmensurable en todos estos años. Me enseñaron y dieron una mano no sólo en los experimentos, sino en todas las tareas asociadas a esta actividad. Les estoy agradecido por compartir los éxitos y dificultades de la tarea científica, y buena disposición de siempre.

Valentina, Giovanna, Valentina P, Gian Pietro y Fabio me recibieron en su laboratorio como a un amigo cercano, y les debo una de las mejores experiencias que tuve en el mundo de la ciencia. Gracias a ellos aprendí muchísimo y disfruté todavía más.

Héctor, Carmen y Martín se encargaron del cuidado de los animales. Su trabajo fue crucial para el buen desarrollo de los experimentos.

Los amigos de dentro y fuera de la academia, quienes me han apoyado en este proceso a veces hasta sin quererlo, desde el inicio hasta el final sus conversaciones y apoyo me animaron a seguir adelante.

Mi familia, en especial mi madre, mi hermana y mi padre, y la familia Castrillejo me dieron desde siempre un apoyo incondicional y una ayuda gigantesca que me permitió en gran medida haber realizado esta maestría.

Mariana me acompañó en este viaje y su apoyo va más allá de lo que pueda medir. Sobre todas las cosas le agradezco esa compañía, y que a su vez me permita acompañarla.

Se termina un viaje, empieza otro.

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>PRESENTACIÓN DE TESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
1. PASTA BASE DE COCAÍNA .....	4
1.1 Definición de Pasta Base de Cocaína .....	4
1.2 Características del consumo y formas de PBC .....	5
1.3 Vía de administración, efectos centrales y periféricos .....	6
2. ADICCIÓN A DROGAS DE ABUSO .....	8
2.1 Definición de adicción y etapas del ciclo adictivo .....	8
2.2 Neurobiología de acción de drogas de abuso: circuito motivacional .....	9
2.3 Fenómeno de sensibilización comportamental .....	12
2.4 Efectos de la cocaína sobre la transmisión DAérgica en el NAcc .....	13
2.5 Aspectos Motivacionales .....	14
3. ANTECEDENTES DE TRABAJO .....	15
3.1 Composición química de muestras incautadas de Pasta Base de Cocaína .....	15
3.2 Efecto farmacológico agudo de PBC .....	17
3.3 Mecanismo de acción de cafeína .....	18
3.4 Interacción entre cocaína y cafeína .....	19
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>22</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Estudio del fenómeno de sensibilización comportamental inducido por PBC .....	24

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Determinación del fenómeno de sensibilización neuroquímica inducido por el sucedáneo de PBC.....	27
OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Estudio de la propiedad motivacional del sucedáneo de PBC.....	30
<b>RESULTADOS I .....</b>	<b>35</b>
1.1 Evaluación del desarrollo y expresión de la sensibilización comportamental inducida por una muestra de PBC con alto contenido en cocaína y cafeína (PBC1), mediante el análisis de la actividad locomotora en el modelo de CA. ....	35
1.2 Determinación de la contribución de cocaína y cafeína al fenómeno de sensibilización comportamental inducida por PBC.....	36
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS I.....</b>	<b>40</b>
<b>RESULTADOS II .....</b>	<b>45</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS II.....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS III .....</b>	<b>55</b>
3.1 Evaluación del efecto motivacional de la combinación de cocaína y cafeína mediante la evaluación del comportamiento de búsqueda de droga y su comparación con cocaína, utilizando el modelo de autoadministración en ratas. ....	55
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS III.....</b>	<b>59</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>62</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>63</b>
<b>TRABAJOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>66</b>

## ABREVIATURAS

---

5-HIAA: Ácido 5-hidroxi-indolacético

ATV: Área Tegmental Ventral

BP: *Breaking Point*

CA: Campo Abierto

Caf: Cafeína

Coc: Cocaína

CPF: Corteza Prefrontal

DA: Dopamina

DAT: Transportador de Dopamina

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético

HVA: Ácido Homovanílico

NAcc: Núcleo *Accumbens*

NEMs: Neuronas Espinosas Medias

NST: Núcleo Subtalámico

PBC: Pasta Base de Cocaína

PKA: Proteína Quinasa dependiente de AMPc

PP-1: Proteína fosfatasa 1

PVe: Pálido Ventral externo

PVi: Pálido Ventral interno

SNpc: Sustancia Nigra pars compacta

SNpr: Sustancia Nigra pars reticulata

SNC: Sistema Nervioso Central

## RESUMEN

---

La Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso. Surge de las etapas tempranas en el procesamiento químico de las hojas de coca hasta la obtención final de la cocaína en su forma clorhidrato. Así, el alcaloide cocaína (en su forma de base) es uno de los principales componentes de la PBC.

El consumo crónico de PBC induce un perfil clínico caracterizado por la aparición de una rápida y fuerte dependencia, junto a otras alteraciones conductuales y fisiológicas. Dicho perfil se diferencia al inducido por el clorhidrato de cocaína. Si bien se ha avanzado en el estudio de algunos de los efectos que induce la PBC en el Sistema Nervioso Central (SNC), aún no se conocen completamente los factores que expliquen dicho perfil.

Interesados en la caracterización de los efectos de la PBC en el SNC nuestro grupo de trabajo estudió el efecto estimulante agudo en ratas inducido por muestras incautadas de PBC, teniendo en cuenta la composición química de varias muestras. Los resultados del análisis químico mostraron que cocaína aparece en cantidades variables en las muestras y que cafeína fue el principal adulterante activo encontrado en PBC. Si bien ambos componentes resultaron ser los responsables del efecto estimulante, a determinadas dosis se evidenció un efecto aditivo entre cocaína y cafeína. Basados en estos antecedentes, el trabajo de tesis se centró en el estudio de los efectos comportamentales y neuroquímicos inducidos por PBC utilizando modelos vinculados a procesos de adicción. Además se estudió el papel que juegan la cocaína y cafeína en dichos efectos.

Para llevar a cabo este estudio se analizó la capacidad de la muestra incautada PBC 1 y su sucedáneo de cocaína y cafeína de inducir el fenómeno de sensibilización comportamental, en comparación con cocaína. Se cuantificó la actividad locomotora de los animales bajo dos protocolos de administración repetida (5 y 3 días) y un período de abstinencia (5 días). Además, se evaluó el correlato neuroquímico de la sensibilización comportamental mediante la cuantificación de los niveles extracelulares de dopamina (DA) en el Núcleo Accumbens *core* (NAcc *core*) luego del protocolo de sensibilización de 3 días y un período de abstinencia (5 días). Por otra parte, se utilizó el modelo de autoadministración intravenosa con régimen progresivo para evaluar el comportamiento de búsqueda de droga y la motivación de los animales por obtener el sucedáneo de PBC en comparación con cocaína.

Los resultados indicaron que, tanto PBC 1 como cocaína, indujeron el fenómeno de sensibilización comportamental luego de 5 días de tratamiento, siendo mayor la expresión de la sensibilización en el grupo pre-tratado con PBC 1. La presencia de cafeína fue capaz de potenciar y acelerar la sensibilización inducida por cocaína, de forma tal que la combinación de ambas (actuando como sucedáneo de la PBC) indujo la sensibilización con sólo 3 días de tratamiento, mientras que para cocaína, este

tiempo no fue suficiente para inducir el fenómeno. Tanto el sucedáneo de PBC como la cocaína indujeron el fenómeno de sensibilización neuroquímica de manera similar. La presencia de cafeína no incidió en la liberación de DA en este núcleo.

Los experimentos de autoadministración demostraron que animales tratados con la combinación de cocaína y cafeína presentaron un mayor *breaking point* que los animales tratados con cocaína, evidenciando una mayor motivación por la obtención de la droga.

El conjunto de resultados resaltan la interacción entre cocaína y cafeína en los efectos comportamentales vinculados al poder adictivo de la PBC. Además, sugieren que la presencia de cafeína en muestras incautadas de PBC podría colaborar en la fuerte dependencia inducida por esta droga.

## PRESENTACIÓN DE TESIS

---

La Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso cuyo consumo se instauró en el mercado de drogas de Uruguay en el año 2002, asociado a una importante crisis económica (JND 2007). Su consumo crónico desencadena una fuerte y rápida dependencia, lo que conlleva un fuerte impacto en la salud de sus usuarios (Triaca y cols. 2009). En ellos se describe un perfil clínico característico, que se diferencia de otras drogas como la cocaína o el alcohol. A su vez, el consumo de PBC se instauró principalmente en individuos jóvenes y en situaciones vulnerables, y frecuentemente se lo asocia con actividades ilícitas y de violencia por parte de los usuarios (Pascale y cols. 2014). La necesidad de contar con información sobre los efectos neurobiológicos inducidos por ésta droga impulsó nuestro interés por investigar en este tema. Si bien hemos avanzado en el estudio de los efectos farmacológicos de la PBC en sistema nervioso central (SNC), aún no conocemos los factores que podrían explicar la alta dependencia inducida por esta droga.

Esta Tesis propone abordar esta interrogante mediante el análisis de procesos directamente relacionados con el desarrollo de la adicción, como lo son el fenómeno de sensibilización comportamental, los cambios neuroquímicos asociados, y el estado motivacional por la búsqueda de la droga. La presente Tesis expone la importancia de los adulterantes en las drogas de abuso, y en particular, el rol de la cafeína y su interacción con la cocaína presente en la PBC como uno de los factores que parece contribuir al fuerte *craving* y búsqueda experimentada por sus consumidores.



# INTRODUCCIÓN

---

## 1. PASTA BASE DE COCAÍNA

### 1.1 Definición de Pasta Base de Cocaína

La Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso con propiedades psicoestimulantes, consumida en varios países de Sudamérica. La misma constituye un producto intermedio en el proceso de extracción del alcaloide cocaína (Figura 1), a partir de las hojas de coca del arbusto *Erythroxylum coca*, hasta la obtención final del clorhidrato de cocaína (Castaño 2000). Dicho proceso generalmente implica la maceración de las hojas de coca en una solución con amoníaco u otra sustancia alcalina, solventes orgánicos como Kerosene o gasoil, y ácido sulfúrico (Figura 1). La mezcla resultante contiene un porcentaje variable de cocaína en su forma de base, e impurezas que surgen del procesamiento químico, como restos de solventes y metabolitos de la planta (Castaño 2000; ElSohly y cols. 1991; JND 2007). Finalizado este proceso, la PBC tiene la apariencia de un polvo de consistencia pastosa y color blanco amarillento o amarronado, dependiendo del grado de avance del proceso de purificación y cantidad de cocaína e impurezas que contenga la mezcla.

A su vez, como todas las drogas ilícitas, la PBC se vende con el agregado de sustancias adulterantes. Los adulterantes se clasifican en dos tipos: los inactivos, definidos como aquellas sustancias que se agregan exclusivamente con el fin de aumentar su volumen y así aumentar el rédito económico del que las vende; y los activos, definidos como aquellas sustancias que poseen la capacidad de imitar o potenciar los efectos de la droga (Cole y cols. 2010). Estos últimos pueden poseer un efecto psicoactivo, por lo que constituyen un factor relevante que debe ser considerado a la hora de estudiar los efectos neurobiológicos de drogas ilegales de abuso.



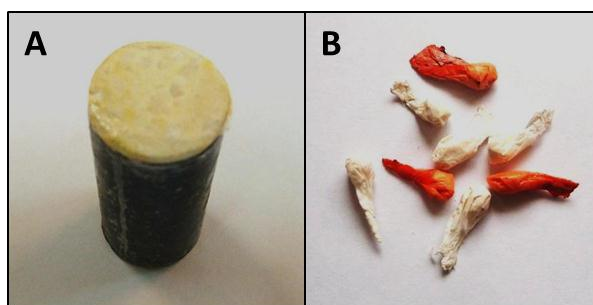
**Figura 1.** Esquema del proceso de elaboración de pasta base de cocaína y clorhidrato de cocaína en tres diferentes fases. Puede apreciarse la pasta base de cocaína como un producto intermedio en la purificación del alcaloide cocaína en su forma de clorhidrato, a partir de las hojas de coca.

## 1.2 Características del consumo y formas de PBC

El consumo de PBC en Latinoamérica está reportado desde las décadas del 70 y 80, en principio delimitado a los países productores de clorhidrato de cocaína como Colombia, Bolivia y Perú, siendo éste último donde se describió el primer caso clínico de adicción a PBC (Jeri y cols. 1978; UNODC 2013). Posteriormente su consumo se extendió hacia el sur, instalándose en Paraguay, Chile, Brasil y Argentina, probablemente impulsado por su bajo costo, fácil acceso y la prohibición de venta de precursores químicos de clorhidrato de cocaína (Pascale y cols. 2014). En Uruguay existen registros de la presencia de PBC desde el año 2000, aunque su consumo se expandió e instauró definitivamente en el mercado de drogas a partir del año 2002, favorecido por la crisis económica y la ausencia de otras drogas como la cocaína y marihuana en el período 2002-2004 (JND 2007; JND 2008).

De acuerdo con la 5ta Encuesta Nacional en Hogares sobre Consumo de Drogas (JND, 2012) el consumo de PBC en nuestro país presenta una prevalencia anual de 0,4 %; una prevalencia baja en comparación con otras drogas de abuso como la cocaína y marihuana. De hecho, la PBC ocupa el sexto lugar en la lista de drogas más consumidas, después del alcohol, tabaco, tranquilizantes, marihuana y cocaína. Aun así, es importante tener en cuenta que el consumo de PBC se encuentra heterogéneamente distribuido en las diferentes regiones geográficas (segmentación territorial y socioeconómica), de forma que en zonas más vulnerables, al norte y oeste de Montevideo, su prevalencia anual alcanza el 4 % (JND, 2013). Pese a su baja prevalencia, las características y consecuencias de su consumo a nivel social y sanitario hacen que la droga posea una alta visibilidad, y sea al día de hoy uno de los principales problemas en materia de drogas ilegales de nuestro país.

La PBC se comercializa principalmente bajo dos formas: la “tiza” para el tráfico internacional, y “gota” o “chasqui”, que es la forma que se vende dosificada al consumidor (Figura 2). Si bien es difícil constatar exactamente la cantidad que contiene cada muestra, se considera que cada chasqui o “dosis” posee entre 0,1-0,5 gr. de PBC, mientras que las tizas pesan entre 10-15 gr. Se ha estimado que los consumidores dependientes de PBC pueden consumir más de 20 dosis por día, lo que daría un consumo diario de hasta 10-20 gr.; una cantidad importante si se considera que entre los consumidores de cocaína el máximo suele ser entre 2-3 gr. por día (William Garzón, comunicación personal). Aún no está claro si el alto consumo de dosis por día se debe al bajo contenido en cocaína que podrían contener las muestras de PBC, o si está asociado a un componente compulsivo de búsqueda y consumo, característico de la adicción.



**Figura 2.** Muestras representativas de PBC en su formato tiza (A) y chasqui (B)

### 1.3 Vía de administración, efectos centrales y periféricos

La PBC es una forma básica de cocaína, por lo que a diferencia del clorhidrato de cocaína, posee un punto de volatilización bajo y además es sublimable. Estas propiedades determinan que la vía de consumo más común de la PBC sea la inhalación pulmonar, definiéndose así como una cocaína fumable. La misma se consume mediante pipas u otros dispositivos similares de fabricación casera, y puede fumarse mezclada con otras drogas como tabaco y marihuana (Pascale y cols. 2010, Pascale y cols. 2014).

La gran irrigación a nivel pulmonar facilita que luego de su inhalación los componentes de la PBC se absorban a gran velocidad y en alta cantidad. A su vez, su naturaleza liposoluble le permite atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica, lo que en conjunto determina que la PBC alcance el Sistema Nervioso Central (SNC) en pocos segundos, generando un potente y veloz efecto euforizante (Lizasoain y cols. 2002). Esta etapa inicial de euforia se caracteriza por la presencia de alteraciones psicomotrices como hiperactividad motora, estereotipias, hiperexcitabilidad y aceleración de los procesos del pensamiento, junto con aumentos en la presión arterial, temperatura, frecuencia respiratoria y cardíaca. Sin embargo, su efecto estimulante desaparece a los pocos minutos, reemplazado por sensaciones de angustia, ansiedad, depresión (en ocasiones con ideación suicida), miedo, apatía e indiferencia sexual. Esta etapa de disforia suele venir acompañada por un deseo incontrolable de volver a consumir (*craving*), lo que desencadena la búsqueda de la droga. En muchas ocasiones esto resulta en un consumo ininterrumpido, a fin de evitar el estado emocional negativo (Jeri 1984; Pérez 2003; Triaca y cols. 2009).

Al consumirse en forma crónica, los reportes médicos describen un perfil clínico característico de los consumidores de PBC, el cual incluye la aparición de insomnio, anorexia, irritabilidad, alteraciones de memoria y concentración, pensamiento rígido, impulsividad y agresividad, además de los otros efectos ya mencionados. En algunos casos también puede observarse la aparición de psicosis paranoide y alucinaciones dependiendo de la cantidad consumida, así como conductas antisociales. Uno de los hallazgos que podría explicar algunas alteraciones conductuales de los usuarios de

PBC, fue la demostración de alteraciones en la funcionalidad de la corteza prefrontal (CPF) de consumidores de PBC en comparación con consumidores de cocaína (Bojórquez 1991; Ferrando y cols. 2009; Pérez 2003; Triaca y cols. 2009). Se sabe que la CPF es una región clave en el control inhibitorio del comportamiento y en la capacidad de toma de decisiones (Ridderinkhof y cols. 2004). Ambas funciones se encuentran significativamente disminuidas en los usuarios de PBC en relación a los de cocaína, lo que podría relacionarse con la predisposición a la conducta agresiva, particularmente durante el consumo o la abstinencia precoz (Ferrando y cols. 2009; Triaca y cols. 2009). A su vez, es importante mencionar que la abstinencia prolongada fue capaz de revertir la hipofuncionalidad frontal en los consumidores de PBC (Ferrando y cols. 2009), lo que descarta efectos neurotóxicos permanentes en esta región. Por otro lado, estos resultados no pueden asociarse directamente a la droga en sí misma, dado que los usuarios de PBC son policonsumidores (Pascale y cols. 2010). Es necesario profundizar sobre las posibles interacciones con otras drogas en relación a estas alteraciones funcionales.

En conjunto, ciertos efectos subjetivos y fisiológicos producidos por PBC, como el aumento de alerta, euforia y desinhibición, son similares a los observados por cocaína en su forma de clorhidrato. Sin embargo, otras características como el deterioro cognitivo, rotura de códigos sociales y conductas vinculadas con violencia, delinean un perfil clínico diferencial para los consumidores de PBC (JND 2008; Pascale y cols. 2014).

Un aspecto de crucial importancia en el que la PBC se distingue del clorhidrato de cocaína es en su poder adictivo. Los consumidores crónicos de PBC experimentan una fuerte y rápida dependencia en comparación con los consumidores de cocaína. Se ha registrado que un 53 % de quienes consumieron PBC en el último año tiene signos de dependencia, mientras que para cocaína ese valor es de 34 % (JND 2012). Según los datos epidemiológicos (JND 2013; Triaca y cols. 2009), esta diferencia podría deberse en parte a que los consumidores de PBC suelen presentar más factores de riesgo (accesibilidad a las drogas, carencias económicas y sociales) y menos factores de protección (vínculos laborales y académicos, redes sociales y sistemas de apoyo) que los consumidores de cocaína. Sin embargo, hasta el momento de esta Tesis no había trabajos que abordaran directamente las posibles causas de este fenómeno.

Existen evidencias que demuestran que la velocidad con la cual la droga alcanza el cerebro es uno de los factores fundamentales para determinar su efecto psicoactivo y potencial adictivo (Gossop y cols. 1992; Samaha y Robinson 2005). Se ha argumentado que ésta puede ser la razón por la que el crack, otra cocaína fumable, es más adictiva que la cocaína esnifada (Gossop y cols. 1992; Hatsukami y Fischman 1996). En este sentido, se piensa que su rápida vía de administración constituye uno de los factores que explicarían el perfil clínico diferencial observado en los consumidores de PBC. Sin embargo, considerando que la PBC no es una droga pura, sus componentes podrían

promover distintos niveles de estimulación en el SNC e incidir en el poder adictivo de la droga, por lo que el factor “composición química” también debe considerarse.

## **2. ADICCIÓN A DROGAS DE ABUSO**

### **2.1 Definición de adicción y etapas del ciclo adictivo**

La adicción a drogas se define como un desorden de recaída crónica, caracterizado por la búsqueda compulsiva y consumo de la droga, pérdida de control en limitar su consumo, y la emergencia de un estado emocional negativo (disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando el acceso a la droga es impedido (APA 2013; Koob y cols. 1998; Koob y Le Moal 1997). Es importante destacar que sólo un porcentaje muy bajo de las personas que consumen drogas desencadenan una adicción (Anthony y cols. 1994; Koob y Le Moal 2006). Aún no se conocen cuáles son los determinantes de la transición del uso no problemático a la dependencia, aunque se cree que el grado de exposición a la droga y factores socio-vinculares, ambientales, genéticos y alteraciones en el desarrollo del SNC pueden contribuir a la susceptibilidad de algunos individuos (Deroche-Gamonet y cols. 2004; Kasanetz y cols. 2010; Koob y LeMoal 2001; Koob y Le Moal 2006). En este contexto, llama particularmente la atención que más de la mitad de quienes consumieron PBC en el último año presentan signos de dependencia (JND 2012).

Según George Koob, la adicción también puede ser entendida como un trastorno que avanza desde aspectos impulsivos a compulsivos, a través de un ciclo adictivo que involucra tres etapas: intoxicación aguda/repetida, abstinencia/estado afectivo negativo, y búsqueda/anticipación (Koob y Simon 2009; Wise y Koob 2014). La primera etapa incluye los efectos centrales de la droga al consumirse de forma aguda o repetida, y las consecuencias sobre el umbral de estimulación de recompensa. La etapa de abstinencia/estado afectivo negativo abarca todas aquellas modificaciones y alteraciones conductuales y afectivas asociadas a la interrupción del consumo. Finalmente, la etapa de búsqueda/anticipación se caracteriza por un acrecentamiento del *craving* y de la búsqueda de droga, junto con una sensibilidad aumentada para claves asociadas al consumo. Esta etapa del ciclo se considera una fase crucial para el cambio en la motivación por las drogas, y las recaídas que caracterizan la adicción (Koob y Le Moal 2006; Koob y Volkow 2010). Cada una de estas etapas es mediada por diferentes circuitos que involucran un juego de regiones del SNC asociadas a la recompensa, motivación, aprendizaje, funciones ejecutivas y motoras (Koob y Volkow 2010).

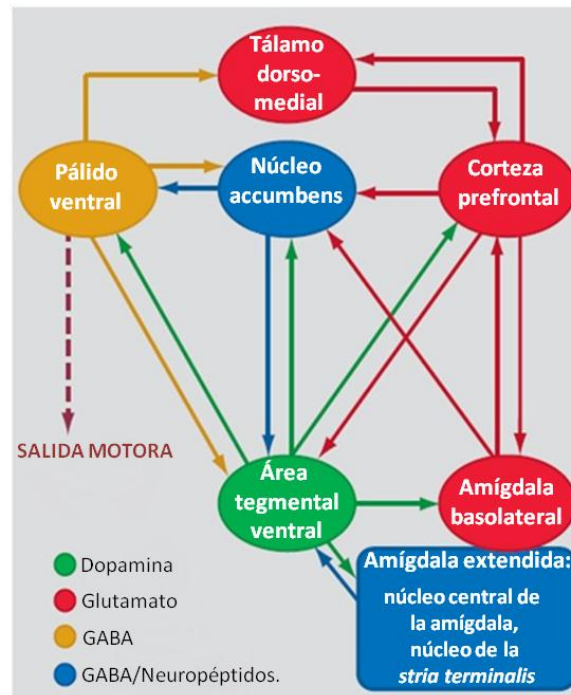
Comprender los efectos que genera una droga de abuso con alto poder adictivo, como es el caso de la PBC, implica estudiar su acción en el SNC y las consecuencias que induce en los procesos involucrados en las distintas etapas del ciclo adictivo.

## 2.2 Neurobiología de acción de drogas de abuso: circuito motivacional

Una de las hipótesis principales sobre el efecto reforzador de las drogas de abuso y el cambio inicial hacia la búsqueda y obtención de la droga, se basa en la neuroplasticidad de las regiones involucradas en el llamado circuito motivacional o de recompensa (Pierce y Kalivas 1997). Este circuito participa en la atribución de saliencia (valor o importancia) a un estímulo determinado, y en la modulación de la respuesta conductual frente al mismo. Es así que este circuito resulta clave en la mediación del efecto motivacional y reforzador de estímulos recompensantes naturales, como lo son la búsqueda de pareja sexual y la conducta alimentaria, aunque también de las drogas de abuso (Kalivas y Volkow 2005).

Como se observa en la figura 3, este sistema compromete varias regiones interconectadas y los sistemas de neurotransmisión GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico (DAérgico) y peptidérgicos. Entre ellos se destaca particularmente el sistema DAérgico mesolímbico, el cual posee un papel fundamental en el efecto reforzador de drogas de abuso (Pierce y Kumaresan 2006). Este sistema está formado por neuronas DAérgicas cuyos somas están ubicados en el área tegmental ventral (ATV) y sus axones se extienden hasta el núcleo accumbens (NAcc), amígdala, pálido ventral e hipocampo. Las neuronas del ATV envían también conexiones recíprocas hacia la CPF, conformando el circuito mesocortical. De esta forma, la actividad del ATV es capaz de regular mediante sus proyecciones DAérgicas, el flujo de información entre los distintos núcleos del circuito motivacional (Carr y Sesack 2000; Pierce y Kumaresan 2006; Sesack y Grace 2010).

Numerosas evidencias han mostrado que la administración aguda o repetida de cocaína y otras drogas psicoestimulantes aumenta los niveles extracelulares de DA en el NAcc, lo que refleja la activación del sistema mesolímbico (Carboni y cols. 1989, Di Chiara e Imperato 1988; Volkow y cols. 2009). Cocaína actúa principalmente mediante el bloqueo del transportador de DA (DAT) en las terminales sinápticas, inhibiendo su recaptación. Esto resulta en la elevación de la concentración extracelular de DA, lo que favorece la actividad DAérgica (Koob y Le Moal 2006; Lizasoain y cols. 2002). Estudios en humanos utilizando técnicas de imagenología mostraron un aumento de DA en el núcleo caudado-putamen (incluyendo su región ventral, donde está ubicado el NAcc) inducido por cocaína, el cual está asociado a los reportes subjetivos de recompensa (euforia, sensación de “*high*” o “*viaje*”) (Volkow y cols. 1997). De manera interesante, este efecto imita y sobrepasa el aumento fisiológico de DA que se genera por la activación fásica de las células DAérgicas frente a reforzadores naturales (Schultz 2002, Volkow y cols. 2009).



**Figura 3.** Esquema del circuito motivacional, indicando las conexiones entre las áreas involucradas. Tomado y modificado de Kalivas y Volkow 2005.

Además de su aferencia DAérgica, el NAcc recibe inervación excitatoria desde la CPF, amígdala e hipocampo (Kalivas y Volkow 2005; Sesack y Grace 2010). La activación cortical del NAcc se cree que está relacionada con la desinhibición de un plan motor apropiado y dirigido hacia la adquisición de recompensa. El hipocampo provee información espacial y contextual al sistema, y se cree que es fundamental para el aprendizaje condicionado característico del proceso adictivo, el cual relaciona claves del ambiente con la disponibilidad y los efectos de la droga (Everitt y Robbins 2005; Koob y Volkow 2010). Por otro lado, la amígdala constituye una estructura crítica en la determinación del valor motivacional y afectivo de un estímulo asociado a un evento relevante. Su conexión con el NAcc puede estar relacionada con la saliencia otorgada a un evento asociado con la recompensa, como puede ser la presencia o ausencia de la droga (Cleck y Blendy 2008; Kalivas y Volkow 2005). La amígdala extendida también participa de este sistema, aunque de manera indirecta a través de sus conexiones con el ATV. La liberación de GABA y polipéptidos como el factor liberador de corticotropina sobre el ATV aporta información sobre estrés y aspectos ambientales e introceptivos de valencia negativa (Cleck y Blendy 2008).

La eferencia del NAcc es GABAérgica y proyecta hacia el pálido ventral, región que se interconecta con el tálamo y constituye una vía de información desde los ganglios basales hacia la corteza (Koob y Volkow 2010).

Además de inervar el NAcc, la CPF, el hipocampo y la amígdala se encuentran interconectados mediante proyecciones glutamatérgicas (Sesack y Grace 2010). Por lo

tanto, estas cuatro estructuras están integradas funcionalmente. Es así que el NAcc constituye una región privilegiada para actuar como interfaz integrativa entre la información motivacional de las regiones límbicas, las claves condicionadas del hipocampo y el control motor de la corteza, y regular la salida comportamental adecuada dirigida a una meta.

Por otra parte, el NAcc no es una estructura homogénea sino que comprende distintas sub-regiones denominadas “*shell*” y “*core*”, las cuales se distinguen en sus aferencias y proyecciones, microcircuitaría y rol funcional (Zahm 1999). Estudios anatómicos y funcionales han determinado que, en términos generales, el NAcc *shell* está relacionado con la recompensa y las respuestas no condicionadas a las drogas, mientras que el NAcc *core* está involucrado en la ejecución de las respuestas motoras frente a contextos o estímulos motivacionalmente relevantes (Ito y cols. 2000; Wolf 2010).

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

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

El proceso adictivo involucra alteraciones en el circuito motivacional, y se cree que las mismas están relacionadas con el aumento de la motivación y búsqueda de la droga, así como la atribución de una saliencia exagerada a la misma (Robinson y Berridge 1993; Robinson y Berridge 2008). Por lo tanto, el estudio del efecto repetido de una droga de abuso y los cambios neuroquímicos asociados resulta fundamental para comprender su potencial adictivo y sus acciones en el SNC. La mayoría de las evidencias presentadas sobre la neurobiología de acción de las drogas de abuso sobre el circuito motivacional están basadas en estudios de drogas como cocaína y



anfetamina, opioides, nicotina y alcohol. Cada una de ellas aumenta directa o indirectamente la transmisión DAérgica en el NAcc (Di Chiara e Imperato 1988; Volkow y cols. 2009), efecto que se asocia con su propiedad reforzadora (Volkow y cols. 1999). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento no hay reportes en humanos sobre las acciones de PBC en el circuito motivacional que expliquen el alto poder adictivo de la droga que genera sobre sus consumidores. Además, hasta el inicio del presente trabajo de Tesis, poco se conocía sobre las acciones de la PBC a nivel del SNC en animales.

### **2.3 Fenómeno de sensibilización comportamental**

En animales de experimentación, la administración repetida de una droga psicoestimulante sumado a un período de abstinencia, induce una potenciación del efecto hiperlocomotor cuando el animal es re-expuesto a la droga. Este fenómeno se denomina sensibilización comportamental, y se estima que refleja los cambios plásticos y duraderos en el SNC asociados al proceso adictivo (Pierce y Kalivas 1997; Vanderschuren y Kalivas 2000).

Es importante destacar que este fenómeno involucra dos dominios temporales distintos: el desarrollo y la expresión. El desarrollo de la sensibilización comportamental se define como la secuencia transitoria de eventos celulares, precipitados por la administración repetida de psicoestimulantes, que lleva a los cambios en la función neural responsables del aumento locomotor. Esta fase se ve reflejada en el aumento progresivo de la actividad locomotora durante el tratamiento repetido con la droga. La expresión, en cambio, se refiere a las alteraciones duraderas de la función neural que surgen del proceso de desarrollo, y son las que median de forma directa la respuesta locomotora potenciada. Esta fase se ve reflejada en la hiperreactividad persistente a la droga luego de un período de abstinencia (Pierce y Kalivas 1997).

Los circuitos involucrados en la sensibilización comportamental están localizados en las áreas que integran el circuito motivacional y su salida motora, como la CPF, NAcc, ATV, ED y amígdala, entre otras regiones (Kalivas y Volkow 2005; Pierce y Kalivas 1997). Algunos de los cambios asociados al fenómeno de sensibilización en estas áreas incluyen alteraciones de la morfología y densidad de dendritas y espinas dendríticas (Robinson y Kolb 1999; Russo y cols. 2010), y aumentos en la expresión de proteínas como la tirosina hidroxilasa y estatmina (Rodríguez-Espinoza y Fernández-Espejo 2015). La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, por lo que su incremento se asocia a una mayor síntesis de DA (Feldman y cols. 1997); la estatmina en cambio, actúa como reguladora de la dinámica de los microtúbulos, por lo que el cambio en su expresión estaría relacionado con las alteraciones en la morfología dendrítica observadas durante la sensibilización (Rodríguez-Espinoza y Fernández-Espejo 2015). Otros cambios asociados a la sensibilización a

psicoestimulantes comprenden hipersensibilidad de los receptores DAérgicos postsinápticos, hiposensibilidad de los autoreceptores D<sub>2</sub> (Vanderschuren y Kalivas 2000), aumento en la densidad de receptores glutamatérgicos en el NAcc (Bordeau y Wolf 2005) y aumento en la liberación de algunos neurotransmisores, fenómeno que se conoce como sensibilización neuroquímica. Particularmente, se ha evidenciado un incremento en la transmisión DAérgica mesolímbica (Pierce y Kalivas 1997) y una mayor actividad de las proyecciones glutamatérgicas de la amígdala y corteza hacia el NAcc (Kalivas 2004; Wolf 2010).

La sensibilización comportamental está directamente relacionada a la expresión del estado de búsqueda/anticipación, y al desarrollo de la adicción (Robinson y Berridge 1993; Vanderschuren y Pierce 2010). A su vez, la sensibilización inducida por cocaína, se encuentra ampliamente reportada y establecida en la literatura (Crombag y cols. 2002; Kalivas y Duffy 1993; Kalivas y Stewart 1991; Kalivas y cols. 1988; Seymour y Wagner 2005). En estos estudios generalmente se utilizan protocolos de inyecciones diarias durante 7 días o más, seguido de un período de abstinencia (Crombag y cols. 2002; Pierce y Kalivas 1997; Seymour y Wagner 2005). La abstinencia constituye una etapa crucial en el proceso de sensibilización, en la cual se consolidan varias de las adaptaciones producidas por la droga, mencionadas en el párrafo anterior (Kuhar y Pilotte 1996; Pierce y Kalivas 1997). De esta forma, el tiempo de abstinencia repercute directamente en el resultado de los tratamientos repetidos, habiéndose reportado una mayor respuesta e intensidad de la sensibilización con períodos de abstinencia prolongados, superiores a 14 días (Pierce y Kalivas 1997).

Si bien se han aplicado una gran diversidad de protocolos y se ha evaluado la relevancia de diferentes factores como el tiempo de tratamiento y abstinencia en la sensibilización comportamental inducida por cocaína, aún no se ha evaluado la inducción de este fenómeno luego de un tratamiento repetido con PBC.

#### **2.4 Efectos de la cocaína sobre la transmisión DAérgica en el NAcc**

Estudios de microdiálisis intracerebral han demostrado que el tratamiento agudo y repetido de cocaína induce un aumento en los niveles extracelulares de DA en el NAcc (Hurd y cols., 1989; Pettit y cols., 1990; Kalivas y Duffy 1993). No obstante, dicho aumento de DA puede darse de manera diferencial en las subregiones del NAcc, dependiendo del protocolo y la etapa del ciclo adictivo. El aumento de la DA en el NAcc *shell* se ha asociado al efecto recompensante agudo de psicoestimulantes, y a la asociación de las propiedades sensoriales de estímulos apetitivos desconocidos e impredecibles, con sus consecuencias biológicas (Di Chiara y cols. 2004). Esto último es de importancia para el establecimiento de asociaciones predictivas entre dichos

estímulos y su valor recompensante, una relación necesaria para el inicio de la búsqueda (Berridge y cols. 2009).

Por otro lado, la hiperactividad DAérgica en el Nacc *core* se halla implicada principalmente en los aspectos motores de la recompensa, incluidos el aprendizaje entre una acción y su consecuencia reforzadora (condicionamiento operante o instrumental) y la facilitación de la respuesta comportamental dirigida hacia la obtención de recompensa (Di Chiara y cols. 2004; Ito y cols. 2000). En acuerdo con esta segregación de funciones, reportes del grupo de Di Chiara muestran que dentro del NAcc, la sensibilización comportamental inducida por cocaína está asociada a un incremento de los niveles extracelulares de DA únicamente en el NAcc *core* (Cadoni y cols. 2000; Cadoni y cols. 2003). Esto concuerda con otros trabajos en los que se evidencia un incremento en la densidad de espinas dendríticas en el *core*, pero no en el *shell* del NAcc, luego de la sensibilización a cocaína (Li y cols. 2004).

Considerando la importancia de la sensibilización comportamental y su vinculación con el proceso adictivo, el estudio de los cambios neuroquímicos asociados a este fenómeno es fundamental para comprender el potencial adictivo de la PBC y sus acciones en el SNC.

## 2.5 Aspectos Motivacionales

La adicción a drogas es delineada por algunos autores como un trastorno en la motivación (Kalivas y Volkow 2005; Robinson y Berridge 2008). Al día de hoy, una de las teorías biopsicológicas de la adicción más aceptadas, es la llamada teoría de la sensibilización de incentivo, presentada por Robinson y Berridge en 1993. Esta teoría propone que la exposición repetida a drogas de abuso induce cambios en el circuito motivacional, que se manifiestan en una hipersensibilidad hacia los estímulos asociados con la droga y sus efectos sobre la motivación de incentivo. La motivación de incentivo puede definirse como el *priming* o impulso por la obtención de un estímulo que de otro modo sería neutro, pero que ha adquirido importancia motivacional a través de asociaciones previas con una recompensa (Wise 2004). De manera más específica, los autores se centran en uno de los procesos de la motivación de incentivo: la atribución de saliencia de incentivo, o sea, la percepción de la relevancia que posee un estímulo para el organismo (Robinson y Berridge 1993). Cuando un estímulo tiene saliencia de incentivo, es atractivo para el animal y promueve conductas orientadas al acercamiento o consumo de dicha recompensa.

En este contexto resulta de utilidad resaltar que el concepto de recompensa se constituye de tres componentes dissociables entre sí: el “aprendizaje”, referido a las asociaciones predictivas entre estímulo-respuesta; el “liking”, asociado al impacto hedónico del estímulo recompensante; y el “wanting”, que se refiere a la saliencia de incentivo y búsqueda de la recompensa (Berridge 2009; Berridge y cols. 2009).

Robinson y Berridge hipotetizan que la desregulación del circuito motivacional generada por el consumo repetido de drogas hace que se le atribuya una saliencia de incentivo desproporcionalmente grande a las drogas de abuso en relación a los reforzadores naturales. Esto generaría una motivación y un “*wanting*” exagerado por la droga, lo que explicaría el *craving* y la búsqueda compulsiva, características definitorias de la adicción (Berridge y cols. 2009; Everitt y Robbins 2005). Por lo tanto, el estudio de la motivación y el comportamiento de búsqueda, es clave para comprender el potencial adictivo de una droga de abuso.

Una forma de estudiar la sensibilización de incentivo y la búsqueda de droga es mediante el paradigma de autoadministración (Robinson y Berridge 2008). Este comportamiento ha sido ampliamente reportado para cocaína (Pettit y Justice 1989; Roberts y cols. 1980; Vanderschuren y cols. 2005), donde se ha caracterizado el pasaje de la búsqueda de droga a la cualidad compulsiva de la misma, luego de exposiciones prolongadas (Vanderschuren y Everitt 2004). A su vez, un estudio de imagenología en ratas con 2-<sup>14</sup>C]deoxi-glucosa mostró una disminución de la actividad funcional basal de regiones mesocorticolímbicas luego de 30 días de autoadministración a cocaína (Macey y cols. 2004). Esto se corresponde con un trabajo reciente, el cual demuestra una disminución de la reactividad apetitiva de los animales frente a recompensas naturales como alimento palatable (dulce), luego de 14 días de autoadministración (Green y cols. 2015). Estas evidencias reflejan un cambio en la saliencia atribuida a los estímulos naturales en relación a la cocaína.

Por lo tanto, el modelo de autoadministración puede resultar de gran utilidad para el estudio de la saliencia de incentivo percibida por los animales y la motivación por la obtención de la droga.

### **3. ANTECEDENTES DE TRABAJO**

#### **3.1 Composición química de muestras incautadas de Pasta Base de Cocaína**

Considerando que el factor “composición química” podía ser uno de los elementos para comprender los efectos inducidos por PBC en el SNC, en primera instancia se procedió a analizar químicamente una serie de muestras de PBC de nuestro país. Las mismas provinieron de incautaciones policiales en Montevideo y fueron proporcionadas por el Instituto Técnico Forense, con la autorización de la Junta Nacional de Drogas y el Ministerio de Salud Pública. Es importante destacar que éstas eran muestras que potencialmente iban a ser consumidas por el usuario de PBC.

El análisis de las muestras incautadas de PBC se realizó en la Plataforma de Servicios Analíticos bajo la responsabilidad del Dr. Andrés Abín-Carriquiry y la asistencia técnica de la MSc. Marcela Martínez. Se analizaron 10 muestras mediante la técnica de

cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía de gas y espectrometría de masa (GC-MS). El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1 | Análisis cuantitativo de muestras de PBC de Uruguay**

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

Análisis cuantitativo de las muestras de PBC 1-10 realizado por HPLC-DAD y GC-MS. Los datos están expresados como Medias ± EEM. La cuantificación de cocaína, cis y trans-cinamoil cocaína y cafeína se realizó tomando como referencia soluciones estándares de cada una de las sustancias. Nd: no determinado. Tomado de Prieto y cols. 2012.

De acuerdo a lo esperado, la cocaína fue el alcaloide principal encontrado en las muestras de PBC, y su contenido varió entre un 20 y 70 % dependiendo de la incautación estudiada. En algunas de las muestras se encontraron también otros alcaloides relacionados con el metabolismo de la cocaína, tales como trans- y cis-cinamoil cocaína, aunque los mismos están presentes en muy baja proporción (0.4 - 4.2 %). Estos resultados coinciden con el análisis realizado por ElSholy y colaboradores (1991) sobre muestras de PBC provenientes de Perú y Colombia, lo que sugiere que las muestras de PBC podrían tener un origen similar. Sin embargo, el reporte de ElSholy no consideraba la presencia de adulterantes. Lidocaína, fenacetina y cafeína constituyen las sustancias adulterantes más comunes de encontrar en drogas ilegales como la cocaína, metanfetamina y heroína (Barat y Abdel-Rahman 1998; Cole y cols. 2011; Fucci y De Giovanni 1998). Por lo tanto, en la caracterización química de PBC se ensayó la presencia de éstos adulterantes. De estas tres sustancias, el único adulterante activo reconocido hasta el momento fue la cafeína, variando su contenido entre 1 y 15 % (López-Hill y cols. 2011; Meikle y cols. 2009, Moraes y cols. 2010). La cafeína suele ser usada como adulterante en drogas ilícitas principalmente por su carácter legal (lo que

la hace más fácil de conseguir), su bajo costo y acción psicoestimulante (Cole y cols. 2011). Además, la cafeína puede ser volatilizada (Gostic y cols. 2009), lo que puede explicar su uso como adulterante en las muestras de PBC.

De manera interesante, estudios pre-clínicos sugerían un rol importante de la DA en las propiedades psicoestimulantes de la cafeína, y se ha demostrado que su administración incrementa la hiperactividad locomotora inducida por cocaína (Garrett y Griffiths 1997, Misra y cols. 1986). Estas observaciones sugerían la existencia de una interacción entre los efectos de la cocaína y cafeína.

### **3.2 Efecto farmacológico agudo de PBC**

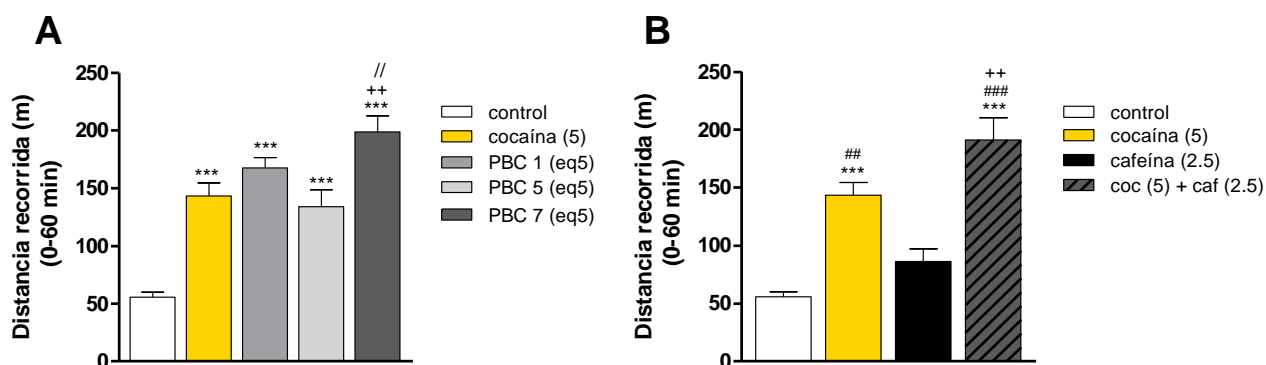
Una vez conocida su composición química y con el objetivo de comenzar a estudiar sus acciones a nivel del SNC, se procedió a estudiar el efecto estimulante inducido por PBC, y el rol de cafeína como principal adulterante. Para esto se seleccionaron tres muestras representativas de la diversidad química de la PBC (Tabla 1): PBC 1 (alto contenido de cocaína base y cafeína); PBC 5 (alto contenido de cocaína base, bajo contenido de cafeína); y PBC 7 (bajo contenido de cocaína base, alto contenido de cafeína). El efecto estimulante se evaluó mediante el registro de la distancia recorrida, como índice de la actividad locomotora inducida por la administración sistémica aguda de las diferentes muestras, a dosis equivalentes de cocaína base.

Como se observa en la Figura 4A, todas las muestras de PBC indujeron un efecto estimulante, evidenciado por una mayor distancia recorrida respecto al control. La hiperlocomoción inducida por PBC 1 y PBC 5 resultó muy similar a los animales inyectados con cocaína, lo que sugiere que la cocaína base presente en la PBC fue la principal responsable de su acción estimulante. Sin embargo, la inyección de PBC 7 a una dosis equivalente de cocaína base de 5 mg/kg, indujo un aumento en la actividad locomotora significativamente mayor al de cocaína. Esta diferencia indicó que además de la cocaína base, otros compuestos participaban del efecto estimulante de la PBC 7. Con el fin de confirmar si la cafeína era la responsable de este fenómeno, se administró la combinación de cocaína y cafeína a dosis equivalentes a su contenido en la PBC 7 (5 y 2,5 mg/kg, respectivamente; Figura 4B). La co-administración de estas drogas reprodujo el efecto hiperlocomotor de PBC 7, lo que demostró que la cocaína y cafeína fueron los principales responsables de su efecto estimulante agudo (López-Hill y cols. 2011; Prieto y cols. 2012), descartando la participación de las impurezas en los efectos observados.

Estos resultados demostraron además que la cafeína, cuando está presente en determinadas proporciones, es capaz de actuar de forma aditiva con la cocaína, potenciando su efecto estimulante. Estos datos resaltaron la importancia de

considerar el contenido químico y las características del adulterante a la hora de estudiar las acciones de la PBC en el SNC.

Adicionalmente, estos resultados permitieron evidenciar que la co-administración de cocaína y cafeína a las dosis equivalentes a su contenido en las muestras de PBC, es un sustituto válido para estudiar otros aspectos comportamentales inducidos por PBC.



**Figura 4. A:** Actividad locomotora inducida PBC 1, 5 y 7 a dosis equivalentes de cocaína base (5 mg/kg) y cocaína (5 mg/kg), durante 60 min. **B:** Actividad locomotora inducida por cocaína (5 mg/kg), cafeína (2.5 mg/kg), y la co-administración de cocaína (5 mg/kg) y cafeína (2.5 mg/kg), durante 60 min. de registro. Media  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía - Test de Newman-Keuls. \* = vs control; += vs cocaína; /= vs PBC 5; # = vs cafeína. \*\*\*,### =  $p < 0.001$ ; ++, //, ## =  $p < 0.01$ ; +=  $p < 0.05$ .

A nivel neuroquímico, estudios previos demostraron que administración aguda de PBC indujo un aumento en los niveles tisulares de DA en el NAcc (Meikle y cols. 2009), el cual se correspondió con su efecto estimulante agudo. Estas observaciones reflejan un aumento en la actividad del sistema DAérgico mesolímbico, probablemente mediada por los mecanismos de acción de cocaína y cafeína. Sin embargo, aún no se ha evaluado el impacto de la PBC en los niveles extracelulares de DA en las distintas subregiones del NAcc y sus efectos asociados.

### 3.3 Mecanismo de acción de cafeína

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

La cafeína actúa en el organismo como un antagonista competitivo no selectivo de los receptores de adenosina (Fredholm y cols. 1999). La adenosina endógena constituye un regulador importante de la transmisión DAérgica, la cual es sintetizada principalmente a partir de AMP por la acción de la enzima 5' nucleotidasa, tanto intra

como extracelularmente (Fredholm 1995). Aun así, la concentración de adenosina en el fluido extracelular está regulada por la acción del transportador equilibrativo de nucleósidos, y su acción está mediada por la unión a tres tipos de receptores metabotrópicos:  $A_1$ ,  $A_2$  ( $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ ) y  $A_3$ . Si bien todos ellos se expresan en el cerebro, el nivel extracelular de adenosina en condiciones fisiológicas es suficiente para activar únicamente los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$ . Los receptores  $A_{2B}$  y  $A_3$  presentan una baja afinidad por la adenosina, y se activan sólo con niveles patológicos altos de adenosina, por lo que su actividad en condiciones fisiológicas se considera despreciable (Ferré 2008; Fredholm y cols. 1999). Por lo tanto, la cafeína ejerce sus acciones principalmente a través de la interacción con los receptores adenosinérgicos  $A_1$  y  $A_{2A}$ . Estos dos receptores presentan efectos farmacológicos opuestos: el  $A_1$  reduce los niveles celulares de AMPc, mientras que el  $A_{2A}$  los incrementa (Fredholm y cols. 2001). Los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  co-localizan con los receptores DAérgicos  $D_1$  y  $D_2$  en las neuronas espinosas medias (NEMs) del ED y NAcc de manera específica, definiendo dos poblaciones neuronales: las NEMs que contienen sustancia P y dinorfina, ricas en receptores  $D_1$  y  $A_1$ , y las NEMs que contienen encefalina, ricas en receptores  $D_2$  y  $A_{2A}$  (Cauli y Morelli 2005; Fisone y cols. 2004; Fredholm y cols. 1999). A nivel pre-sináptico, se ha descrito que la adenosina es capaz de atenuar la liberación de DA (Ferré 2008; Ferré 2010), mientras que a nivel post-sináptico la misma disminuye la transmisión DAérgica mediante interacciones antagónicas entre los receptores de adenosina y DA. La unión de adenosina a sus receptores inicia una cascada de segundos mensajeros que se contrapone a las señales iniciadas por la activación de los receptores DAérgicos; y a su vez los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  son capaces de formar heterómeros con los receptores  $D_1$  y  $D_2$  respectivamente, lo que disminuye la afinidad de la DA por su receptor (Ferré 2010; Fisone y cols. 2004; Fuxe y cols. 2005). Por lo tanto, al bloquear los receptores de adenosina, la cafeína es capaz de remover el freno adenosinérgico y potenciar los efectos de la estimulación DAérgica (Fisone y cols. 2004). Tanto la cocaína como la cafeína, si bien por distintos mecanismos, poseen la facultad de facilitar la transmisión DAérgica, lo que puede explicar en parte su acción aditiva o sinérgica al administrarse en forma conjunta.

### **3.4 Interacción entre cocaína y cafeína**

La interacción entre cocaína y cafeína se ha reportado en diversos modelos experimentales. A nivel motor, se ha demostrado que la administración de cafeína incrementa la hiperactividad locomotora inducida por cocaína (Mirsa y cols. 1986), y que lo mismo ocurre cuando los animales son expuestos de forma prolongada a concentraciones bajas de cafeína en forma oral (Gasior y cols. 2000). Asimismo, el tratamiento repetido con cafeína es capaz de potenciar la expresión de la sensibilización a cocaína (Kuribara 1994; Schenk y cols. 1990; Simola y cols. 2006a).



Este fenómeno de sensibilización cruzada resulta interesante, pues sugiere un sustrato neural común (Robinson y Berridge 1993). En este sentido, un estudio demostró que la pre-exposición a una dosis alta de cafeína (15 mg/kg) no indujo ningún incremento en la locomoción de los animales al ser desafiados con una dosis menor de cafeína (5 mg/kg), pero sí logró expresar la sensibilización al ser desafiados con los agonistas de los receptores DAérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, SKF 77434 y quinpirol respectivamente (Cauli y Morelli 2002).

Estas interacciones en el proceso de sensibilización son de gran importancia si se considera la presencia de cafeína como adulterante en varias drogas de abuso, y que cocaína y cafeína son los principales componentes de la PBC.

Además de la potenciación locomotora, algunos estudios han demostrado una contribución de la cafeína al efecto reforzador de la cocaína. En particular, se ha visto que la combinación de ambas drogas a dosis bajas (0,32 mg/kg) indujo un efecto aditivo en el modelo de condicionamiento de preferencia de lugar, pasando más tiempo en el compartimento condicionado que los animales tratados con cocaína sola (Bedingfield y cols. 1998). De manera interesante, también se han registrado interacciones con la cafeína en el modelo de autoadministración. Particularmente, se ha visto que la pre-exposición a cafeína es capaz de acelerar la adquisición de la autoadministración a cocaína (Horger y cols. 1991), y aumentar su respuesta en protocolos de reforzamiento de proporción fija (para evaluar su efecto reforzador) (Schenk y cols. 1994). La cafeína también puede actuar como una clave para las drogas psicoactivas, produciendo la reinstalación del comportamiento de búsqueda de cocaína luego de una abstinencia (Green y Schenk 2002; Schenk y cols. 1996; Worley y cols. 1994). Sin embargo, aún no se ha estudiado el efecto de la interacción de estas dos drogas haciendo foco en la motivación por la búsqueda, mediante el uso de protocolos específicos. Considerando que la cocaína y cafeína son los responsables principales de los efectos comportamentales de la PBC, estos estudios podrían ser importantes para comprender la fuerte dependencia y *craving* inducidos por su consumo repetido.

En base a los antecedentes mencionados, se hace evidente la necesidad de conocer los factores y mecanismos que subyacen a la rápida dependencia asociada al consumo de PBC en relación con otras drogas de abuso como la cocaína. Si bien la vía de administración es un factor importante en la determinación del potencial adictivo de una droga, los estudios previos de nuestro laboratorio evidenciaron que la composición química de la PBC es un factor significativo que puede explicar algunos aspectos del perfil clínico diferencial de sus consumidores. Esencialmente, la interacción entre sus componentes principales, cocaína y cafeína, ha mostrado ser determinante en los efectos agudos de la PBC. Resulta necesario en este contexto, aportar información pre-clínica sobre los efectos de la PBC en el SNC y el rol de sus componentes luego de tratamientos repetidos. La evaluación de aspectos fuertemente

vinculados al proceso adictivo, como lo son la sensibilización comportamental y sus consecuencias neuroquímicas, junto con la desregulación motivacional por la búsqueda de droga, permitirán avanzar en la comprensión de las causas que subyacen al fuerte *craving* y consumo compulsivo de la PBC.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

---

La hipótesis general de trabajo se basa en que la composición química de la PBC constituye un factor clave en la determinación de sus propiedades de incentivo y su alto poder adictivo. En particular, consideramos que cocaína y cafeína son los componentes principales que subyacen a los efectos comportamentales y neuroquímicos vinculados a los procesos de adicción inducidos por PBC.

La hipótesis específica se basa en que el tratamiento repetido de PBC o su sucedáneo de cocaína y cafeína genera un efecto mayor en la sensibilización comportamental y neuroquímica DAérgica comparado con cocaína. Además, el sucedáneo de PBC induce un mayor valor de incentivo y potencial adictivo que cocaína sola.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

Basados en los antecedentes de la temática y en los resultados de nuestro grupo de trabajo, la presente tesis pretende continuar aportando información vinculada al fenómeno de consumo de PBC. El objetivo general del trabajo consistió en profundizar en el estudio de los efectos centrales de PBC, utilizando aproximaciones conductuales y neuroquímicas vinculadas a los procesos de adicción. En particular, se estudió el papel que juegan sus principales componentes, cocaína y cafeína, en la rápida y alta dependencia que genera la PBC.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

### **1. Estudio del fenómeno de sensibilización comportamental inducido por PBC.**

- 1.1 Evaluación del desarrollo y expresión de la sensibilización comportamental inducida por una muestra de PBC con alto contenido en cocaína y cafeína (PBC1), mediante el análisis de la actividad locomotora en el modelo de campo abierto.
- 1.2 Determinación de la contribución de cocaína y cafeína al fenómeno de sensibilización comportamental inducida por PBC.

### **2. Estudio del fenómeno de sensibilización neuroquímica inducido por el sucedáneo de PBC.**

- 2.1 Determinación del efecto neuroquímico de la combinación de cocaína y cafeína sobre los niveles extracelulares de DA y sus metabolitos en el NAcc *core* mediante la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo*, utilizando el tratamiento de sensibilización comportamental.

### **3. Estudio de la propiedad motivacional del sucedáneo de PBC.**

- 3.1 Evaluación del efecto motivacional de la combinación de cocaína y cafeína mediante la evaluación del comportamiento de búsqueda de droga y su comparación con cocaína, utilizando el modelo de autoadministración en ratas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Animales

En los experimentos asociados a los objetivos específicos 1 y 2 se utilizaron ratas macho, cepa Wistar, de 2-3 meses de edad, pesando entre 250-320 gr. al inicio de los procedimientos experimentales (N= 97). Los animales fueron criados en las instalaciones del Bioterio del IIBCE, mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y con un ciclo luz-oscuridad constante (luces prendidas de 7:00 AM - 7:00 PM). Fueron alojados en grupos de 6 animales, en cajas de plástico transparentes, con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos que se llevaron a cabo se encuentran bajo las normas éticas establecidas y aprobadas por el Comité de Ética en el Uso de Animales del IIBCE (CEUA-IIBCE), y de acuerdo con la Ley Nacional N° 18.611 de experimentación animal.

En el experimento asociado al objetivo específico 3 se utilizaron ratas macho, Sprague-Dawley, provenientes de Laboratorios Harlan (Italia) (N= 32). Los animales tuvieron entre 250-275 gr de peso al inicio de los procedimientos experimentales, y fueron alojados en grupos de 4 en cajas de plástico transparente, con comida y agua *ad libitum*, temperatura y ciclo luz-oscuridad controlados ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , luces prendidas 8:00 AM - 8:00 PM). Luego de la cirugía (ver Materiales y Métodos, Objetivo Específico 3) los animales fueron alojados de forma individual, manteniendo la comida y agua *ad libitum*. Una vez iniciadas las sesiones de autoadministración se limitó el alimento a una ración diaria de 20 gr de comida, disponible al culminar la sesión experimental. El control de la comida se utilizó para facilitar los comportamientos de búsqueda en los animales, principalmente en las primeras sesiones de entrenamiento. Todos los procedimientos cumplieron las directrices y protocolos aprobados por la Unión Europea (Directiva del Consejo 86/609/EEC; Decreto Legislativo 27.01.1992, No 116) y la Comisión de Ética en el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Cagliari.

### 2. Drogas

Para el desarrollo de este trabajo se consideró el contenido químico de la muestra PBC 1. El análisis químico de la PBC 1 demostró que contiene un 68,9 % de cocaína base y 15,0 % de cafeína (ver Tabla 1). La muestra de PBC proviene de incautaciones policiales y fue suministrada por el Instituto Técnico Forense, con la autorización de la Junta Nacional de Drogas. Para disolver la muestra de PBC se utilizó una solución de ácido clorhídrico al 2 % y agua destilada, y se llevó a un pH óptimo para su administración sistémica (pH= 6-6,5) con hidróxido de sodio. El clorhidrato de cocaína y cafeína se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Alemania), y ambas fueron disueltas en salino.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Estudio del fenómeno de sensibilización comportamental inducido por PBC.**

### ***Grupos experimentales***

Con el fin de evaluar el fenómeno de sensibilización comportamental inducido por PBC, un grupo de animales fue tratado con la muestra PBC 1, a una dosis equivalente de cocaína base de 10 mg/kg (dosis final 13 mg/kg). Otros grupos de animales fueron tratados con cocaína, cafeína, y la combinación de ambas drogas, para determinar el rol de los componentes de la PBC en la sensibilización. Específicamente, la cocaína se administró a una dosis de 10 y 5 mg/kg; cafeína a una dosis de 2,5 mg/kg; y la combinación, cafeína a 2,5 mg/kg con cocaína 10 y 5 mg/kg, y cafeína 1 mg/kg con cocaína 5 mg/kg. La dosis de cafeína fue calculada en base al contenido de cafeína en la muestra PBC 1. Los animales controles fueron inyectados con el vehículo correspondiente, y el volumen de inyección fue de 1 mL/kg.

Como se mencionó anteriormente, la combinación de cocaína y cafeína a dosis equivalente a su contenido en la PBC, genera sus mismos efectos comportamentales, demostrando que las impurezas no participan de sus efectos. Por lo tanto, dicha combinación puede usarse como sustituto para estudiar algunas propiedades de la PBC (López-Hill y cols. 2011; Prieto y cols. 2012). En este estudio utilizamos la combinación de cocaína (10 mg/kg) y cafeína (2,5 mg/kg) como sucedáneo de la PBC 1.

### ***Paradigma comportamental***

La sensibilización comportamental se evalúa mediante el análisis de la actividad locomotora, para lo cual se utilizó el modelo de campo abierto (CA). Este modelo consiste en una arena grande, donde se sitúa a los animales por un período de tiempo determinado para observar su conducta. La arena es más grande que su jaula, y constituye en principio un ambiente novedoso para el animal, lo que favorece la exploración. Estas características hacen que el CA, si bien fue originalmente diseñado como un test de “emocionalidad” (Hall 1934), hoy sea extensamente utilizado para el análisis de la actividad locomotora (Archer 1973; Razafsha y cols. 2013; Walsh y Cummings 1976).

El CA consistió en una caja de 60 × 60 cm, con paredes de acrílico de 40 cm de altura. Los experimentos fueron filmados mediante una cámara colocada sobre el CA, y analizados con el software de video-seguimiento y análisis de la actividad y patrón locomotor animal Ethovision XT 7 (Noldus). Específicamente, se cuantificó la actividad locomotora horizontal, definida como la distancia recorrida total en metros.

### ***Protocolo experimental***

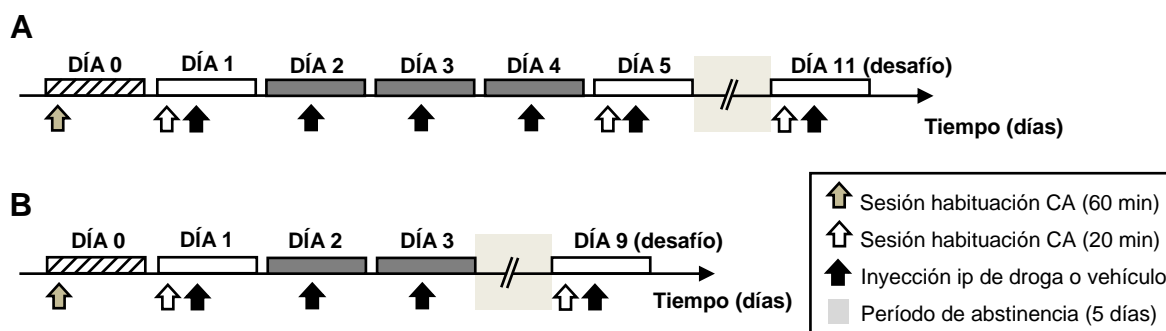
Para el estudio de la sensibilización inducida por PBC 1 y cocaína se utilizó el siguiente protocolo experimental: el día previo al inicio del tratamiento los animales fueron habituados al CA por un período de 60 min. (Día 0). Posteriormente, los animales fueron asignados aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales, los cuales fueron tratados con PBC 1, cocaína y sus vehículos respectivos, una vez por día durante 5 días (Protocolo I, ver Figura 5).

En los días 1 y 5, los animales fueron sometidos a una habituación de 20 min. en el CA, previo a la inyección del tratamiento. Las habituaciones previas disminuyen el estrés de los animales al enfrentarse a un ambiente distinto, y facilita la asociación de la droga con el contexto, un aspecto fundamental para la inducción de la sensibilización (Li y cols. 2004). Luego del último día de tratamiento los animales fueron puestos en abstinencia por 5 días. Finalizado este período (Día 11), los animales fueron colocados en el CA por 20 min. (habituación previa) y luego recibieron una dosis desafío de acuerdo al pre-tratamiento recibido. La actividad locomotora se registró cada día del protocolo durante 30min, iniciando 5 min. después de la inyección de la droga. Este protocolo experimental se esquematiza en la Figura 5A).

Para estudiar el rol de la cafeína en la expresión de la sensibilización inducida por PBC, se ensayaron diferentes combinaciones de cocaína y cafeína, a dosis presentes en muestras de PBC. Para esto se utilizó el siguiente protocolo: en el Día 0 los animales fueron habituados al CA por 60 min., y luego asignados aleatoriamente a los distintos grupos experimentales, los cuales fueron tratados con cocaína (10 mg/kg), cafeína (2,5 mg/kg), y la combinación de ambas, Coc<sub>(10)</sub> + Caf<sub>(2,5)</sub>, como sucedáneo de la PBC 1. Simultáneamente, otros grupos de animales fueron expuestos a una dosis menor de cocaína (5 mg/kg), y a diferentes dosis de cafeína. Específicamente, estos animales fueron inyectados con Coc<sub>(5)</sub> + Caf<sub>(2,5)</sub> (esta combinación coincide con el sucedáneo de la muestra PBC 7, ver Tabla 1), y Coc<sub>(5)</sub> + Caf<sub>(1)</sub> (sucedáneo de la PBC 1 a una dosis equivalente a 5 mg/kg de cocaína). Los distintos tratamientos se administraron una vez por día, por tres días consecutivos (Protocolo II). En el Día 1 los animales fueron habituados al CA por 20 min, previo a la inyección de la droga. Una vez culminados los tres días de pre-tratamiento, fueron dejados en abstinencia por un período de 5 días. En el Día 9 los animales fueron expuestos al CA por 20 min (habituación) y luego se les inyectó una dosis desafío de la droga correspondiente, de acuerdo al pre-tratamiento recibido. La actividad locomotora se registró cada día del protocolo durante 60 min, iniciando 5 min. después de la inyección de la droga. Este protocolo experimental se esquematiza en la Figura 5B).

Durante todos los experimentos, el CA fue limpiado con alcohol al 30% antes de colocar al siguiente animal.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron durante la fase diurna, entre las 9:00 y 15:00 hs.



**Figura 5.** Protocolos experimentales para la sensibilización comportamental de PBC 1 y cocaína (A), y de los sucedáneos de PBC (B). Los animales fueron tratados con las distintas drogas y sus vehículos correspondientes durante 5 o 3 días [**Protocolos I (A) y II (B)**, respectivamente]. 5 días después los animales fueron desafiados con los tratamientos correspondientes.

### **Análisis Estadístico**

Los datos se muestran como la Media  $\pm$  Error Estándar Medio (EEM), y fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (tiempo y pre-tratamiento) para medidas repetidas, y un ANOVA de una vía para medidas independientes (tratamiento), ambos seguidos del test de comparación múltiple Newman-Keuls. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa Statistica 10 y GraphPad Prism 5.01, respectivamente. La significancia estadística fue fijada en  $P < 0.05$ .

## **OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Determinación del fenómeno de sensibilización neuroquímica inducido por el sucedáneo de PBC.**

Para la realización de este objetivo se utilizó la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo* en animal despierto sin restricción de movimiento. Esta técnica permite, mediante la implantación de una cánula de diálisis en la región de interés (NAcc *core*), coleccionar moléculas presentes en el medio extracelular (DA) y determinar su variación frente a la administración sistémica de distintas drogas (cocaína y la combinación de cocaína + cafeína). Se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-DE) para cuantificar los cambios en el nivel extracelular de DA y sus metabolitos. Es importante considerar que los niveles extracelulares del neurotransmisor que se dializa son el resultado de un balance entre los procesos de liberación y recaptación (Plock y Kloft, 2005).

### ***Protocolo Experimental***

Con el fin de evaluar el correlato neuroquímico de la expresión de la sensibilización, se utilizó el mismo régimen de inyección que los experimentos de sensibilización comportamental. Los animales fueron tratados por tres días con salino, cocaína (5 mg/kg), o la combinación cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg). Inmediatamente después de cada inyección (ip., 1 mL/kg) los animales fueron colocados en las cámaras de diálisis durante 60 min para su habituación y asociación con el contexto. Luego del último día de tratamiento se dejaron en abstinencia por 5 días. En el 5to día de abstinencia se les realizó la cirugía estereotáxica para la implantación de la cánula de microdiálisis. Al día siguiente se realizó la microdiálisis, y los animales fueron desafiados con una inyección de cocaína (5 mg/kg) o cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg) según correspondiese.

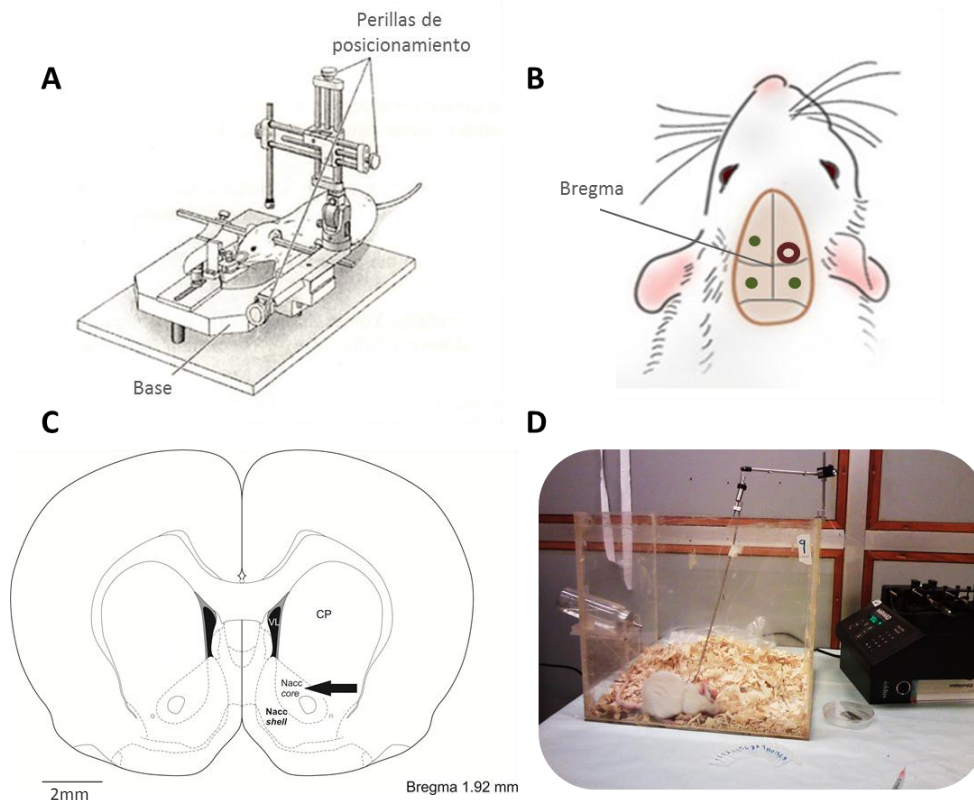
Todos los procedimientos experimentales se realizaron durante la fase diurna, entre las 9:00 y 15:00 hs.

### ***Cirugía estereotáxica***

Los animales fueron anestesiados con ketamina (90 mg/kg ip.) y xilasina (5 mg/kg ip.) y operados mediante estereotaxia para la implantación de cánulas de diálisis (BAS) de 2 mm de longitud de membrana y 350 µm de diámetro en el NAcc *core* (coordenadas en mm para rata: AP: +1.9; Lat:-1.8; DV:-7.4 a partir de Bregma según el atlas de Paxinos and Watson, 2005; ver Figura 6). Estos experimentos se realizaron en el NAcc *core* debido a que el mismo está asociado preferentemente a aspectos motores de la búsqueda de reforzadores, y su alteración neuroquímica inducida por drogas como la cocaína se ha correlacionado con la sensibilización locomotora (Cadoni y cols. 2000; Cadoni y cols. 2003). Este abordaje permitió establecer el correlato neuroquímico de



una serie de experimentos comportamentales incluidos en el Objetivo específico 1. Dado que los experimentos de diálisis fueron en animal no anestesiado, la cánula fue fijada al cráneo con acrílico dental. La unión del acrílico al cráneo se fortaleció mediante la colocación de 3 tornillos dispuestos en forma equidistante a la cánula de diálisis (Figura 6B). Luego de la intervención los animales fueron colocados en la cámara de diálisis (Figura 6D) hasta el día del experimento y monitorizados durante su recuperación.



**Figura 6.** (A) Esquema del aparato esterotáxico. (B) Diagrama de la cirugía esterotáxica. Se muestra la localización de la cánula de diálisis en relación a Bregma y los puntos indican la ubicación de los tornillos que fortalecen la fijación de la cánula al cráneo. (C) Diagrama de un corte coronal del cerebro de rata. La flecha indica la localización de la región de interés (NAcc core). NAcc: Núcleo Accumbens; CP: Caudado-Putamen. Tomado de Paxinos y Watson, 2005. (D) Setup experimental de la microdiálisis intracerebral en animal despierto y sin restricción de movimiento. Se puede apreciar la bomba de perfusión equipada con una jeringa Hamilton conectada por *tubings* de plástico a la cánula de diálisis. El soporte de los *tubings* contó con un sistema *anti-rolling* para evitar que los mismos se enredasen durante la sesión experimental.

### **Microdiálisis intracerebral**

La cánula de diálisis se conectó 24 hs después de la cirugía a una bomba de perfusión por la cual se perfundió líquido cefaloraquídeo artificial (LCRa; NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.18 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM) a un flujo continuo de 1.5 µl/min. Pasados 100

min. de estabilización se comenzó con la colecta de las muestras de diálisis cada 20 min. Luego de la colecta de 4 muestras basales se inyectó en forma ip. cocaína (5 mg/kg) o cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg), y se colectaron muestras durante 160 min. adicionales. Se cuantificaron los niveles de DA y sus metabolitos ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA). También se analizaron los niveles del ácido 5-hidroxi-indoleacético (5-HIAA, metabolito de la serotonina), con el fin de llevar un registro de posibles cambios a nivel de otros sistemas de neurotransmisión.

### ***Sistema de análisis de las muestras de microdiálisis***

Las muestras de diálisis fueron analizadas inmediatamente después de su colecta mediante un sistema de HPLC-DE (Waters 2465) equipado con una columna C-18 (partículas 100 Å, 100 mm x 2 mm; Phenomenex Luna) y un detector electroquímico Epsilon eP5. El potencial de oxidación fue fijado a +0.60 V de acuerdo al electrodo de referencia Ag/AgCl. El límite de detección de DA fue de 0,20 ng/mL. La composición de la fase móvil fue la siguiente: ácido cítrico (0.15 M), octil sulfato de sodio (0.7 mM), acetonitrilo 3% y tetrahidrofurano 1,5% a pH = 3.0. El flujo de trabajo fue de 0.3 mL/min. Se procesaron soluciones estándar diariamente para comprobar el estado del equipo y la correcta detección de las moléculas de interés.

### ***Análisis histológico para la verificación de la localización de las cánulas***

Luego de finalizado cada experimento, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical. Los cerebros fueron disecados y congelados a -20°C. Posteriormente, se determinó la localización de las cánulas mediante el análisis de cortes histológicos, realizados con crióstato. Únicamente los datos provenientes de animales que tuvieron una localización correcta de la cánula fueron incluidos en los resultados.

### ***Análisis Estadístico***

Los datos se muestran como la Media  $\pm$  Error Estándar Medio (EEM), y fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (muestras y tratamiento) para medidas repetidas, seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa Statistica 10 y GraphPad Prism 5.01, respectivamente. La significancia estadística fue fijada en  $P < 0.05$ .

### **OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Estudio de la propiedad motivacional del sucedáneo de PBC.**

Para la compleción de este objetivo se utilizó la técnica de autoadministración intravenosa en ratas. Este modelo se considera uno de los más fiables y validados para evaluar el valor motivacional y el comportamiento de búsqueda de droga en ratas. El mismo posee la ventaja de permitir la medición directa de la motivación del animal por la obtención de droga, ya que la administración de la misma es contingente, o sea, mediada por las acciones del animal y no por un investigador (O'Brien y Gardner, 2005).

La técnica de autoadministración intravenosa no está disponible en nuestro país, por lo que estos experimentos se llevaron a cabo durante dos pasantías (octubre-noviembre 2013 y octubre 2014) en el marco de una colaboración de nuestro laboratorio con la Dra. Valentina Valentini del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Estudios de Cagliari, Italia. Las pasantías fueron financiadas por el programa "Pasantías en el Exterior" de PEDECIBA, y Fondo Clemente Estable - Modalidad II, Proyecto 100466, ANII. Debido a impedimentos legales del traslado de PBC a Italia, esta serie de experimentos fueron llevados a cabo únicamente la combinación de cocaína y cafeína.

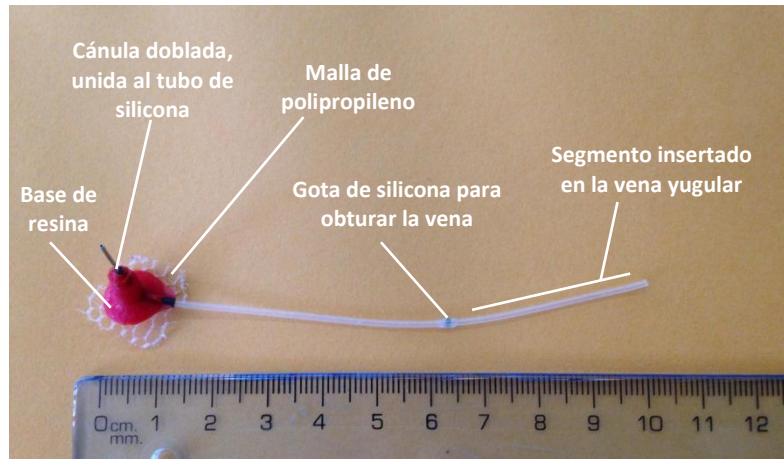
#### ***Grupos Experimentales***

Los animales fueron asignados aleatoriamente a los siguientes grupos experimentales: cocaína (0,25 o 0,125 mg/kg/infusión, i.v.), cafeína (0,125 o 0,0625 mg/kg/infusión, i.v.) y cocaína + cafeína (0,25 mg/kg + 0,125 mg/kg o 0,125 mg/kg + 0,0625 mg/kg por infusión, i.v.). Estas dosis se encuentran ajustadas para la administración intravenosa, pero se mantuvo la relación 2:1 entre cocaína y cafeína que se analizó en los Objetivos específicos 1 y 2: cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg), la cual se corresponde con el sucedáneo de PBC 7.

Los animales fueron alojados de forma individual y manipulados diariamente una semana antes del comienzo de las sesiones de autoadministración.

#### ***Implantación del catéter de administración***

Cinco días antes del inicio del experimento, a los animales se les realizó una cirugía para la implantación de un catéter en la vena yugular derecha, a través del cual recibirán la droga. Los catéteres fueron construidos en el laboratorio, tres días antes de la operación (Figura 7).

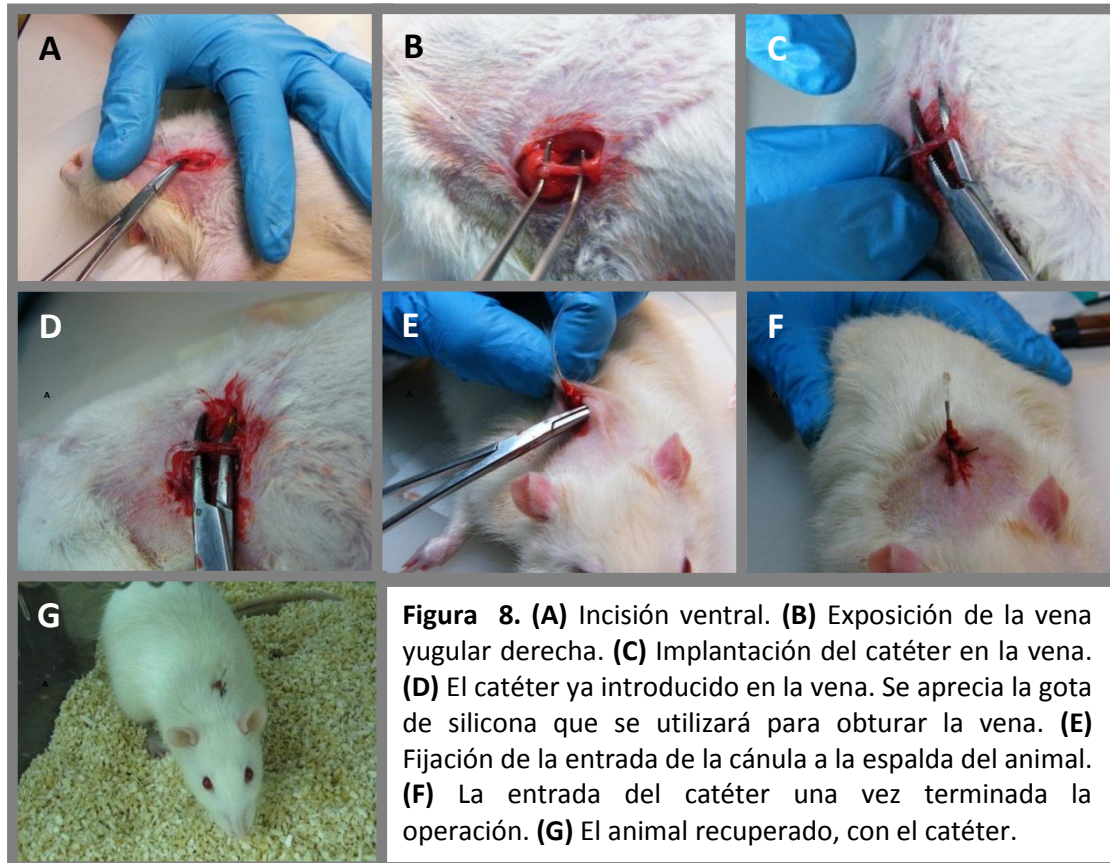


**Figura 7.** Ejemplo de los catéteres utilizados en el experimento, fabricado en el laboratorio de la Dra. Valentini.

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato cloral diluido (400 mg/kg ip.) y se les expuso la vena yugular derecha desde el lado ventral del animal. Se seccionó una pared de la vena para la implantación del catéter, y la misma se selló mediante una gota de silicona presente en el catéter, y posterior sutura. El catéter se dispuso de forma subcutánea hacia el lado dorsal del animal, de forma que la entrada externa del mismo se estableció en la región interescapular (Figura 8). La entrada se fijó a la espalda por medio de una malla de polipropileno que permite una rápida integración con el tejido, y disminuye la reacción de cuerpo extraño. Los detalles del procedimiento quirúrgico efectuado pueden hallarse descritos en Thomsen y Caine, 2005.

Luego de la intervención, los animales fueron colocados en sus cajas y monitorizados durante su recuperación.

Desde el día de la cirugía, hasta el final del experimento, los catéteres fueron tratados diariamente con enrofloxacina (antibiótico) y salino heparinizado.

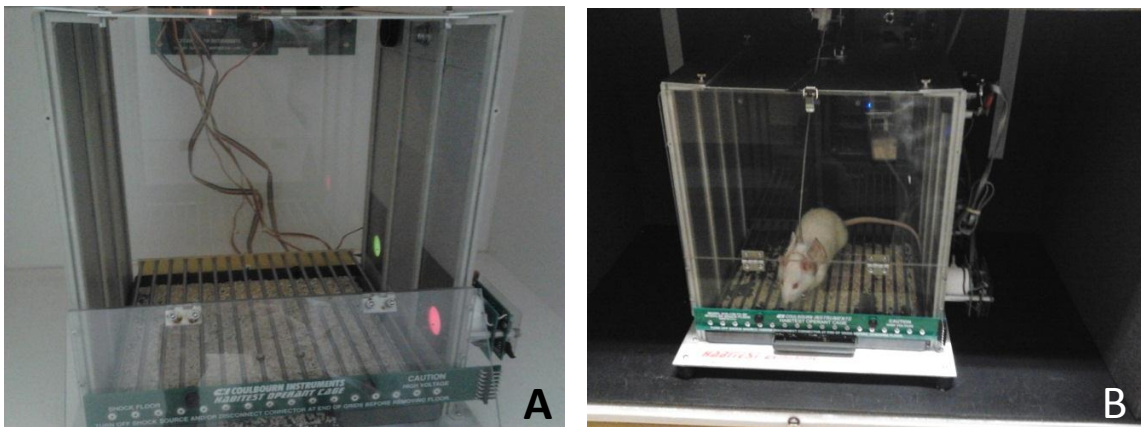


### ***Dispositivo de autoadministración***

El modelo de autoadministración consistió en cámaras de condicionamiento operante, alojadas dentro de cajas a prueba de sonido. Cada cámara de autoadministración contiene dos orificios, uno activo y otro inactivo, donde el animal puede introducir la nariz (*nose-poke*). A su vez, cada orificio se encuentra iluminado con luces de distintos colores que sirven como estímulo discriminativo para el animal. En este caso, el orificio activo fue iluminado con luz verde y el inactivo con luz roja (Figura 9A).

Previo a cada sesión diaria los catéteres fueron lavados con salino. Los animales eran entonces conectados al tubo de administración de la droga y colocados en la cámara de condicionamiento (Figura 9B). En cada sesión se desarrollaban las siguientes fases: 1) fase de preparación, la cual incluía la activación de la bomba por 4 segundos para llenar el catéter yugular con la droga (volumen muerto 50  $\mu$ l). 2) fase de disponibilidad de la droga, donde un *nose-poke* en el orificio activo podía resultar en el cambio a la siguiente fase. 3) fase de infusión, que consistía en la infusión de la droga por 2 segundos (24  $\mu$ l). 4) un período refractario de 20 segundos seguido a la infusión de la droga, donde los *nose-pokes* se registraban pero no resultaban en infusiones adicionales de la droga. Durante el período refractario la cámara de condicionamiento era iluminada y la luz de ambos orificios era roja. Una vez terminado este período, la

luz de la cámara se apagaba y la disponibilidad de droga era indicada por la luz verde en el orificio activo.



**Figura 9.** Cámara de condicionamiento operante para la autoadministración intravenosa. **A.** Se utilizaron luces como estímulos discriminativos, correspondiendo la luz verde para el orificio activo y la roja para el inactivo. **B.** Animal con el catéter conectado al tubo de administración, a punto de comenzar la sesión.

Se cuantificaron las respuestas realizadas por cada rata en ambos orificios (número de *nose-pokes* activos e inactivos) y el correspondiente número de reforzadores recibidos (número de infusiones).

### **Protocolo Experimental**

Durante los primeros 15 días los animales tuvieron acceso a la droga en sesiones diarias de una hora, bajo un régimen de Razón Fija 1 o *Fixed Ratio 1* (FR1). Bajo este régimen, cada *nose-poke* en el orificio activo resultó en la inyección intravenosa de la droga (cocaína: 0,25 mg/kg/infusión; cafeína 0,125 mg/kg/infusión; cocaína + cafeína: 0,25 mg/kg + 0,125 mg/kg por infusión). De la 16<sup>ta</sup> a la 21<sup>va</sup> sesión los animales continuaron bajo el mismo régimen de FR1, pero la dosis de las drogas administradas se redujo a la mitad (cocaína: 0,125 mg/kg/infusión; cafeína 0,0625 mg/kg/infusión; cocaína + cafeína: 0,125 mg/kg + 0,0625 mg/kg por infusión). Los animales son capaces de regular su nivel de consumo (Gerber y Wise 1989), por lo que la reducción de la dosis se utiliza para testear si los mismos adquirieron el comportamiento de búsqueda, y aprendieron la acción asociada a la recompensa durante la primera etapa del protocolo.

En una tercera etapa, de la 22<sup>va</sup> a la 28<sup>va</sup> sesión, los animales se autoadministraron la droga bajo un régimen progresivo denominado *progressive ratio 3-4* (PR 3-4). Bajo este régimen, para obtener las sucesivas inyecciones de la droga el animal debía alcanzar un número acumulativo creciente de *nose-pokes* en el orificio activo, determinado por la siguiente ecuación:



Número de *nose-pokes* necesarios =  $[5e^{(\text{número de inyección} \times 0,2)}] - 5$

De esta forma, el protocolo de inyección del PR 3-4 está definido por la siguiente serie *nose-pokes* necesarios para las inyecciones sucesivas: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62,77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603... Nótese que para la tercer inyección son necesarios 4 *nose-pokes*, lo que determina el nombre del protocolo (PR 3-4). Durante el PR 3-4 las sesiones fueron más prolongadas, de forma tal que los animales permanecieron en la caja de condicionamiento con acceso a la droga hasta que se cumpliera una de dos condiciones: el animal no alcanzara ninguna infusión en un lapso de 1 hora; luego de un tiempo límite de 5 horas. Este régimen permite cuantificar el comportamiento de búsqueda de droga y es utilizado para modelar la alta motivación por la obtención de drogas característica de la adicción (Deroche-Gamonet y cols. 2004).

Con los datos obtenidos en esta fase se calculó el llamado punto de quiebre o *breaking point* (BP). Este parámetro se define como el número de *nose-pokes* correspondiente a la última infusión lograda dentro del régimen progresivo, antes de cesar las respuestas del animal. El BP es interpretado como un indicador del estado motivacional, del esfuerzo máximo que está dispuesto a realizar el animal para la obtención de una infusión de la droga (Richardson y Roberts, 1996).

Todos los procedimientos experimentales se realizaron durante la fase diurna, entre las 8:00 y 17:00 hs.

#### *Análisis Estadístico*

Los datos se muestran como la Media  $\pm$  Error Estándar Medio (EEM), y fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (régimen y tratamiento) para medidas repetidas, y ANOVA de una vía para medidas independientes (tratamiento), ambos seguidos del test de comparación múltiple Newman-Keuls. El *t-Student* test se utilizó para comparar los *nose-pokes* activos vs inactivos. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa Statistica 10 y GraphPad Prism 5.01, respectivamente. La significancia estadística fue fijada en  $P < 0.05$ .

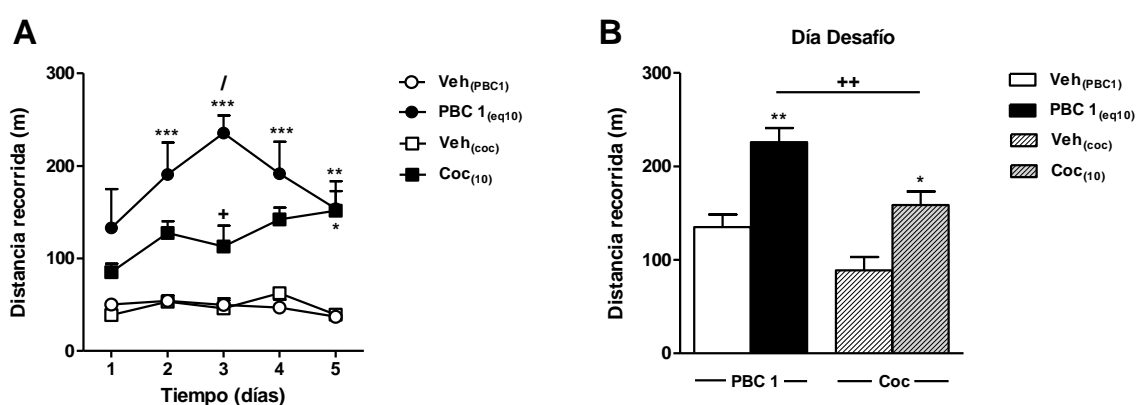
## RESULTADOS I

### 1. Estudio del fenómeno de sensibilización comportamental inducido PBC.

#### 1.1 Evaluación del desarrollo y expresión de la sensibilización comportamental inducida por una muestra de PBC con alto contenido en cocaína y cafeína (PBC1), mediante el análisis de la actividad locomotora en el modelo de CA.

En primer lugar se evaluó la sensibilización comportamental inducida por 5 días de tratamiento con PBC 1 (a dosis equivalente de cocaína base de 10 mg/kg) y un período de abstinencia (Protocolo I, Figura 5A en Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 10A, la inyección repetida de PBC 1 y cocaína indujo un incremento gradual en la distancia recorrida en relación a sus controles respectivos, lo que sugiere que ambos grupos fueron capaces de desarrollar la sensibilización comportamental. Sin embargo, también se observaron algunas diferencias entre PBC 1 y cocaína en este proceso. Los animales pre-tratados con PBC 1 incrementaron su actividad locomotora de manera pronunciada, diferenciándose estadísticamente de su control desde el segundo día en adelante, mientras que el pre-tratamiento con cocaína no alcanzó un efecto significativo sino hasta el último día de tratamiento. Asimismo, el grupo pre-tratado con PBC 1 presentó un pico de actividad al tercer día, donde se halla la separación máxima entre ambas drogas ( $p < 0.05$ ), y luego decae hasta alcanzar el mismo valor que el grupo de cocaína (Figura 10A).



**Figura 10.** Desarrollo (A) y expresión (B) de la sensibilización comportamental inducida por PBC 1 y cocaína en animales expuestos al Protocolo I. Las dosis están expresadas en mg/kg y los respectivos vehículos son mostrados entre paréntesis [PBC 1<sub>(eq10)</sub>; Coc<sub>(10)</sub>; Veh<sub>(PBC1)</sub>; Veh<sub>(coc)</sub>]. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una y dos vías seguidos de Newman-Keuls *post hoc test*. \* = vs. cada grupo control; + = vs PBC 1<sub>(eq10)</sub>; / = vs. Día 1. \*\*\*= P < 0.001; \*\*, ++ = P < 0.01; \*, +, / = P < 0.05. N = 4-6.



La Figura 10B muestra la actividad locomotora de los animales al recibir una dosis desafío de la droga, luego de 5 días de abstinencia. Tanto el grupo de PBC 1 como el de cocaína expresaron la sensibilización comportamental, ya que ambos presentaron una distancia recorrida mayor a sus respectivos controles, que recibieron la droga por primera vez. A su vez, el efecto locomotor del desafío de PBC 1 en los animales pre-tratados con PBC fue significativamente mayor al inducido por una inyección de cocaína en los animales pre-tratados con cocaína ( $p < 0.01$ ), lo que sugiere una mayor expresión de la sensibilización. Los controles por otro lado, no mostraron diferencias significativas entre ellos en ninguna de las dos fases: durante el desarrollo al ser pre-tratados con los vehículos, ni en la expresión al recibir una inyección de ambas drogas (Figura 10 A y B).

### **1.2 Determinación de la contribución de cocaína y cafeína al fenómeno de sensibilización comportamental inducida por PBC.**

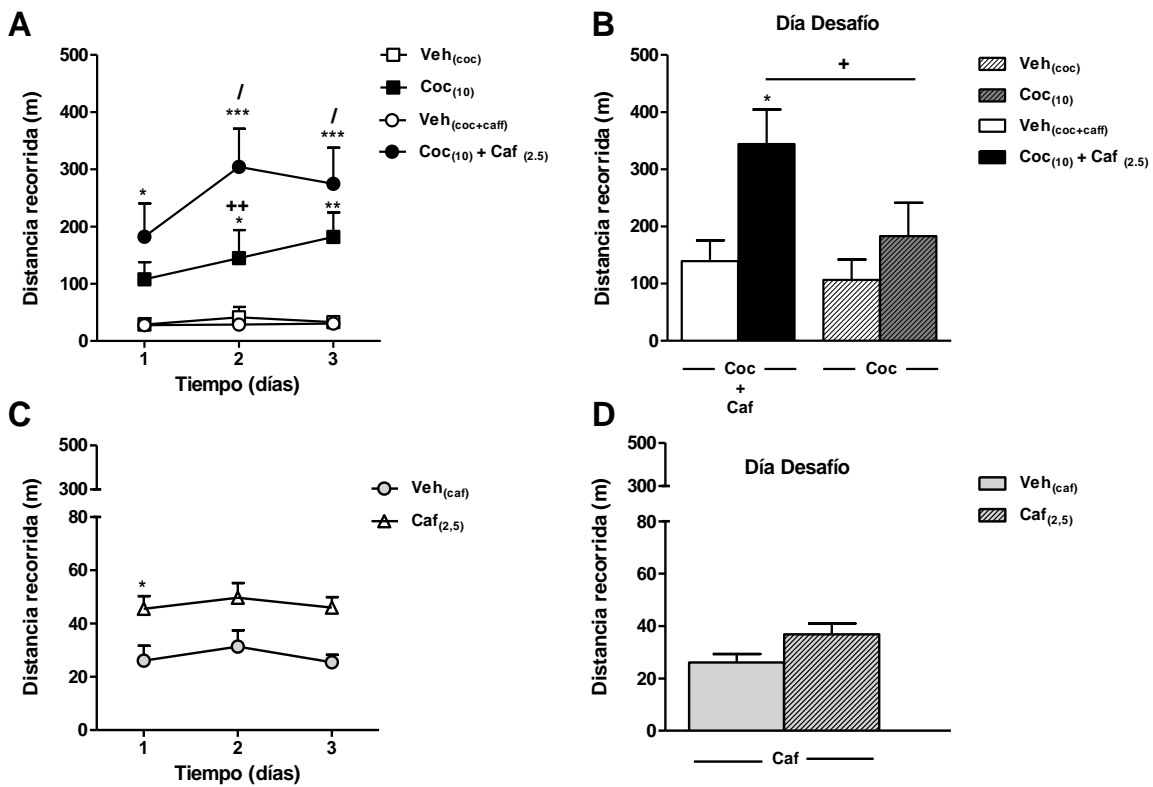
Interesados en el pico de actividad en el día 3 y la expresión aumentada exhibida por los animales tratados con PBC en relación a los de cocaína (Figura 10), se buscó confirmar si la presencia de cafeína en la PBC 1 explicaba las diferencias en desarrollo y expresión de la sensibilización observadas. Con este fin, se aplicó un protocolo de sensibilización abreviado de sólo 3 días de tratamiento (Protocolo II, Figura 5B en Materiales y Métodos), en el cual se administró de forma repetida la combinación de cocaína y cafeína a una dosis equivalente a su contenido en PBC 1.

Los resultados mostraron que la inyección repetida del sucedáneo de PBC 1 y cocaína fue capaz de inducir un aumento gradual y significativo de la distancia recorrida a lo largo de los días, en comparación con sus respectivos grupos controles (Figura 11A), demostrando el desarrollo de la sensibilización. Una máxima diferencia entre las drogas se pudo evidenciar en el segundo día de tratamiento ( $p < 0.01$ ).

En el Día Desafío se pudo observar que mientras los animales tratados con cocaína desarrollaron la sensibilización, no lograron expresarla cuando fueron desafiados con una inyección de cocaína (Fig. 11B), indicando que tres días de tratamiento no fueron suficientes para el establecimiento de la sensibilización comportamental. En contraste, un efecto significativo fue observado en aquellos animales tratados con el sucedáneo de PBC 1 en comparación con su respectivo grupo control ( $p < 0.05$ ), demostrando que estos animales alcanzaron la expresión de la sensibilización con sólo tres días de tratamiento. Aún más, el sucedáneo de PBC 1 indujo un efecto más robusto en comparación con los animales pre-tratados y desafiados con cocaína ( $p < 0.05$ ) (Figura 11B). Por lo tanto, estos resultados mostraron que la presencia de cafeína fue capaz de acelerar y potenciar la expresión de la sensibilización inducida por el sucedáneo de PBC 1. No hubo diferencia estadística durante la fase de desarrollo o expresión de la

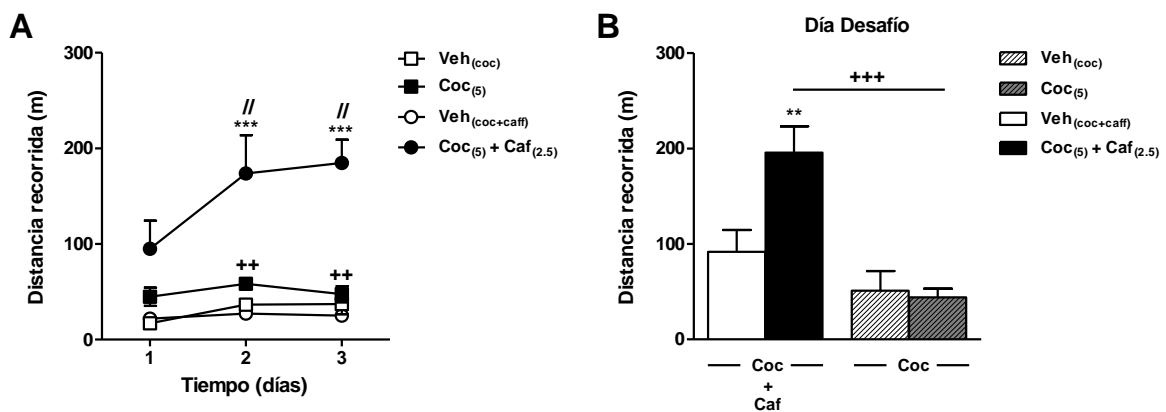
sensibilización entre los animales pre-tratados con vehículo y desafiados con las respectivas drogas (Figura 11 A y B).

Junto con estos experimentos se llevó a cabo un grupo experimental tratado con cafeína (2,5 mg/kg) a modo de control, cuyo resultado por razones de claridad se muestra por separado (Figura 11 C y D). Durante del desarrollo de la sensibilización, los animales pre-tratados con cafeína exhibieron una mayor distancia recorrida en comparación con el grupo control en el Día 1 ( $p < 0.05$ ), en concordancia con su propiedad psicoestimulante. Sin embargo, no se observó un incremento de la actividad locomotora en los días posteriores, no diferenciándose estadísticamente del control (Figura 11C). Tampoco se encontraron efectos significativos en el Día Desafío (Figura 11D). En conjunto, estos resultados indican que la cafeína sola, a la dosis ensayada, no es capaz de inducir el fenómeno de sensibilización comportamental con tres días de tratamiento.



**Figura 11.** Desarrollo y expresión de la sensibilización comportamental inducida por el sucedáneo de PBC 1 (Coc + Caf), cocaína (A-B) y cafeína (C-D) (Protocolo II). Las dosis están expresadas en mg/kg y los respectivos vehículos son mostrados entre paréntesis [Coc<sub>(10)</sub>+Caf<sub>(2.5)</sub>; Coc<sub>(10)</sub>; Caf<sub>(2.5)</sub>; Veh<sub>(coc+caff)</sub>; Veh<sub>(coc)</sub>; Veh<sub>(caf)</sub>]. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM. ANOVA de dos y una seguidos de Newman-Keuls *post hoc* test (A-C) o *t-Student* test (D). \* = vs. cada grupo control; + = vs Coc<sub>(10)</sub>+Caf<sub>(2.5)</sub> ; / = vs. Día 1. \*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\*,++ =  $P < 0.01$ ; \*, +, / =  $P < 0.05$ . N = 4-6.

Considerando el hallazgo obtenido anteriormente, y con el fin de continuar el estudio del rol de la cafeína en la sensibilización inducida por cocaína (e indirectamente, por PBC), otro grupo de animales fue tratado durante 3 días con la combinación de cocaína y cafeína, pero con una dosis menor de cocaína (5 mg/kg) y la misma dosis de cafeína (2.5 mg/kg). Los resultados mostraron que únicamente los animales inyectados con cocaína + cafeína aumentaron la actividad locomotora durante el pre-tratamiento, diferenciándose significativamente del grupo control ( $p < 0.001$ ) y del grupo pre-tratado con cocaína ( $p < 0.01$ ) (Figura 12A). Cocaína (5 mg/kg) en cambio, no modificó la locomoción de los animales durante los 3 días.



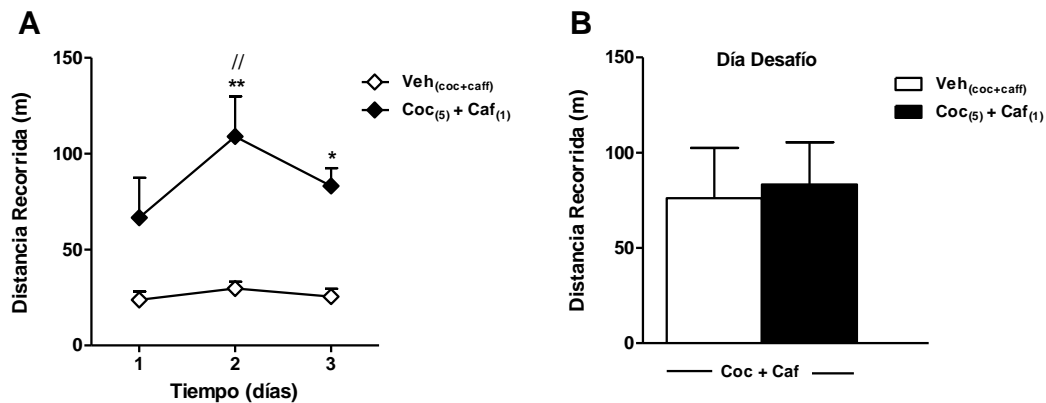
**Figura 12.** Desarrollo (A) y expresión (B) de la sensibilización comportamental inducida por cocaína y la combinación de cocaína + cafeína en animales expuestos al Protocolo II. Las dosis están expresadas en mg/kg y los respectivos vehículos son mostrados entre paréntesis [Coc<sub>(5)</sub> + Caff<sub>(2.5)</sub>; Coc<sub>(5)</sub>; Veh<sub>(coc+caff)</sub>; Veh<sub>(coc)</sub>]. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una y dos vías seguidos de Newman-Keuls *post hoc* test. \* = vs. cada grupo control; + = vs Coc<sub>(5)</sub> + Caff<sub>(2.5)</sub>; / = vs. Día 1. \*\*\*,+++ =  $P < 0.001$ ; \*\*,++,// =  $P < 0.01$ . N= 4-6.

Al evaluar la fase de expresión se observó que, de acuerdo a lo esperado, el pre-tratamiento con cocaína (5 mg/kg) fue incapaz de inducir el fenómeno de sensibilización comportamental (Figura 12B). Por otro lado, los animales pre-tratados y desafiados con cocaína + cafeína exhibieron una fuerte expresión de la sensibilización, manifestada por un aumento significativo de la distancia recorrida en comparación con su grupo control ( $p < 0.01$ ) y el grupo tratado con cocaína sola ( $p < 0.001$ ). Estos resultados confirmaron que la presencia de cafeína facilitó la expresión de la sensibilización incluso en animales tratados con una dosis menor de cocaína. No se hallaron diferencias significativas durante la fase de desarrollo o expresión de la sensibilización entre los animales controles, pre-tratados con vehículo y desafiados con cocaína o la combinación de cocaína y cafeína (Figura 12 A y B).

A continuación se ensayó el mismo protocolo de inyección de 3 días pero con una combinación diferente de cocaína y cafeína, con el propósito de corroborar los efectos observados. Específicamente, se evaluó si el tratamiento con la combinación de la

misma dosis de cocaína (5 mg/kg) y una dosis menor de cafeína (1 mg/kg) era capaz de reproducir la sensibilización comportamental demostrada previamente. Es importante destacar que las dosis utilizadas se basan en las proporciones de cocaína y cafeína presentes en las muestras de PBC.

Como se observa en la Figura 13, los animales tratados con  $\text{Coc}_{(5)} + \text{Caf}_{(1)}$  presentaron una mayor actividad locomotora que sus controles durante el desarrollo de la sensibilización (Figura 13A), pero en el Día Desafío su efecto fue el mismo que los animales que recibieron la droga por primera vez (Figura 13B). Por lo tanto, la combinación de  $\text{Coc}_{(5)} + \text{Caf}_{(1)}$  fue incapaz de expresar la sensibilización comportamental con 3 días de pre-tratamiento. Este resultado reafirma que para que se evidencie un efecto potenciador de la sensibilización inducida tanto por cocaína como por PBC, es necesaria la presencia de cafeína a determinadas proporciones.



**Figura 13.** Evaluación del desarrollo **(A)** y expresión **(B)** de la sensibilización comportamental inducida por la combinación de cocaína (5) + cafeína (1) en animales expuestos al Protocolo II. La dosis está expresada en mg/kg y el vehículo respectivo se muestra entre paréntesis [ $\text{Coc}_{(5)} + \text{Caf}_{(1)}$ ; Veh<sub>(Caf)</sub>]. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM. ANOVA de dos vías seguidos de Newman-Keuls *post hoc test*, y *t-Student* \* = vs. control; / = vs. Día 1. \*\*, // =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ . N = 6.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS I

---

El primer objetivo del trabajo de Tesis se centró en el estudio del fenómeno de sensibilización comportamental evidenciado luego del tratamiento repetido con una muestra de PBC, con el fin de profundizar en los efectos neurobiológicos inducidos por su consumo. A su vez, se diseñaron experimentos para evaluar la contribución de cocaína y cafeína en este fenómeno.

Los resultados obtenidos en estos experimentos demostraron que el tratamiento repetido con PBC fue capaz de generar sensibilización comportamental. Si bien este resultado era esperable, puesto que la PBC es un psicoestimulante y la capacidad de inducir sensibilización es una propiedad que ha sido extensamente comprobada en otras drogas estimulantes (Kalivas y Duffy 1993; Kalivas y cols. 1988; Hook y cols. 1991; Robinson y Becker 1986), estos datos constituyen el primer reporte pre-clínico de sensibilización comportamental inducida por PBC.

Simultáneamente, se observó que los animales tratados con PBC exhibieron una sensibilización más robusta que aquellos animales tratados con cocaína, lo que sugiere una acción aditiva entre sus principales componentes, cocaína y cafeína. Estas observaciones concuerdan con estudios previos del laboratorio que mostraron que la cafeína presente en la PBC es capaz de potenciar su efecto estimulante agudo, y generar una respuesta locomotora mayor a cocaína y PBC no adulterada con cafeína (López-Hill y cols. 2011; Prieto y cols. 2012).

El grupo tratado con PBC 1 se distinguió del grupo cocaína incluso en los primeros días de tratamiento (ver Figura 10). De manera interesante, durante el desarrollo de la sensibilización de PBC 1 los animales mostraron un incremento progresivo de la distancia recorrida hasta el tercer día de tratamiento, dónde se registró un pico de actividad locomotora. En los días siguientes la actividad disminuyó hasta alcanzar el mismo nivel que los animales tratados con cocaína. Este perfil puede explicarse por la aparición de tolerancia a la cafeína asociada a su administración repetida. En este sentido, varios estudios han demostrado que el efecto motor de la exposición a cafeína depende del protocolo de administración. Regímenes de inyecciones diarias resultan en tolerancia a su efecto estimulante, mientras que la administración intermitente, día por medio, resulta en sensibilización locomotora (Holtzman y Finn 1988; Simola y cols. 2006a; Simola y cols. 2006b). Es posible que luego del tercer día de tratamiento con PBC se haya desarrollado una tolerancia gradual a la cafeína, disminuyendo así su impacto en el efecto locomotor de la droga. En el quinto día del protocolo parece haber una tolerancia total al contenido de cafeína presente en la PBC 1, siendo en ése día la cocaína base el único componente activo responsable de su respuesta comportamental. Esto explicaría por qué en el quinto día el efecto de la PBC 1 fue igual al de cocaína sola. Sin embargo, este fenómeno no abolió la expresión potenciada de la

sensibilización, evaluada en el Día Desafío. Probablemente el período de abstinencia, el cual constituye una etapa clave en la consolidación de los cambios neurales asociados a la sensibilización (Pierce y Kalivas 1997), fue suficiente para revertir el proceso de tolerancia.

La sensibilización comportamental tiene un rol clave en la teoría de la sensibilización de incentivo, y su ocurrencia se asocia fuertemente con el desarrollo del proceso adictivo (Robinson y Berridge 2008; Vanderschuren y Kalivas 2000). Por lo tanto, nuestros resultados parecen aportar información relevante para la comprensión de los mecanismos que subyacen a la alta dependencia observada en los consumidores de PBC. A su vez, se ha propuesto que la aparición del fenómeno de sensibilización puede predecir la capacidad de una droga de promover la recaída y la reinstalación del comportamiento de búsqueda de droga (De Vries y cols. 1998; Stekeete y Kalivas 2011). La consideración de los resultados aquí expuestos contribuiría en la planificación y seguimiento de la historia clínica de los consumidores, especialmente durante la abstinencia.

En este trabajo se demostró también que la sensibilización comportamental se desencadena incluso en animales tratados con el sucedáneo de PBC 1 durante sólo 3 días. Cocaína, por otro lado, no fue capaz de expresar la sensibilización. Al considerar el desarrollo de la sensibilización, podemos afirmar que este protocolo abreviado evitó la aparición de tolerancia a la cafeína. Es importante destacar que la única diferencia entre los dos grupos tratados con droga fue la cafeína, lo que confirma que este adulterante presente en la PBC 1 fue el responsable de la potenciación locomotora, y no algún otro compuesto o impureza de la misma.

La asociación entre cocaína y cafeína no es nueva, y otros estudios ya han demostrado su interacción en el fenómeno de sensibilización (Horger y cols. 1991; Kuribara 1994; Schenk y cols. 1990). Sin embargo, en estos estudios se han utilizado protocolos diferentes al ensayado en esta tesis, los cuales implican la pre-exposición a la cafeína en vez de su co-administración con cocaína, así como el uso de dosis mayores a las ensayadas aquí. A su vez, es importante destacar que la gran mayoría de los estudios de sensibilización realizan tratamientos más largos, que involucran de 5 a 15 días de exposición a la droga y entre 7 a 30 días de abstinencia (Crombag y cols. 2002; Kalivas y Duffy 1993; Kalivas y cols. 1993; Seymour y Wagner 2005). En este trabajo, sin embargo, la combinación de cocaína y cafeína actuando como sucedáneo de la PBC, logró inducir sensibilización con sólo 3 días de tratamiento y 5 días de abstinencia. Este hecho distingue al sucedáneo de PBC de la cocaína sola, y sugiere que la cafeína, como adulterante activo de la PBC, es capaz de acelerar el establecimiento de la sensibilización comportamental. El rápido desarrollo de este fenómeno constituye un hallazgo muy relevante, ya que se estima que la sensibilización refleja alteraciones duraderas en áreas del circuito motivacional asociadas al estado de

búsqueda/anticipación (Kalivas y cols. 1993; Vanderschuren y Pierce 2010). Que una droga sea capaz de inducir alteraciones duraderas en este sistema en tan corto plazo podría tener repercusiones importantes en su potencial adictivo, así como también en el *craving* experimentado por sus consumidores.

Vale la pena mencionar brevemente que si bien el protocolo de 3 días de tratamiento con cafeína evita la aparición del fenómeno de tolerancia, el mismo no fue capaz de inducir sensibilización comportamental (ver Figura 11 C-D). Este resultado se encuentra dentro de lo esperado, puesto que la cafeína tiene propiedades reforzadoras débiles (Daly and Fredholm 1998) y los reportes que han demostrado la sensibilización a cafeína usan protocolos más largos, administración intermitente y dosis más altas (Cauli y cols. 2003; Hooks y cols. 1992; Simola y cols. 2006a; Zancheta y cols. 2012).

De manera interesante, al reducir la dosis de cocaína a la mitad (5 mg/kg), el sucedáneo de PBC aún logró desarrollar y expresar la sensibilización. Esto significa que la presencia de cafeína podría estar compensando este decremento mediante la potenciación del efecto de la cocaína, y facilitando la aparición de la sensibilización incluso con cantidades menores de la misma. Considerando que la adulteración involucra el agregado intencional de sustancias farmacológicamente activas, con la intención de usar menor cantidad de una droga particular sin que el consumidor sea consciente de ello, este resultado demuestra la eficacia de cafeína como adulterante en la PBC, e indirectamente la importancia de los mismos en los efectos neurobiológicos del consumo de drogas. Por otro lado, parece ser necesaria la presencia de cierta cantidad o proporción de cafeína para que aparezca este efecto facilitador, ya que al disminuir la dosis de cafeína (1 mg/kg) el sucedáneo fue incapaz de inducir la sensibilización (Figura 13). De forma más específica, esta combinación inició el desarrollo de la sensibilización, pero no logró su expresión, por lo que el tratamiento no fue suficiente para consolidar los cambios neurales durante la abstinencia asociados a la misma. Este resultado deja en evidencia la disociación que puede existir entre los mecanismos que subyacen a las dos fases de la sensibilización, así como también la importancia de la abstinencia, ya sea para afianzar o revertir las adaptaciones producidas por la droga (Pierce y Kalivas 1997).

La potenciación motora observada en los animales tratados con PBC 1 y la combinación de cocaína y cafeína puede explicarse por la interacción entre los sistemas DAérgico y adenosinérgico en los circuitos de los ganglios basales asociados al control del movimiento, especialmente a nivel del NAcc y el ED (Fisone y cols. 2004). El 95 % de las neuronas de estas dos regiones consisten en NEMs GABAérgicas, las cuales reciben inervación excitatoria glutamatérgica desde la CPF, e inervación moduladora DAérgica desde el ATV en el caso del NAcc, y desde la SNpc en el ED (Lee y cols. 2006,

Zahm 2000). Como se mencionó anteriormente, estas neuronas pueden dividirse en dos sub-poblaciones: las NEMs que contienen sustancia P y dinorfina, ricas en receptores  $D_1$  y  $A_1$ , y las NEMs que contienen encefalina, ricas en receptores  $D_2$  y  $A_{2A}$  (Cauli y Morelli 2005). A nivel del ED, estas sub-poblaciones dan origen a la vía directa e indirecta respectivamente, las cuales son responsables del control motor. La vía directa proyecta a la sustancia nigra pars reticulata (SNpr) y al pálido ventral interno (PVi), mientras que la indirecta proyecta al pálido ventral externo (PVe, núcleo entopeduncular en roedores) y al núcleo subtalámico (NST) antes de alcanzar la SNpr/PVi. Las neuronas de la SNpr/PVi proyectan a su vez al tálamo, el cual conecta con la corteza, cerrando así el circuito de los ganglios basales y desencadenando la ejecución del programa motor. En términos generales, la activación de la vía directa desinhibe las neuronas tálamo-corticales y facilita la actividad motora, y la activación de la vía indirecta tiene el efecto opuesto, potencia la inhibición de estas neuronas tálamo-corticales y reduce la actividad motora (Ferré 2010; Fisone y cols. 2004; Lobo y Nestler 2011). La DA, actuando sobre los receptores  $D_1$  y  $D_2$  de las NEMs, tiene un rol crítico en la regulación del movimiento. Debido su distribución diferencial, la activación de los receptores  $D_1$  estimula las neuronas de la vía directa, mientras que la activación del receptor  $D_2$  inhibe las neuronas de la vía indirecta. Debido al control opuesto de las vías directa e indirecta sobre las neuronas tálamo-corticales, el efecto neto del aumento de DA, ya sea de forma natural o inducido por drogas como la cocaína, es la estimulación locomotora (Lobo y Nestler 2011; Surmeier y cols. 2007). Sin embargo, la adenosina endógena actuando como regulador, amortigua este efecto mediante su acción sobre los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$ , ya que la activación de estos receptores tiene efectos antagónicos a los receptores DAérgicos con los cuales co-localizan. La cafeína presente en la PBC bloquearía estos receptores, contrarrestando el control inhibitorio ejercido por la adenosina sobre el efecto DAérgico. El resultado final es una mayor desinhibición de las neuronas tálamo-corticales, y la subsecuente potenciación locomotora (Ferré 2010; Fisone y cols. 2004). El mismo fenómeno ocurre en el NAcc, particularmente en el NAcc *core*. También en esta región se ha descrito una vía directa que proyecta hacia la SNpr y posteriormente al tálamo, y un circuito indirecto que pasa por el PVe y el NST antes de alcanzar la SNpr (Heimer y cols. 1997; Sesack y Grace 2010). La activación de las neuronas del NAcc *core*, a diferencia de las neuronas estriatales, se ha asociado principalmente a la desinhibición de planes motores específicos para la obtención de recompensa o la evitación de un estímulo dañino (Sesack y Grace 2010).

En el NAcc *shell*, si bien existen algunas teorizaciones al respecto, la división de sus neuronas en una vía directa e indirecta es compleja y no se encuentra claramente establecida debido a su naturaleza híbrida: parte del NAcc *shell* es considerado de los ganglios basales y otra parte del sistema límbico (Sesack y Grace 2010).



Es importante mencionar que si bien la contribución relativa de los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  a la potenciación locomotora inducida por cafeína no se encuentra completamente dilucidada, algunas evidencias sugieren un rol predominante de los receptores  $A_{2A}$ , especialmente a bajas dosis de cafeína (Yacoubi y cols. 2000). La expresión de estos receptores está enriquecida y delimitada a zonas densamente innervadas por fibras DAérgicas, como el ED, NAcc y tubérculo olfatorio. Los receptores  $A_1$  en cambio, se encuentran distribuidos por todo el cerebro, presentando una baja expresión en estas áreas (Ferré y cols. 1997). Además, se ha demostrado que el antagonista específico del receptor  $A_{2A}$  SCH 58261 fue capaz de aumentar la actividad locomotora en ratas de forma similar a la cafeína, mientras que la administración de DPCPX (antagonista del receptor  $A_1$ ) no alteró la locomoción (Svenningsson y cols. 1997). El receptor  $A_{2A}$  también ha mostrado tener un papel importante en la sensibilización locomotora. En concordancia con nuestros resultados, un trabajo publicado por Filip y colaboradores (2006) demostró que la inyección de un agonista del receptor  $A_{2A}$  inhibe la sensibilización comportamental inducida por cocaína, y lo contrario ocurre al inyectar un antagonista. En el mismo sentido y de forma más reciente, Hobson y colaboradores (2012) comprobó que la inyección local de un agonista  $A_{2A}$  en el NAcc *core* también es capaz de inhibir la expresión de la sensibilización a cocaína. Estas evidencias acompañan nuestros hallazgos y resaltan la importancia de la regulación adenosinérgica en el proceso de sensibilización. Sin embargo, es importante destacar que en estos estudios se utilizaron moléculas específicas para los distintos receptores a dosis de laboratorio, mientras que nosotros nos enfocamos en un antagonista no selectivo, a dosis equivalentes a su contenido en una droga de abuso. Finalmente, ambos autores proponen una explicación de este efecto mediante un mecanismo basado en la interacción entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$ , que coincide con el mecanismo detallado previamente.

## RESULTADOS II

---

### 2. Estudio del fenómeno de sensibilización neuroquímica inducido por el sucedáneo de PBC.

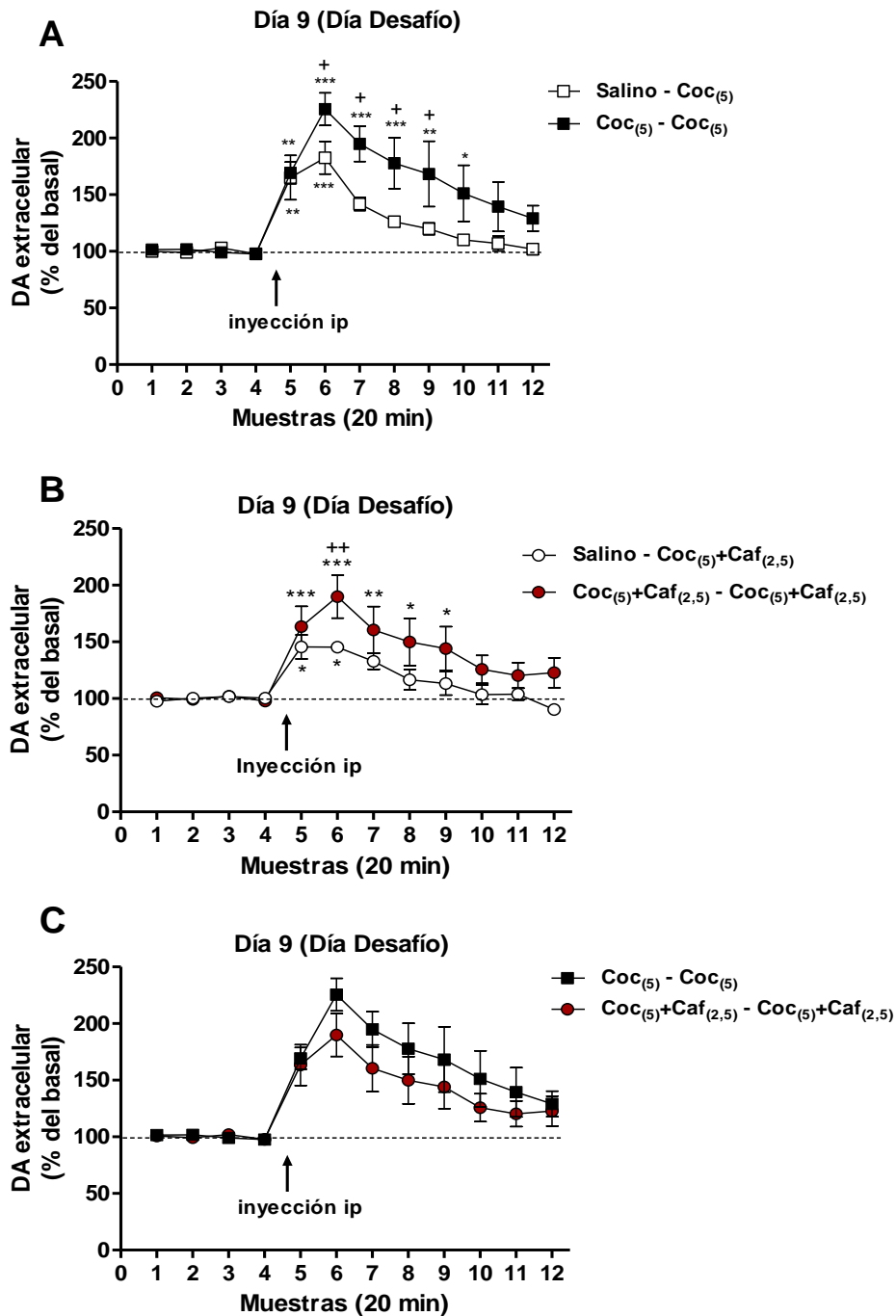
**2.1.** *Determinación del efecto neuroquímico de la combinación de cocaína y cafeína sobre los niveles extracelulares de DA y sus metabolitos en el NAcc core mediante la técnica de microdiálisis intracerebral in vivo, utilizando el tratamiento de sensibilización comportamental.*

Interesados en el correlato neuroquímico de la sensibilización comportamental descrita previamente, en esta serie de experimentos se evaluó la sensibilización neuroquímica inducida por el tratamiento repetido de cocaína (5 mg/kg) o cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg). Con este propósito se cuantificó la liberación de DA en el NAcc core al recibir un desafío de la droga, luego de 3 días de tratamiento y un período de abstinencia (Protocolo II).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. La inyección de cocaína (5 mg/kg) indujo un aumento significativo en la liberación de DA en ambos grupos experimentales respecto a sus niveles basales, que luego decae gradualmente con el tiempo (Figura 14A). Este resultado se encuentra en concordancia con lo descrito en la literatura (Di Chiara e Imperato 1988; Pettit y cols. 1990; Kalivas y Duffy 1993). Sin embargo, los animales pre-tratados con cocaína exhibieron un aumento de DA significativamente mayor a los animales pre-tratados con salino ( $p < 0.05$ ). Este resultado demuestra que el pre-tratamiento con cocaína (5 mg/kg) fue capaz de inducir sensibilización neuroquímica (Figura 14A). Esta diferencia se hizo evidente a los 40 minutos de la inyección de la droga, y se mantuvo por 80 minutos (muestras 6-9). Teniendo en cuenta que cocaína a ésta misma dosis y protocolo de tratamiento no indujo sensibilización comportamental (ver Figura 12), la sensibilización neuroquímica observada no acompaña el efecto comportamental inducido por la droga. Este resultado complejiza el fenómeno de sensibilización, y descarta una asociación simple entre los niveles extracelulares de DA y la sensibilización comportamental.

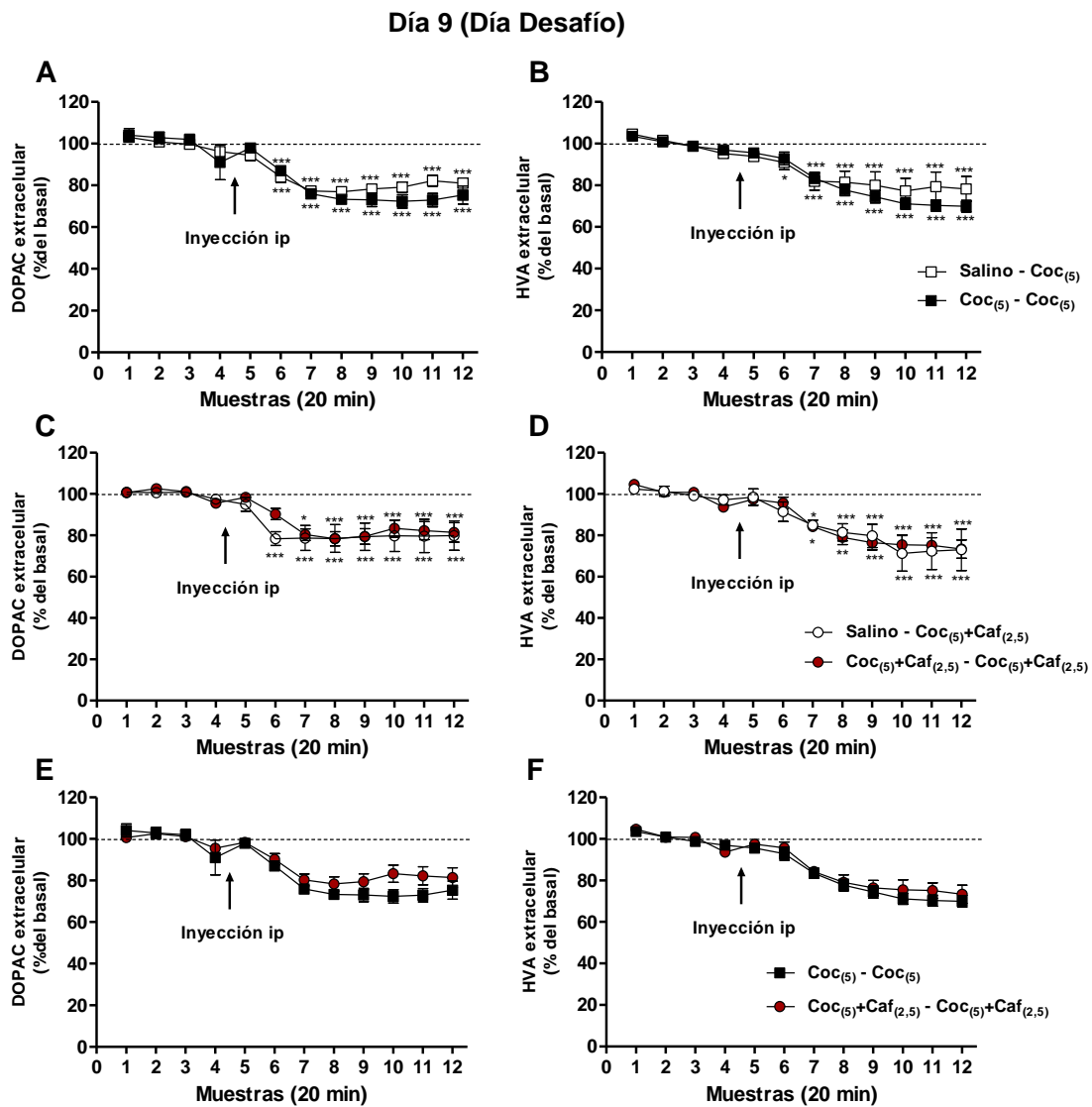
En la Figura 14B se observa que el desafío con cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg) indujo un aumento en la liberación de DA en ambos pre-tratamientos respecto a sus niveles basales. Al igual que lo ocurrido con cocaína (5 mg/kg), los animales pre-tratados con cocaína + cafeína presentaron un incremento en la DA extracelular mayor que los animales pre-tratados con salino, por lo que podemos afirmar que esta combinación también indujo un fenómeno de sensibilización neuroquímica. Aunque a diferencia de cocaína (5 mg/kg), el efecto de la combinación de las drogas se diferencia

estadísticamente de su control únicamente en la muestra 6, 40 minutos luego de la inyección ( $p < 0.01$ ). Con motivo de fortalecer la claridad y comprensión de los datos, en esta sección la comparación entre los grupos tratados con las drogas se muestra en una nueva gráfica, por separado (Figura 14C).



**Figura 14.** Niveles extracelulares de DA en el NAcc *core* luego de un tratamiento de sensibilización (Día Desafío). Luego de 4 muestras basales se inyectó (A) cocaína (5 mg/kg) o (B) cocaína (5mg/kg) + cafeína (2,5mg/kg). (C) Comparación entre ambos grupos experimentales. Los datos están expresados como porcentaje de DA respecto a los niveles basales (Media  $\pm$  EEM). ANOVA de 2 vías seguido de Newman-Keuls *post hoc test*. \*=*vs* valores basales; +=*vs* tratamiento. \*,+= $p < 0,05$ ; \*\*,++= $p < 0,01$ ; \*\*\*,+++= $p < 0,001$ . N=4-6

niveles extracelulares de DA con respecto al grupo pre-tratado con cocaína (5 mg/kg). Aún más, se puede observar una leve tendencia del grupo cocaína + cafeína a presentar una menor liberación de DA que el grupo tratado con cocaína (190 % vs 225 % respectivamente). Dado que la dosis de cocaína es la misma en ambos casos, y que el grupo cocaína + cafeína sí fue capaz de inducir sensibilización comportamental (Figura 12), este resultado sugiere la existencia de algún mecanismo alterno a la liberación de DA no considerado inicialmente, probablemente relacionado con la alteración de la transmisión adenosinérgica inducida por la cafeína.



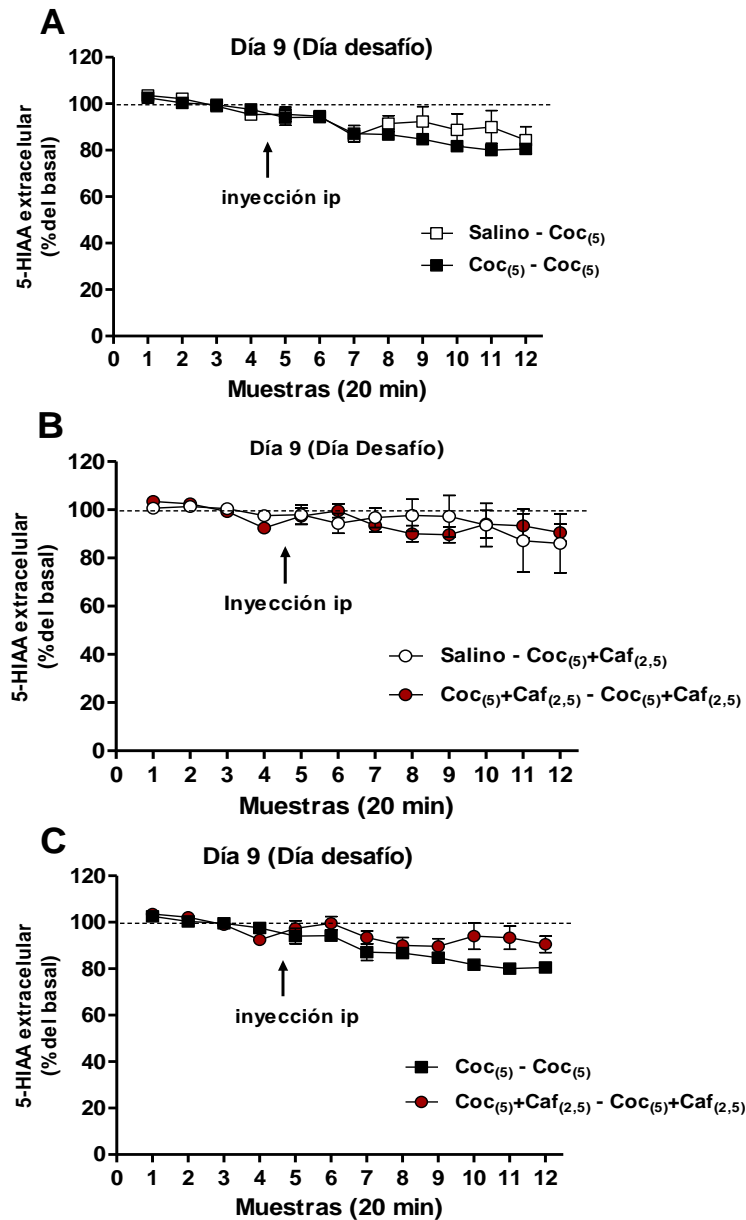
**Figura 15.** Niveles extracelulares de DOPAC y HVA en el NAcc *core* luego de un tratamiento de sensibilización (Día Desafío). Luego de 4 muestras basales se inyectó (A-B) cocaína (5 mg/kg) o (C-D) cocaína (5mg/kg) + cafeína (2,5mg/kg). (E-F) comparación entre ambos grupos experimentales. Los datos están expresados como porcentaje de DA respecto a los niveles basales (Media  $\pm$  EEM). ANOVA de 2 vías seguido de Newman-Keuls *post hoc test*. \*=*vs* valores basales. \*=*p*<0,05; \*\*=*p*<0,01; \*\*\*=*p*<0,001. N=4-6

También se registraron los niveles extracelulares de DOPAC y HVA, principales metabolitos productos del catabolismo de DA (Figura 15). Como era esperado, el desafío de cocaína (5 mg/kg) indujo una caída en los niveles de ambos metabolitos (Figura 15A-B). Sin embargo, a pesar de que los animales pre-tratados con cocaína presentaron una liberación aumentada de DA (Figura 14A), no se observaron diferencias en los niveles extracelulares de sus metabolitos con respecto a los animales pre-tratados con salino.

El mismo fenómeno se observó en los animales inyectados con cocaína + cafeína (Figura 15C-D). El desafío con la droga indujo una caída de ambos metabolitos de magnitud cercana al inducido por cocaína (5 mg/kg), conformando un perfil muy similar al mismo. No se apreciaron diferencias en los niveles extracelulares de DOPAC y HVA entre los grupos pre-tratados con la droga (Figura 15E-F).

Estos resultados indican que la cafeína presente en la PBC parece no contribuir de manera significativa al catabolismo de la DA.

Por último, se analizó el 5-HIAA para evaluar la participación de otras monoaminas. Como se puede observar en la Figura 16A, luego de la administración de cocaína (5 mg/kg) no se registró ningún efecto significativo sobre los niveles extracelulares de 5-HIAA en relación a sus basales y al grupo pre-tratado con salino. El mismo resultado se obtuvo de los animales desafiados con cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg) (Figura 16B). Tampoco se apreciaron diferencias al comparar los grupos pre-tratados con la droga (Figura 16C). Estos resultados muestran de forma consistente que ninguno de los pre-tratamientos afectó la transmisión serotoninérgica en el NAcc *core*.



**Figura 16.** Niveles extracelulares de 5-HIAA en el NAcc *core* luego de un tratamiento de sensibilización (Día Desafío). Luego de 4 muestras basales se inyectó **(A)** cocaína (5 mg/kg) o **(B)** cocaína (5mg/kg) + cafeína (2,5mg/kg). **(C)** comparación entre ambos grupos experimentales. Los datos están expresados como porcentaje de DA respecto a los niveles basales (Media  $\pm$  EEM). ANOVA de 2 vías seguido de Newman-Keuls *post hoc test*. N=4-6

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS II

---

El segundo objetivo de la Tesis se centró en la evaluación de la sensibilización neuroquímica del sucedáneo de PBC a través de la cuantificación de DA y sus metabolitos en el NAcc *core*. En estos experimentos se utilizó el mismo protocolo de sensibilización usado en el Objetivo 1 (Figura 5, Protocolo II), con el fin de establecer un correlato neuroquímico de los resultados observados previamente.

Los resultados obtenidos mostraron que el desafío con una inyección de cocaína indujo un aumento en los niveles extracelulares de DA tanto en el grupo pre-tratado con cocaína como en el grupo control, lo que se explica por la acción de la cocaína sobre los DAT. La cocaína bloquea los DAT presentes en la terminal pre-sináptica evitando su remoción de la hendidura sináptica, lo que genera la acumulación de DA en el espacio extracelular (Lizasoain y cols. 2002; Volkow y cols. 1997).

Llamativamente, el tratamiento con cocaína también demostró la inducción de la sensibilización neuroquímica, manifestada por un aumento de DA mayor al de los animales pre-tratados con salino. Esto resultó un hallazgo inesperado, dado que el mismo tratamiento fue incapaz de expresar la sensibilización comportamental. Numerosos reportes muestran la capacidad de cocaína de generar una potenciación DAérgica y su asociación con la sensibilización comportamental (Cadoni y cols. 2000; Cadoni y cols. 2004; Kalivas y Stewart 1991; Pettit y cols. 1990), aunque en los mismos se utilizan protocolos más largos de administración de la droga. Luego de tratamientos y abstinencias cortas como las utilizadas en esta Tesis (menor a 1 semana), se ha observado aumento, disminución y ausencia de cambios en la capacidad de psicoestimulantes como cocaína y anfetamina de elevar la DA extracelular (Pierce y Kalivas 1997). Durante la abstinencia temprana comienzan a desarrollarse cambios en la neurotransmisión de los núcleos involucrados en el circuito motivacional, que pueden diferir con períodos de abstinencia prolongados, cuando ya se encuentran consolidados los cambios asociados a la sensibilización (Pierce y Kalivas 1997). En este sentido, resulta interesante el trabajo de Vanderschuren y colaboradores (1999), el cual muestra que con pocos días de abstinencia luego de una inyección de anfetamina (3 días) existe una marcada hiperreactividad y liberación de DA en el NAcc, pero sólo un incremento marginal en la locomoción. Al evaluar estos parámetros luego de una abstinencia prolongada (3 semanas), se observa una mayor liberación de DA y una fuerte potenciación locomotora. Los autores explican este fenómeno a través de transmisión DAérgica en la CPF. Ellos encuentran un incremento importante en la liberación de DA en la CPF a los tres días de abstinencia, que decae luego de la abstinencia prolongada. El aumento de la transmisión DAérgica en la CPF actuando a través de los receptores  $D_1$  es capaz de inhibir la locomoción inducida por psicoestimulantes (Vezina y cols. 1991), por lo que los autores proponen que la

hiperactividad DAérgica en la CPF estaría ejerciendo una influencia inhibitoria en la expresión de la sensibilización comportamental, a pesar de tener niveles elevados de DA en el NAcc (Vanderschuren y cols. 1999). Un efecto similar podría estar ocurriendo en los animales tratados con cocaína por 3 días, y evaluados luego de 5 días de abstinencia. Un incremento en la transmisión DAérgica en la CPF podría estar enmascarando los efectos locomotores del aumento en la DA extracelular registrada en el NAcc *core*. Sin embargo, con los datos presentados aquí no podemos afirmar esta teoría; hace falta la realización de nuevos experimentos para evaluar la veracidad de esta explicación. Uno de los más sencillos para contestar esta pregunta podría ser la realización de microdiálisis intracerebral en la CPF para evaluar los niveles de DA extracelular en esta región con el mismo protocolo de sensibilización utilizado aquí, o evaluar si la inyección local de un antagonista de los receptores de DA  $D_1$  en la CPF en el Día Desafío permite la aparición de un aumento en la locomoción.

El tratamiento con la combinación de cocaína y cafeína también generó una sensibilización neuroquímica, la cual sí se acompañó de la sensibilización comportamental (ver Figura 12). Sin embargo, esta mayor liberación de DA en el NAcc *core* no parece ser la responsable de la potenciación locomotora observada, puesto que el incremento de DA registrado en estos animales es similar al inducido por cocaína sola, la cual no se asoció a un aumento de la locomoción. Aún más, los resultados mostraron que el grupo desafiado con cocaína + cafeína tendió a presentar una menor liberación de DA que el grupo tratado con cocaína (ver Figura 14C).

Si bien en una primera instancia puede parecer un resultado contradictorio dada la relación entre la transmisión DAérgica en el NAcc *core* y la expresión de sensibilización comportamental (Cadoni y cols. 2000), no constituye un resultado sorprendente si se considera las características de los receptores de adenosina y el mecanismo de acción de la cafeína. A nivel celular, la mayoría de los receptores  $A_1$  se localizan a nivel de la membrana pre-sináptica de las neuronas DAérgicas y glutamatérgicas, donde median la inhibición de la liberación de neurotransmisores ejercida por la adenosina. Este efecto es mediado por la activación de canales de potasio dependientes de proteína-G, lo que hiperpolariza la membrana celular, o por la inhibición de los canales de calcio, lo que evita la fusión de las vesículas sinápticas (Fredholm y cols. 1999). Sin embargo, los receptores  $A_1$  se expresan sólo de forma moderada en el NAcc (Ferré y cols. 1997), y se estima que no participan de manera significativa en los efectos de la cafeína sobre el sistema DAérgico (Fisone y cols. 2004; Fredholm y cols. 1999). La actividad del receptor  $A_1$  se piensa que es responsable de los efectos de la cafeína sobre la atención y la vigilia, actuando principalmente sobre las proyecciones colinérgicas mesopontinas (Rainnie y cols. 1994). Por otro lado, los receptores  $A_{2A}$ , fuertemente expresados en el NAcc y vinculados a la acción de la cafeína sobre la locomoción y transmisión DAérgica, se localizan en su mayoría a nivel post-sináptico (Fredholm y cols. 1999; Hobson y cols. 2012). Esto significa que los efectos de la activación de los receptores  $A_{2A}$  no son



mediados por alteraciones en la liberación de dopamina, sino por la activación de señales intracelulares a nivel post-sináptico. Los receptores  $A_{2A}$  están acoplados a las proteínas  $G_{olf}$  y  $G_s$ , las cuales aumentan la producción de AMPc mediante la activación de la enzima adenilato ciclasa. Esto lleva a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual es capaz de regular y controlar el estado de fosforilación de muchas fosfoproteínas. Una de las más relevantes en esta vía es la fosfoproteína DARPP-32 (*dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 kDa*). Cuando la PKA fosforila la DARPP-32 en la Thr34, ésta se convierte en un inhibidor selectivo de la proteína fosfatasa-1 (PP-1), lo que reduce la desfosforilación de otras proteínas. De esta forma, la DARPP-32 amplifica los efectos bioquímicos de la PKA, lo que está asociado a la activación de la vía indirecta y disminución de la actividad locomotora (Ferré 2010; Fisone y cols. 2004; Lindskog y cols. 2002). Estos efectos son opuestos a los generados por la activación del receptor  $D_2$ , con los cuales los  $A_{2A}$  co-localizan en las NEMs del NAcc y ED. El receptor  $D_2$  está negativamente acoplado a la actividad de la adenilato ciclasa, por lo que la respuesta intracelular final es un balance entre la acción DAérgica y la regulación adenosinérgica (Fisone y cols. 2004). A su vez, la activación de los  $A_{2A}$  es capaz de reducir la afinidad del receptor  $D_2$  por la DA a través de interacciones intramembranas entre los receptores (Ferré y cols. 1991). De esta forma, la cafeína anula las respuestas intracelulares de la adenosina, y favorece los efectos de la transmisión DAérgica, lo que en última instancia culmina en la desinhibición de las neuronas tálamo-corticales y la activación locomotora (Fisone y cols. 2004). Por lo tanto, la cafeína podría estar potenciando la sensibilización comportamental a través de sus acciones post-sinápticas sin alterar la transmisión DAérgica.

Estas nociones son reforzadas por el hecho de que las acciones de la cafeína contienen además un componente independiente de la DA, indicado por la observación de que el bloqueo de los receptores  $A_{2A}$  en animales deficientes de DA, aunque de forma leve aún estimula la actividad locomotora a través de sus acciones post-sinápticas y sus implicancias en la vía indirecta (Cauli y Morelli 2005).

De todas formas, hacen falta más experimentos para comprobar que la potenciación observada se debe efectivamente a los efectos post-sinápticos del receptor  $A_{2A}$ . La cuantificación del nivel de fosforilación de la DARPP-32 puede aportar pistas relevantes en este sentido.

Por otro lado, la cafeína incrementa los niveles de la vigilia (Feldman y cols. 1997), lo que podría promover la aparición de respuestas motoras. Además la misma se administró en forma sistémica, por lo que no se descarta la participación de otras regiones del SNC en la potenciación locomotora observada. La acción de la cafeína sobre áreas del sistema activador ascendente que participan en los comportamientos activos de vigilia como el núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPT) y el hipotálamo, podrían facilitar la respuesta locomotora de los animales (Ferré 2010). Particularmente, se ha evidenciado que la cafeína es capaz de remover la acción

inhibitoria de la adenosina sobre las neuronas colinérgicas del PPT que proyectan hacia el tálamo (Feldman y cols. 1997; Ferré 2010) y potenciar la actividad histaminérgica y orexinérgica en el hipotálamo (Ferré 2010; John y cols. 2014). Estas acciones favorecen los comportamientos de vigilia, por lo que deben ser considerados al estudiar el efecto locomotor integral de la cafeína.

Finalmente, vale la pena destacar un trabajo reciente de Malave y Broderick (2014), en el cual reportan una atenuación en la liberación de DA inducida por la cocaína luego de la administración de cafeína. Este fenómeno podría explicar la tendencia del grupo cocaína + cafeína a presentar una menor liberación de DA que el grupo cocaína. Sin embargo, en este estudio utilizan altas dosis de cafeína, las cuales los autores hipotetizan que puede alterar la respuesta sobre los receptores A<sub>1</sub>, generando la reducción en la liberación de DA (Malave y Broderick 2014). Son necesarios nuevos experimentos con antagonistas específicos para A<sub>1</sub> para confirmar si el efecto que observamos luego del pre-tratamiento con cocaína (5 mg/kg) + cafeína (2,5 mg/kg) se debe efectivamente a la acción sobre estos receptores.

El análisis de los metabolitos de DA reveló una caída en los niveles extracelulares de DOPAC y HVA de magnitud similar en todos los pre-tratamientos, no observándose diferencias entre los grupos pre-tratados con cocaína y la combinación de cocaína + cafeína, o entre ellos y sus controles respectivos. Esto se explica por el hecho de que la mayoría del catabolismo de la DA es mediado por la acción de la enzima monoamina oxidasa (MAO), la cual se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias dentro de la terminal sináptica. Sin importar el pre-tratamiento, luego del desafío con una inyección de cocaína o cocaína + cafeína, los DAT se encuentran bloqueados, lo que impide el ingreso de la DA al terminal sináptico. De esta forma la DA se vuelve inaccesible para la MAO, disminuyendo consecuentemente los niveles de sus metabolitos (Garrett y Soares-da-Silva 1990; Feldman y cols., 1997). Por otro lado, la DA también puede ser metabolizada por la enzima catecol-o-metiltransferasa (COMT) presente en las células gliales, lo que resulta en la formación de HVA (Meiser y cols. 2013). La disminución de los niveles de HVA indica que la cocaína también podría estar dificultando la recaptación de la DA por las células gliales.

Asimismo, considerando que no se encontraron diferencias entre los grupos de cocaína y cocaína + cafeína, este resultado sugiere que la cafeína presente en la PBC no contribuye de manera significativa al catabolismo de la DA.

La cocaína es capaz de bloquear el transportador de serotonina, y algunos estudios reportan que el tratamiento repetido con cocaína es capaz de incrementar serotonina en el NAcc (Parsons y Justice 1993), aunque su relación en la expresión de la sensibilización aún no se encuentra bien establecida (Pierce y Kalivas 1997). Con el protocolo utilizado en esta Tesis, no se registró ningún cambio en el metabolito de la serotonina 5-HIAA (también generado a partir de la enzima MAO), en ninguno de los

tratamientos, por lo que los mismos parecen no afectar la transmisión serotoninérgica en el NAcc *core*.

## RESULTADOS III

---

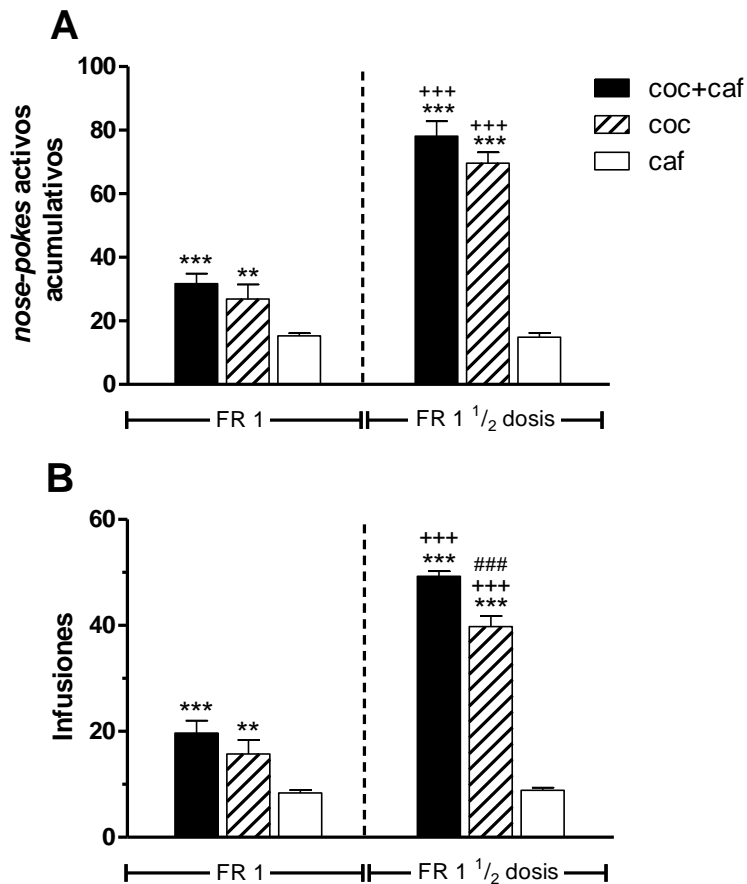
### 3. Estudio de la propiedad motivacional del sucedáneo de PBC.

**3.1** *Evaluación del efecto motivacional de la combinación de cocaína y cafeína mediante la evaluación del comportamiento de búsqueda de droga y su comparación con cocaína, utilizando el modelo de autoadministración en ratas.*

En este experimento se evaluó la propiedad motivacional del sucedáneo de PBC en comparación con cocaína. Para llevar a cabo este objetivo se utilizó un protocolo de autoadministración intravenosa con régimen progresivo en animales expuestos a cocaína (0,25 mg/kg/infusión), cafeína (0,125 mg/kg/infusión) o cocaína + cafeína (0,25 mg/kg + 0,125 mg/kg/infusión). Como se mencionó anteriormente, estas dosis, ajustadas para la administración intravenosa, mantienen la relación 2:1 de cocaína y cafeína evaluada en los objetivos anteriores.

La Figura 17 muestra el promedio del número acumulativo de *nose-pokes* activos realizados por los animales (Figura 17A) y el correspondiente número de infusiones de la droga recibidas (Figura 17B), durante la primer parte del protocolo.

En los primeros 15 días los animales estuvieron sometidos a un régimen de FR1, en el cual cada *nose-poke* en el orificio activo durante la fase de disponibilidad de la droga se correspondió con una infusión de la misma (ver Materiales y Métodos, Protocolo experimental). Como se observa en la Figura 17, los animales expuestos a cocaína y cocaína + cafeína realizaron un mayor número de *nose-pokes*, asociado a un mayor número de infusiones, que los animales expuestos a cafeína. Esto sugiere la presencia de procesos de aprendizaje y asociación entre las claves sensoriales y la acción comportamental (*nose-poke*) con el efecto reforzador de la droga. Es importante destacar que el número de *nose-pokes* es superior al número de infusiones correspondiente en cada grupo experimental. Esto se debe a que el número acumulativo de *nose-pokes* incluye aquellos correspondientes a todas las fases de las sesiones experimentales (disponibilidad de la droga, infusión y período refractario), mientras que para lograr las infusiones sólo cuentan los *nose-pokes* en la fase de disponibilidad de la droga.



**Figura 17.** Promedio del número acumulativo de *nose-pokes* activos (A) e infusiones alcanzadas (B) durante la fase de razón fija 1 (FR 1; días 1-15) y FR1 con la mitad de la dosis (FR1 1/2 dosis; días 16-20). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM. ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls *post hoc test*. \*=vs cafeína; +=vs FR1; #=vs cocaína + cafeína. \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*, +++, ###= $P < 0.001$ . N=9-12

Al reducirse la dosis a la mitad (FR1 1/2 dosis) se registró un incremento significativo del número de *nose-pokes* de los grupos cocaína y cocaína + cafeína en relación al FR1 ( $p < 0.001$ ), indicando que los animales adquirieron el comportamiento de autoadministración. El efecto de ambas drogas fue de magnitud similar. Los animales expuestos a cafeína en cambio, mantuvieron un número constante de *nose-pokes* tanto antes como después de la reducción de la dosis (Figura 17A). El mismo perfil general se observa al considerar las infusiones (Figura 17B), aunque de manera interesante y a diferencia de lo anterior, los animales expuestos a cocaína + cafeína alcanzaron en esta etapa más infusiones que el grupo cocaína ( $p < 0.001$ ).

Debido a que todas las drogas ensayadas generan hiperlocomoción, se cuantificó además el número de *nose-pokes* realizados en el orificio inactivo, con el objetivo de descartar posibles interferencias locomotoras en el análisis motivacional (Tabla 2).

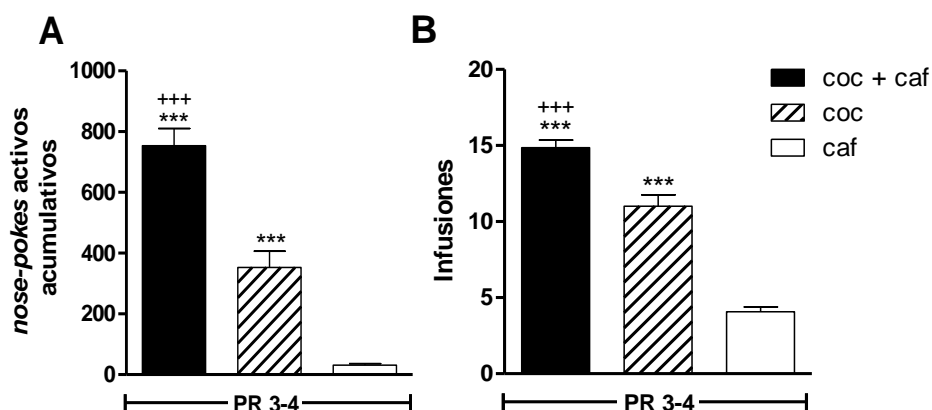
**Tabla 2.** Promedio del número de *nose-pokes* realizados durante la primer parte del protocolo de autoadministración

Tratamiento	FR1		FR1 ½ dosis	
	<i>Inactivo</i>	<i>Activo</i>	<i>Inactivo</i>	<i>Activo</i>
cocaína + cafeína	9,6 ± 1,2***	31,7 ± 3,1	6,9 ± 0,9***	78,1 ± 4,6
cocaína	6,8 ± 0,6***	26,9 ± 4,6	5,3 ± 0,4***	69,6 ± 3,7
cafeína	8,5 ± 0,6***	15,3 ± 0,8	6,9 ± 0,8***	14,9 ± 1,3

Comparación del promedio del número de *nose-pokes* realizados en cada orificio de la caja de autoadministración., durante el régimen FR 1 y FR 1 ½ dosis. Los datos están expresados como Medias ± EEM. *t-Student test*. \*=vs Activo. \*\*\*=P<0.001. N=9-12

Los resultados mostraron que en todos los casos, los animales realizaron un número significativamente menor de *nose-pokes* en el orificio inactivo en relación al activo ( $p < 0.001$ ), lo cual es un indicio de que los datos obtenidos no se deben meramente a una sobre-estimulación locomotora.

Luego del entrenamiento de los animales en la cámara de condicionamiento y la instauración del comportamiento de autoadministración, se cambió el régimen del mismo a un régimen progresivo 3-4 (PR 3-4; ver Materiales y Métodos, Protocolo Experimental). Como se puede observar en la Figura 18A, este cambio indujo un incremento importante en el número de *nose-pokes* realizados por los animales expuestos a cocaína y cocaína + cafeína en relación a la cafeína ( $p < 0.001$ ). A su vez, el grupo de cocaína + cafeína alcanzó un mayor número de *nose-pokes* que el grupo expuesto a cocaína sola ( $p < 0.001$ ). El mismo perfil se observó al analizar las infusiones alcanzadas (Figura 18B). El grupo cocaína + cafeína recibió más infusiones que el grupo cocaína ( $p < 0.001$ ), y ambos alcanzaron más infusiones que la cafeína ( $p < 0.001$ ).



**Figura 18.** Promedio del número acumulativo de *nose-pokes* activos (A) e infusiones alcanzadas (B) durante la fase de régimen progresivo 3-4 (PR 3-4; días 21-27). Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls *post hoc test*. \*=vs cafeína; +=vs cocaína. \*\*\*,+++ = P<0.001. N=9-12

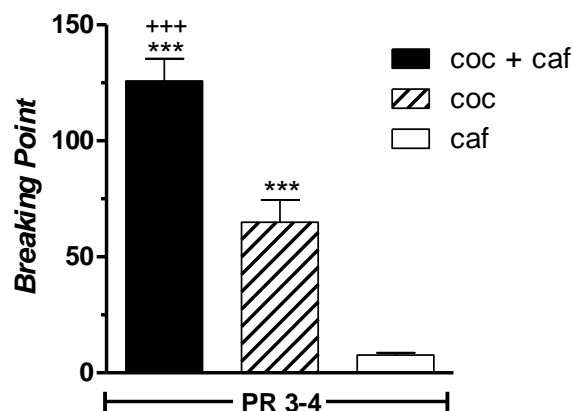
La cuantificación de los *nose-pokes* realizados en el orificio inactivo mostró que, al igual que en el régimen FR 1, durante el PR 3-4 todos los grupos efectuaron significativamente menos respuestas en el orificio inactivo que en el activo (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio del número de <i>nose-pokes</i> realizados durante el régimen progresivo		
Tratamiento	PR 3-4	
	Inactivo	Activo
cocaína + cafeína	55,9 ± 4,9***	753,4 ± 56,8
cocaína	31,2 ± 3,7***	352,6,9 ± 53,5
cafeína	9,0 ± 1,0**	31,5 ± 4,6

Comparación del promedio del número de *nose-pokes* realizados en cada orificio de la caja de autoadministración., durante el PR 3-4. Los datos están expresados como Medias ± EEM. *t-Student test*. \*=vs Activo. \*\*= $P < 0.01$ ; \*\*\*= $P < 0.001$ . N=9-12

Finalmente, durante el PR 3-4 se calculó el *breaking point*, un parámetro importante para la medición del estado motivacional por la búsqueda de droga. Este resultado se muestra en la Figura 19. De acuerdo a lo esperado, cocaína y cocaína + cafeína tuvieron un *breaking point* mayor al de cafeína ( $p < 0.001$ ). Asimismo, el *breaking point* del grupo cocaína + cafeína fue significativamente más alto al de los animales expuestos a cocaína sola ( $p < 0.001$ ).

En conjunto, estos resultados demuestran que la combinación de cocaína + cafeína actuando como sucedáneo de PBC, fue capaz de inducir una mayor búsqueda de la droga que cocaína sola.



**Figura 19.** Promedio del Punto de quiebre o *Breaking Point* de las sesiones de régimen progresivo. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls *post hoc test*. \*=vs cafeína; +=vs cocaína. \*\*\*,+++= $P < 0.001$ . N=9-12

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS III

---

En el tercer objetivo del trabajo de Tesis se utilizó el modelo de autoadministración intravenosa para evaluar la propiedad motivacional de la combinación de cocaína y cafeína, en comparación con la cocaína.

Las propiedades reforzadoras de la cocaína, así como su capacidad para generar el comportamiento de autoadministración se encuentran bien establecidas (Pettit y Justice 1989; Roberts y cols. 1980; Vanderschuren y cols. 2005). De acuerdo con esto, durante la primer etapa del protocolo los animales expuestos a cocaína y cocaína + cafeína realizaron un número mayor de *nose-pokes* y alcanzaron más infusiones que los animales expuestos a cafeína. Este resultado sugiere también que ambos tratamientos, a las dosis ensayadas, resultan recompensantes y reforzadoras para el animal. Estos dos conceptos, a menudo utilizados de manera intercambiable, hacen referencia a procesos diferentes aunque relacionados, y ambos son importantes para la instauración del comportamiento de autoadministración. La conceptualización de la recompensa abarca los componentes de aprendizaje, "*liking*" y "*wanting*", los que se manifiestan a nivel fisiológico con efectos placenteros, la posterior asociación entre el estímulo y la consecuencia, y respuestas de acercamiento hacia ese estímulo. El reforzamiento se refiere a la tendencia de un estímulo de fortalecer las asociaciones estímulo-respuesta aprendidas, por lo que un elemento reforzador (positivo) aumenta las probabilidades de que se realicen comportamientos orientados hacia la obtención de dicho estímulo (Berridge y Robinson 2003; White 1989). De esta forma, que la droga resulte recompensante es fundamental para que el animal inicie su búsqueda y los procesos de asociación entre los efectos de la droga, las claves sensoriales y la acción comportamental. El efecto reforzador también se manifiesta en esta etapa, siendo el mismo muy importante para facilitar y adquirir las conductas de autoadministración, especialmente en las primeras etapas del protocolo, bajo regímenes fijos de reforzamiento (Pickens y cols. 1978).

En la primera parte del protocolo con FR1, que incluye el entrenamiento de los animales para que aprendan la tarea, no se observaron diferencias entre los grupos tratados con cocaína y cocaína + cafeína. La cocaína, presente en ambos grupos, posee fuertes propiedades reforzadoras (Volkow y cols. 1999; Volkow y cols. 2006), por lo que no es esperable que ambos tratamientos se diferencien en esta etapa inicial.

Los animales expuestos a cafeína realizaron un número significativamente menor de *nose-pokes* en relación a los otros grupos experimentales, lo que concuerda con su propiedad reforzadora débil (Strain y Griffiths 1995) y estudios de autoadministración que muestran que la cafeína, a diferencia de otras drogas de abuso, es autoadministrada de forma consistente sólo por un porcentaje pequeño de ratas (Cauli y Morelli 2005).



El protocolo inicial de FR1 probó ser suficiente para que los animales aprendieran la tarea y adquirieran el comportamiento de autoadministración, ya que al desafiar a los mismos mediante la reducción de la dosis a la mitad (FR1 ½ dosis), los grupos cocaína y cocaína + cafeína incrementaron sus respuestas de manera significativa. Este incremento está en concordancia con los reportes que indican que los animales son capaces de regular y mantener su consumo dentro de límites estables (Gerber y Wise 1989; Richardson y Roberts 1996). Al reducirse la dosis, se hizo necesario alcanzar un mayor número de infusiones para conservar el nivel de consumo anterior. Los animales expuestos a cafeína en cambio, mantuvieron un número constante de infusiones tanto antes como después de la reducción de la dosis, lo que implica una menor búsqueda de la droga que los animales expuestos a cocaína y cocaína + cafeína. De manera interesante, durante el régimen de FR1 ½ dosis los grupos de cocaína y cocaína + cafeína presentaron un número similar de *nose-pokes*, pero el grupo cocaína + cafeína alcanzó más infusiones que cocaína (ver Figura 17). La diferencia en las infusiones sugiere un mayor poder reforzador por parte de la combinación de cocaína + cafeína, aunque esto no se acompaña del número de *nose-pokes*. Esta discrepancia puede reflejar una diferencia en la eficacia del aprendizaje operativo entre ambos grupos experimentales. Aunque realizan un número similar de *nose-pokes* totales, los animales expuestos a cocaína + cafeína podrían estar realizando un mayor número de *nose-pokes* en el momento apropiado (fase de disponibilidad de la droga) que el grupo cocaína, lo que al tratarse de un régimen de FR1, repercutiría directamente en el número de infusiones logradas. Esta observación no es menor, ya que la formación de hábitos asociados al consumo y su transformación progresiva en conductas compulsivas constituye una característica clave del proceso adictivo. Una adquisición más efectiva del hábito motor relacionado con la administración de la droga puede contribuir a la determinación un alto nivel de dependencia (Everitt y Robbins 2005; Wise 2004; Wise 2002). Sin embargo, hacen falta protocolos más largos y el análisis de patrón temporal de los *nose-pokes* en las distintas sesiones experimentales para estudiar adecuadamente el pasaje del hábito motor al hábito-compulsivo (Wise 2002). De todas formas, dado que el poder reforzador de las drogas influye en gran medida el aprendizaje operante, este resultado sugiere un mayor poder reforzador del grupo tratado con la combinación de cocaína + cafeína.

Es importante tener en cuenta que todos los tratamientos utilizados en este estudio generan hiperactividad locomotora (Feldman y cols. 1997; Hall y cols. 2009; Misra y cols. 1986), lo cual potencialmente podría interferir en el análisis del comportamiento de búsqueda de droga, realizando *nose-pokes* independientes del estado motivacional. Este no es el caso de los resultados presentados en esta Tesis, ya que los animales realizaron significativamente menos *nose-pokes* en el orificio inactivo (ver Tabla 2), lo que comprueba que los datos obtenidos no se deben a la realización azarosa de *nose-pokes* sobre el orificio activo.

La implementación del régimen progresivo 3-4 permitió diferenciar el estado motivacional por la obtención de la droga inducido por los distintos tratamientos. Puesto que durante este régimen cada infusión de la droga exige un número mayor de *nose-pokes*, es importante aclarar que los animales no logran alcanzar el nivel de consumo anterior, y es esto lo que los mantiene motivados por la búsqueda de la droga (Richardson y Roberts 1996).

Durante el PR 3-4, los animales expuestos a cocaína y cocaína + cafeína buscaron activamente la droga y demostraron estar motivados por obtenerla, evidenciado por un incremento importante en el número de *nose-pokes* realizados. De manera interesante el grupo cocaína + cafeína exhibió una mayor búsqueda de la droga, y consecuentemente, un número mayor de infusiones que el grupo cocaína. Este resultado se relaciona directamente con *breaking point*, uno de los parámetros que mejor refleja el estado motivacional de los animales por autoadministrarse la droga (Stafford y cols. 1998). El *breaking point* del grupo cocaína + cafeína demostró ser mayor al de cocaína, lo que se traduce en que los animales expuestos a cocaína + cafeína realizaron un mayor esfuerzo por alcanzar una infusión de la droga que los animales entrenados con cocaína. Esto indica que la cafeína podría estar incrementando la saliencia otorgada a la droga y potenciando su búsqueda, lo cual puede acarrear consecuencias sustanciales considerando su uso como adulterante. Estos resultados concuerdan con estudios que demuestran que la administración sistémica de agonistas del receptor de adenosina  $A_{2A}$  reduce el *breaking point* de la cocaína (Wydra y cols. 2015), y atenúa la reinstalación del comportamiento de búsqueda inducida por cocaína (Bachtell y Self 2009; Wydra y cols. 2014). Por otro lado, en el trabajo de Wydra y colaboradores (2015) no hallaron cambios en la autoadministración a cocaína con la administración de antagonistas específicos del receptor  $A_{2A}$ . A diferencia de este trabajo, en la presente Tesis se utilizó cafeína, la cual bloquea de forma no selectiva los receptores de adenosina. Es posible que sea necesario el reclutamiento de ambos tipos de receptores para evidenciar la acentuación de los comportamientos dirigidos a una meta, asociados al modelo de autoadministración. Hacen falta nuevos experimentos con antagonistas específicos para  $A_{2A}$  y  $A_1$  para comprobar este fenómeno.

En conjunto, estos hallazgos son de gran importancia, pues sugieren que los animales expuestos a cocaína + cafeína (sucedáneo de PBC) presentan una mayor motivación por la búsqueda y obtención del sucedáneo que los animales expuestos a cocaína sola. Estos resultados pueden colaborar a la comprensión de algunas de las diferencias entre el perfil clínico de los consumidores de PBC y cocaína, como la rápida dependencia e intensa búsqueda o *craving* inducida por la PBC.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

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

1) Se demostró que la administración sistémica repetida de PBC 1 generó el fenómeno de sensibilización comportamental.

2) Se profundizó en el rol de cafeína como adulterante, y se determinó que la cafeína presente en la PBC aceleró el desarrollo de la sensibilización y potenció su expresión. Se destacó la importancia de los adulterantes en los efectos de las drogas de abuso ilícitas.

3) Se evidenció que la administración sistémica repetida del sucedáneo de PBC indujo el fenómeno de sensibilización neuroquímica DAérgica en el NACC *core*

4) Los resultados neuroquímicos sugieren que la potenciación locomotora mediada por la cafeína no está mediada por un incremento en la transmisión DAérgica en el NACC *core*. Posiblemente, este efecto estaría involucrando mecanismos post-sinápticos que no impliquen cambios en los niveles extracelulares de DA. No se descarta que la potenciación DAérgica ocurra en otras regiones del SNC involucradas con la transición entre un consumo no problemático y uno dependiente.

5) El uso del modelo de autoadministración demostró que la combinación de cocaína y cafeína, como sucedáneo de PBC, posee un alto valor recompensante y reforzador para los animales, así como también un valor de incentivo: los animales buscan la droga y están motivados por obtenerla.

6) El análisis del *breaking point* comprobó que la combinación de cocaína y cafeína indujo una mayor motivación por la búsqueda de droga que la cocaína sola, reflejando una mayor saliencia de incentivo.

7) Los resultados obtenidos permiten afirmar que la composición química de la PBC es un factor importante que contribuiría al potencial adictivo de esta droga. Asimismo la cafeína, como adulterante principal, es capaz de facilitar y potenciar fenómenos claves del proceso adictivo como los son la sensibilización y la motivación por la obtención de la droga, hecho que colaboraría en la comprensión de la alta dependencia inducida por la PBC.

8) Aunque de forma indirecta, este trabajo apoya el agonismo adenosinérgico como posible estrategia terapéutica para la adicción a PBC.

## PERSPECTIVAS

---

Los resultados de la presente Tesis contribuyeron a ampliar el conocimiento sobre las acciones de la PBC en el SNC haciendo foco en los factores que contribuyen a su alto nivel de dependencia, y sobre la importancia de la cafeína en este proceso, como principal adulterante de esta droga. Como resultado de esta Tesis surgieron una serie de perspectivas a futuro, las cuales se resumen a continuación:

1) Habiéndose comprobado la sensibilización comportamental a PBC y una fuerte influencia de la cafeína en este fenómeno, resulta de interés diseccionar el rol de cada receptor de adenosina en la potenciación observada, mediante el uso de antagonistas específicos. Se espera evidenciar un rol protagónico del receptor  $A_{2A}$  en este fenómeno.

2) Queda pendiente indagar los mecanismos celulares de la potenciación de la sensibilización y comprobar si la misma se debe a las acciones post-sinápticas de la cafeína. Para esto se planea cuantificar los niveles de la proteína DARPP-32 fosforilada en el NAcc luego del tratamiento repetido con PBC y la correspondiente combinación de cocaína y cafeína. Se espera observar una disminución del nivel de fosforilación de DARPP-32 en la Thr34 luego del tratamiento repetido con PBC y su sucedáneo, respecto a animales tratados con cocaína sola.

3) Además de la DA, la transmisión glutamatérgica en el circuito motivacional también juega un rol muy importante en los procesos asociados a la búsqueda de droga y la instalación de los comportamientos adictivos (Gipson y Kalivas 2014; Kalivas y Volkow 2005). El estudio de la transmisión glutamatérgica en el NAcc mediante microdiálisis intracerebral, luego del tratamiento repetido con PBC y la correspondiente combinación de cocaína y cafeína, es fundamental para avanzar en el conocimiento de las alteraciones neuroquímicas inducidas por esta droga. Se espera registrar un incremento en los niveles extracelulares de glutamato en el NAcc luego de ambos tratamientos.

4) Con el fin de continuar profundizando en las causas de la alta dependencia inducida por PBC, se planea analizar el efecto recompensante y reforzador inducido por esta droga en relación a cocaína. Para esto utilizaremos el modelo de vocalizaciones ultrasónicas de roedores, el cual permite la medición del estado afectivo y emocional de los animales en relación a distintos estímulos externos, incluyendo las drogas de abuso (Burgdorf y Panksepp 2006; Simola y cols. 2012).

Se ha caracterizado que las ratas emiten vocalizaciones (respuesta no condicionada) en el rango de 55 KHz en presencia de estímulos apetitivos y/o placenteros, y se ha visto

que las drogas de abuso pueden alterar el número y características de las mismas (Simola y cols. 2012; Wright y Gourdon 2010). Estos experimentos requieren un complejo análisis de los sonogramas, por lo que se realizó una estadía de adiestramiento (Noviembre 2014) en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Estudios de Cagliari, Italia, bajo la colaboración de la Dra. Micaela Morelli y el el Dr. Nicola Simola, quienes poseen una vasta experiencia en la aplicación de este modelo para el estudio de drogas de abuso (Simola y cols. 2012; Simola y cols. 2013).

Esperamos determinar un mayor efecto recompensante de PBC y su sucedáneo en relación a cocaína, evidenciado por un mayor número de vocalizaciones de 55KHz.

## **TRABAJOS CIENTÍFICOS**

---

# Caffeine Enhances and Accelerates the Expression of Sensitization Induced by Coca Paste Indicating its Relevance as a Main Adulterant

José P. Prieto, Msc,<sup>1</sup> Martín Galvalisi, Msc,<sup>1</sup> Ximena López-Hill, PhD,<sup>1</sup>  
 María N. Meikle, Msc,<sup>2</sup> Juan A. Abin-Carriquiry, PhD,<sup>3</sup> Cecilia Scorza, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Neurofarmacología Experimental, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

**Background and Objectives:** Caffeine is an active adulterant found in several drugs of abuse including coca paste (CP). We had previously demonstrated that caffeine potentiated the acute stimulant effect induced by CP seized samples. The role of caffeine in the expression of sensitization elicited by a CP seized sample (CP1) was here evaluated.

**Methods:** CP1 (equivalent dose of 10 mg/kg of cocaine), cocaine (pure, 10 mg/kg), a combination of cocaine 10 mg/kg plus caffeine 2.5 mg/kg (CP1-surrogate) and saline (control) were intraperitoneally injected in male rats under two different sensitization schedules. Ambulatory locomotion was recorded in 58 animals.

**Results:** After five daily CP1 injections and 5 days of withdrawal, CP1-challenged animals displayed a more robust sensitization than cocaine-treated animals. When a 3 injections-regime of CP1-surrogate or cocaine was assayed, only CP1-surrogate was able to elicit sensitization.

**Discussion and Conclusions:** Caffeine enhances and accelerates the CP1-induced sensitization.

**Scientific Significance:** Results may shed light on the fast and high dependence observed in CP users. (Am J Addict 2015;XX:XX–XX)

crack is the most well-known form of cocaine used for smoking, CP is another smoked cocaine form commonly used in several South America countries.<sup>1–3</sup> CP can be differentiated from crack since CP is one of the earliest intermediate products obtained during the extraction of the alkaloid cocaine from coca leaves (*Erythroxylon coca*).<sup>1</sup> As a result of this chemical process, cocaine hydrochloride is reached. In contrast, cocaine hydrochloride is used as a precursor for crack preparation.<sup>4–6</sup> CP contains a high, although variable amount of cocaine (base), low proportions of chemical substances such as kerosene, sulfuric acid, benzoic acid, and other alkaloids which occur as a natural result of the extraction process.<sup>1,7</sup>

Like crack, CP is a low price drug, and although illegal, is readily available. In humans, consumption of CP produces an intense feeling of euphoria combined with psychomotor alterations. Common users of CP quickly develop a high level of dependence with high rates of relapse. Behavioral alterations such as cognitive deficits, increased levels of impulsivity, aggressiveness and sleep disturbances are also seen. These behavioral traits conform a clinical profile shared by all CP users.<sup>2,8</sup>

It has been proposed that the propensity to develop addiction to a particular drug depends on how fast the substance reaches the brain, determining the relevance of the route of administration.<sup>9,10</sup> This might be one reason why, for example, crack is thought to be more addictive than sniffed cocaine.<sup>9,11</sup> Although other factors should not be ruled out, it is possible that the pulmonary inhalation used to consume CP could partially explain the high dependence/high rates of relapse observed in CP users.

We have previously reported that, as it happens with other illicit drugs of abuse,<sup>12</sup> CP seized samples contain passive (innocuous) and active adulterants.<sup>13</sup> Among active adulterants, caffeine, a natural xanthinic alkaloid, is one of the most

## INTRODUCTION

Coca paste (CP) is an illicit drug of abuse which consumption has increased in recent years. Whilst worldwide

Received January 1, 2015; revised April 14, 2015; accepted April 26, 2015.

José P. Prieto and Martín Galvalisi contributed equally to this work.

María N. Meikle's present address: Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

Address Correspondence to Cecilia Scorza, Departamento de Neurofarmacología Experimental, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Avenida Italia 3318. 11600. Montevideo, Uruguay. E-mail: cscorza@iibce.edu.uy/scorzacecilia@gmail.com

commonly found.<sup>13</sup> In rodents, we have shown that the acute systemic administration of a series of CP seized samples obtained from police drug raids, has a significantly higher stimulant effect compared with purified cocaine (hydrochloride) administered under similar conditions (without adulterants). Interestingly, we determined that those CP seized samples adulterated with a high caffeine proportion induced the higher stimulant effect. We have proposed that the content of caffeine in CP seized samples should be taken into consideration when analyzing the pharmacological effects of CP.<sup>13</sup>

Caffeine is a legal substance consumed worldwide to improve attention and overall performance. Extensive use of caffeine may lead to the development of mild psychological and physical dependence.<sup>14</sup> Caffeine is found in many commercial products, but it is also used as an active adulterant in drugs of abuse.<sup>6,12,15–17</sup> It has been reported that street cocaine and methamphetamine contain caffeine not only to increase the volume and/or weight, but probably to enhance the reinforced property as well as the stimulant effect.<sup>12,16</sup> In addition, caffeine can be volatilized,<sup>18</sup> which would be one of the reasons why it is found as an adulterant in CP samples. However, little research on the consequences induced by caffeine in CP seized samples and the expression of the clinical profile seen in patients is available.

It is known that an initial exposure to cocaine results in an increased motor activity, which is further enhanced after repeated administration and a following withdrawal period. This phenomenon known as sensitization can produce enduring molecular, cellular and behavioral changes that resemble some addiction-related features seen in humans<sup>19–22</sup> and can predict the ability of the drug to reinstate drug-seeking behavior in rats.<sup>21,22</sup> The process of sensitization has an initiation phase in which animals display a gradual increase in the locomotion following daily cocaine administration. A second phase is characterized by a persistent hyper-responsiveness to the drug after cessation of administration and includes certain neuroadaptative modifications.<sup>21–24</sup>

The present work was designed to determine if a selected CP seized sample was able to evoke locomotor sensitization after a repeated administration schedule. As caffeine was the only active adulterant found in this CP seized sample,<sup>13</sup> its role in the rat's locomotor sensitization was also evaluated.

## METHODS

### Animals

Wistar male rats (IIBCE animal facilities, Montevideo) weighing 250–310 g were employed. All animals were housed in groups of five in plastic cages (50 cm × 37.5 cm × 21 cm) and kept under controlled conditions (temperature 22 ± 2°C, 12-hr day–night cycle, lights on at 7:00 am) with food and water available ad libitum. All procedures were approved by the IIBCE Bioethics Committee's requirements and carried out under the current national ethical regulations.

### Drugs

CP was supplied by the Technical Forensic Institute (Uruguay) from a seized drug shipment targeted for the Uruguayan illegal drug market, with the authorization of the National Drugs Board and the Ministry of Public Health (Uruguay). In the present study, CP1 was selected among a group of CP seized samples. Cocaine hydrochloride (pure) was generously donated by Laboratory Verardo & Cia (Argentina) and caffeine was obtained from Sigma Aldrich (Germany). CP1 was dissolved in a vehicle solution containing 2% hydrochloric acid (HCl) and enough sodium hydroxide to titrate the solution to a pH of = 6.3. Cocaine hydrochloride and caffeine were dissolved in saline. A previous chemical analysis indicated that CP1 contained 68.9% of cocaine base and 15.0% of caffeine. No other adulterants were found in CP1 and impurities were present in a very low proportion.<sup>13</sup> We have previously published data regarding the acute stimulant and neurochemical effect induced by this CP sample.<sup>13</sup>

### Experimental Groups

CP1 was injected at an equivalent cocaine dose of 10 mg/kg (final dose 13.0 mg/kg) and cocaine was administered at 10 and 5 mg/kg. Caffeine was administered alone at a dose of 2.5 mg/kg and the same dose (2.5 mg/kg) in combination with cocaine 10 or 5 mg/kg, respectively. Control animals were injected with the corresponding vehicles. The volume of injection was set at 1 ml/kg and corrected when equivalent doses were administered. Caffeine dose was calculated based on the percentage of caffeine content of CP1.<sup>13</sup> A previous study showed that combination of cocaine and caffeine at doses equivalent to their content in CP1 exerted the same stimulant effect and that can be used as a valid surrogate to study its effects.<sup>13</sup> Here, we used the combination of cocaine (10 mg/kg) and caffeine (2.5 mg/kg) as a CP1-surrogate.

### Behavioral Assays

Measurement of locomotor sensitization was carried out in an Open Field (OF) paradigm (a square box of 60 × 60 cm with red 40-cm-high acrylic sides) in a quiet experimental room with controlled temperature (22 ± 2°C). Locomotor activity was recorded automatically by a camera connected to a computer equipped with the Ethovision XT 7.0 software (Noldus, the Netherlands). Using this video tracking software we specifically measured the horizontal locomotor activity defined as the total distance moved in meters (m).

To study the sensitization induced by CP1 and cocaine the following experimental protocol was applied: one day preceding drug treatment, animals were habituated to the OF over a 60 min period (day 0) in which basal locomotor activity was recorded. Later, animals were randomly assigned to different experimental groups which received CP1, cocaine and their respective vehicles daily for five days (Protocol I). On day 1 and 5, before the drug or vehicle injection, animals were allowed a 20 min habituation period in the OF prior drug



injection. Locomotor activity was assessed each day for 30 min starting 5 min after the drug or vehicle administration. After the last treatment, rats were kept in their home cages for a 5 days withdrawal period. On the eleventh day, animals were put in the OF for 20 min (habituation prior the drugs injection) and then received a challenge injection according the rat pretreatment. Locomotor activity was recorded for 30 min starting 5 min after the drug or vehicle administration (Fig. 1A shows the experimental schedule).

To study the role of caffeine in the expression of the CP1-induced sensitization a surrogate of CP1 was administered. The following experimental protocol was applied: one day preceding drug treatment animals were habituated to the OF over a 60 min period (day 0) in which basal locomotor activity was recorded. Later, animals were randomly assigned to the different experimental animal groups which received cocaine (10), caffeine (2.5 mg/kg) and a combination of cocaine and caffeine i.e. Coc<sub>(10)</sub> + Caff<sub>(2.5)</sub> (as a surrogate of CP1 at an equivalent cocaine dose of 10 mg/kg) and their respective vehicles daily for 3 days (Protocol II). Only on day 1 animals were allowed a 20 min habituation period in the OF prior drug injection. Locomotor activity was recorded each day for 60 min starting 5 min after the drug or vehicle administration. After the last treatment, the rats were kept in their home cages for a 5 days withdrawal period. On the ninth day, animals were put in the OF for 20 min (habituation prior the drugs injection) and then received a challenge injection according the rat pretreatment. Locomotor activity was registered for 60 min, 5 min after the drug or vehicle administration (Fig. 1B shows the experimental schedule).

During all experiments the OF was cleaned with alcohol 30% before placing the following rat. All experiments were done between 9 am and 3 pm

### Statistical Analysis

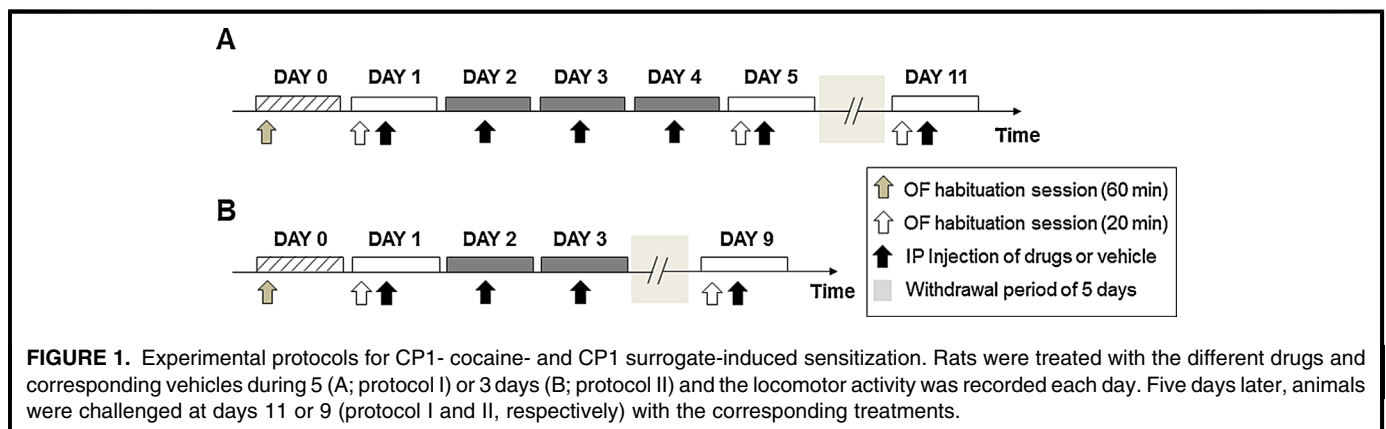
Data are given as Mean ± Standard Error of the Mean (SEM) and were analyzed by two-way (time and pretreatment) analysis of variance (ANOVA) for repeated measures

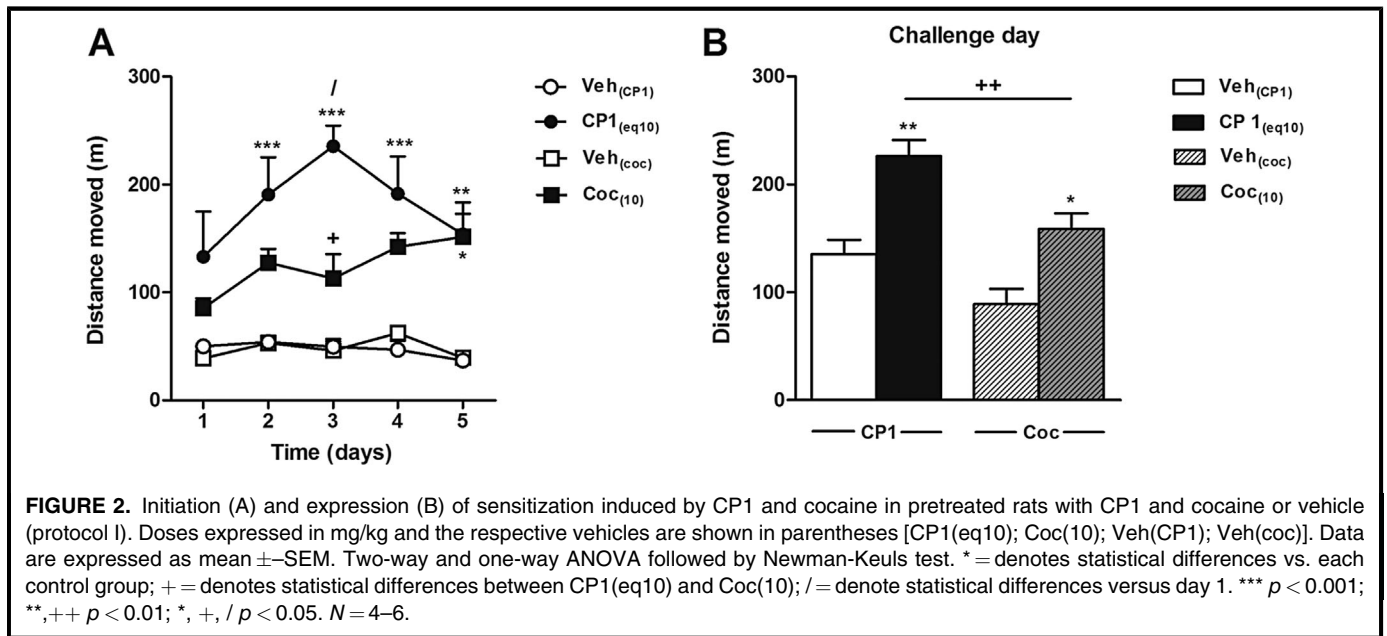
followed by post hoc Newman-Keuls multiple comparison test and by one-way ANOVA for independent measures (treatment) followed by Newman-Keuls test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### CP1- and Cocaine-Treated Animals Developed and Expressed Sensitization

Figure 2A and 2B show the effect of CP1 and cocaine treatment in locomotor activity during 5 days and on challenge day. In Fig. 2A, two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment [ $F_{(3,15)} = 35.92$ ,  $p < 0.0001$ ] but not for time [ $F_{(4,60)} = 2.05$ ,  $p = 0.09$ ] or the treatment × time interaction [ $F_{(12,60)} = 1.37$ ,  $p = 0.20$ ]. Results of post-hoc Newman-Keuls suggest that a development of sensitization was achieved after the repeated injection of CP1 and cocaine since a gradual rise in the distance moved was observed in both groups in comparison with their respective controls (Fig. 2A), although some differences were observed. In the case of CP1-treated animals the increase in the locomotor activity reached statistical significance from the second to the fifth day, whereas in cocaine-pretreated animals the effect was statistically significant only on the last day of the treatment. Additionally, a maximum difference between drugs was evidenced on the third day (Fig. 2A). In Fig. 2B, one-way ANOVA followed by Newman-Keuls revealed that both CP1- and cocaine-treated animals ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively) were able to express the sensitization phenomenon. However, a significant difference between CP1 and cocaine ( $p < 0.01$ ) could be observed. The effect of the CP1 challenge on the locomotor activity of the CP1-pretreated animals was significantly higher than that induced by cocaine injection in cocaine-pretreated animals (Fig. 2B). There were no statistical differences during the initiation or expression phase in vehicle-treated animals and challenged with both drugs (Fig. 2A and 2B).

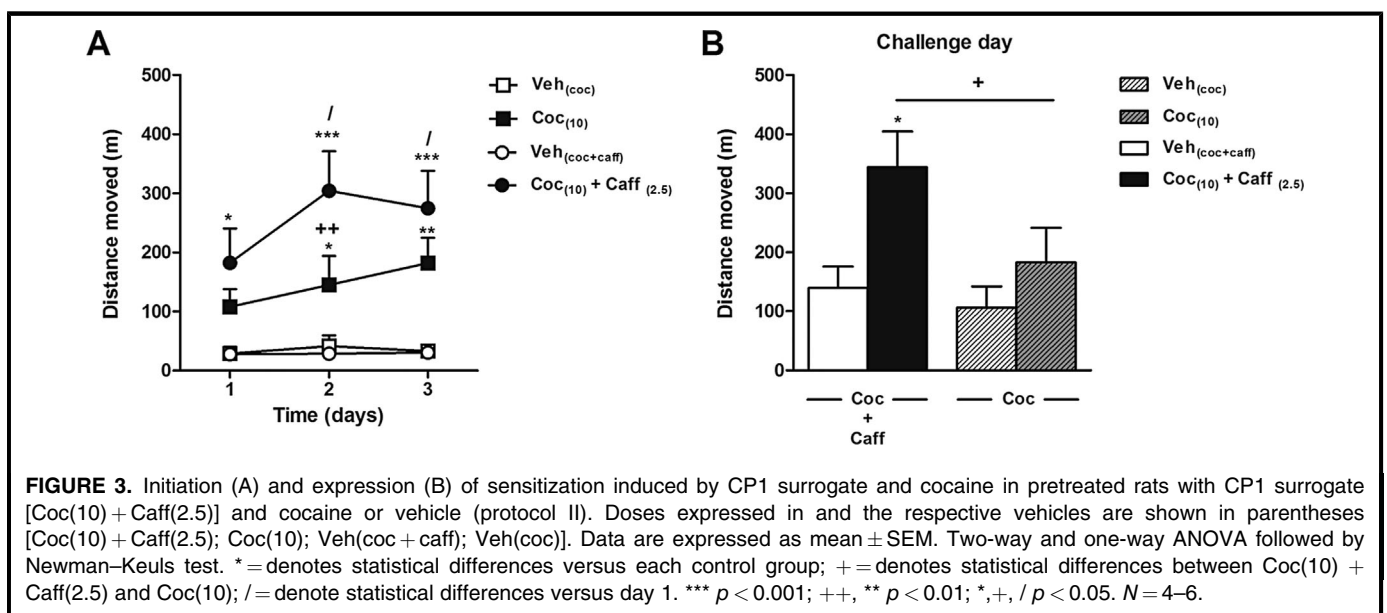




### Caffeine accelerated and enhanced the sensitization induced by cocaine

In order to confirm whether the presence of caffeine in CP1 could accelerate and enhance the development and expression of sensitization, another group of animals was treated with a combination of cocaine and caffeine at doses equivalent to their content in CP1 (i.e., CP1-surrogate) and the effect of its repeated administration on animal locomotion was compared with that induced by cocaine alone (Fig. 3A and 3B). In Fig. 3A, two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment [ $F_{(3,14)} = 13.31, p < 0.001$ ] but not for time [ $F_{(2,28)} = 3.10, p = 0.06$ ] or the treatment  $\times$  time interaction [ $F_{(6,28)} = 1.19, p = 0.33$ ]. Post-hoc Newman-Keuls showed

that the repeated injection of CP1 surrogate or cocaine was able to induced a gradual and significant increase in the distance moved along the days in comparison with their respective control groups (Fig. 3A), demonstrating a development of sensitization. A maximum difference between drugs was evidenced on the second day ( $p < 0.01$ ; Fig. 2A). In Fig. 3B, one-way ANOVA followed by Newman-Keuls revealed that while cocaine-treated animals seemed to develop sensitization (Fig. 3A) these animals did not express sensitization when challenged with cocaine (Fig. 3B). In contrast, a significant effect on the locomotor activity of CP1-surrogate-treated animals was observed compared with the control group ( $p < 0.05$ ). Moreover, CP1-surrogate induced a



more robust effect on animal locomotion compared with cocaine-challenged animals, demonstrating a great influence of caffeine in the expression of the sensitization elicited by CP1 surrogate (Fig. 3B). There were no statistical differences during the initiation or expression phase in saline-treated animals challenged with cocaine or CP1 surrogate (Fig. 3A and 3B). Moreover, sensitization was not observed in animals pre-treated with caffeine (2.5 mg/kg) or vehicle and challenged with caffeine (2.5 mg/kg; data not shown).

Accordingly with the finding obtained above and in order to continue studying the influence of caffeine in the development and expression of sensitization induced by cocaine (and indirectly by CP1), another group of animals was treated with a combination of a lower dose of cocaine (5 mg/kg) and the same dose of caffeine (2.5 mg/kg). In Fig. 4A, two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment [ $F_{(3,17)} = 31.49, p < 0.0001$ ] but not for time [ $F_{(2,34)} = 2.88, p = 0.07$ ] or the treatment  $\times$  time interaction [ $F_{(6,34)} = 1.40, p = 0.24$ ]. Post-hoc Newman-Keuls showed that only those animals treated with cocaine (5 mg/kg) plus caffeine (2.5 mg/kg) were able to developed sensitization. A gradual increase in distance moved was observed in animals treated with cocaine (5 mg/kg) plus caffeine (2.5 mg/kg) compared with the corresponding control group. Cocaine (5 mg/kg) did not modify the animal locomotion along days (Fig. 4A). In Fig. 4B, one-way ANOVA followed by Newman-Keuls revealed that only those animals which were pretreated with the combination of cocaine (5 mg/kg) plus caffeine (2.5 mg/kg) unchained the expression of sensitization (Fig. 4B). A significant increase in distance moved was observed in cocaine (5 mg/kg) plus caffeine (2.5 mg/kg)-treated animals compared with control group ( $p < 0.01$ ) and also with cocaine alone ( $p < 0.001$ ) indicating that caffeine seemed to facilitate the expression of the sensitization even in rats treated with a minor dose of cocaine. There were no

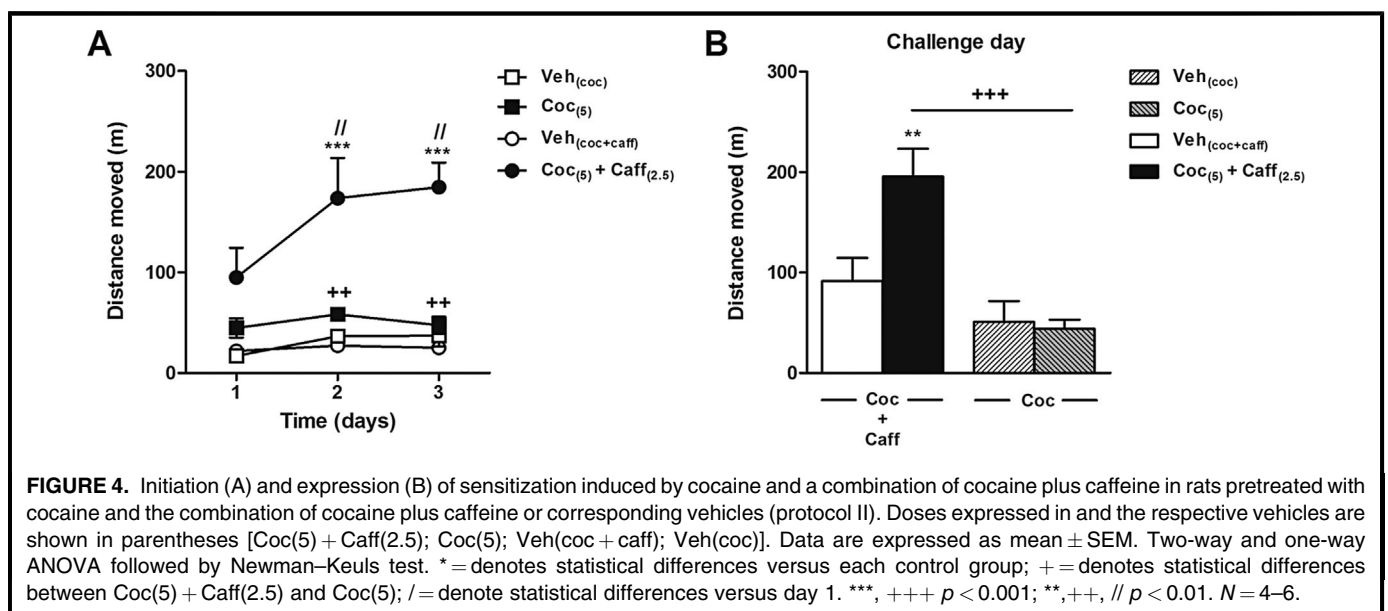
statistical differences during the initiation or expression phase in vehicle-treated animals and challenged with cocaine or cocaine plus caffeine (Fig. 4A and 4B).

## DISCUSSION

The present study demonstrated that rats repeatedly treated with CP1 displays a more robust behavioral sensitization than cocaine-treated animals suggesting an additive action of its main components, cocaine and caffeine. These observations agree with our previous report in which acute administration of a combination of cocaine and caffeine, reaching specific proportions in CP1, acted in an additive way, explaining the potent acute stimulant effect observed.<sup>13</sup> Here, we also demonstrated that the sensitization phenomenon is elicited even in animals treated with the CP1-surrogate during three days. Both are important findings since they suggest that caffeine, as an active adulterant in CP seized samples, could accelerate and enhance the neuroadaptations involved in behavioral sensitization. Considering that the occurrence of behavioral sensitization may predict the ability of a drug to induce reinstatement of drug-seeking behavior,<sup>21,22</sup> our results would add valuable information about the clinical outcome of CP consumers and the mechanisms underlying the high dependence observed in CP users.

Other studies have already demonstrated interaction between cocaine and caffeine,<sup>23–25</sup> although other paradigms were used and a pre-exposure of caffeine, even at higher doses than that used in our work, were assayed. Contrastingly, our results show the relevance of caffeine, even at a very low dose, in the induction of CP1 sensitization using a combined solution with cocaine (mimicking CP1).

Interestingly, during the development of CP1 sensitization, animals showed a progressive increase in locomotor activity



until the third day. Then, a steady decrease was observed until the level of the distance moved of cocaine pre-treated animals was reached. This is probably due to the development of caffeine tolerance as previously described.<sup>26</sup> However, this did not abolish the expression of sensitization seen on the challenge (11th) day.

Molecular events underlying the additive action between cocaine and caffeine are not elucidated here although it is most likely to be mediated through a modulation of the dopaminergic (DAergic) and adenosinergic neurotransmission. Several evidences indicate that sensitization induced by cocaine involves modifications in DA transmission.<sup>27</sup> Cocaine blocks DA reuptake increasing DA neurotransmission in different brain regions, especially those involved in motor control and reward.<sup>22</sup> Specifically, the mesolimbic DAergic system projecting from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens (NAcc) is believed to be related with the neural mechanism of sensitization, as well as the rewarding and addictive properties of cocaine.<sup>28</sup> On the other hand, caffeine is an unspecific antagonist of adenosine receptors, although it exerts its behavioral actions mainly through A1 and A2A receptors.<sup>29</sup> It is well-known that both A1 and A2A receptors co-localize with DA receptors in the NAcc medium spiny neurons influencing their activity.<sup>29,30</sup> Although the relative contribution of A1 and A2A receptors on the locomotor stimulant effect induced by caffeine has not yet been completely elucidated, some evidences suggest a predominant role of A2A receptors, especially at low caffeine doses.<sup>31</sup> Expression of A2A receptors is enriched in NAcc and dorsal striatum, while A1 receptors are widely distributed through the brain but only moderately expressed in those areas.<sup>30</sup> Additionally, it was demonstrated that the specific A2A antagonist SCH58261 but not the A1 antagonist DPCPX increased the locomotor activity in rats to a similar extent than caffeine.<sup>32</sup> A2A receptor has also been associated with the regulation of cocaine-induced behavioral sensitization.<sup>33</sup> Accordingly, our findings agree with the evidences published by Filip and collaborators who have already postulated a putative mechanism to explain the enhancement of the expression of cocaine sensitization through an interaction between adenosine A2 receptors and D2 receptors.<sup>33</sup> Further studies should be done to measure the induction of intracellular proteins (e.g., DARPP-32) or changes in protein expression of membrane receptors (A1 and A2 or D1 and D2 receptors) under the experimental protocols used in the present paper.

When cocaine is smoked effects immediately appear suggesting that the drug is taken up into the brain more rapidly than intranasal cocaine.<sup>11</sup> Although the biological and psychological effects of smoked and intranasal cocaine are similar, crack use has been associated with increased abuse<sup>9,11</sup> and the same is considered for CP consumption. Here, we demonstrated that caffeine content present in CP seized samples could potentiate the pharmacological effects induced by CP samples adulterated with caffeine. It might be suggested that under a fast route of administration (pulmonary inhalation) the use of CP seized samples containing caffeine

(or other active adulterants) produces a more robust psychostimulant effect and increases the likelihood of craving, relapse and dependence. Accordingly, it has been hypothesized that the rapid delivery of a drug to the brain facilitates its capacity to induce forms of neurobehavioral plasticity leading to a greater incentive motivation for the drug (i.e. sensitization) and contributing to its compulsive use.<sup>10</sup> Moreover, it has been reported that the production process of freebase cocaine and crack eliminated sugar and sugar alcohols (as volume adulterants) but all other cutting substances detected (e.g., caffeine, phenacetine, lidocaine, levamisol) were present in the cocaine base preparations since they were found in the smoke condensates in sufficient amounts.<sup>34</sup> This fact suggests that all these substances, especially caffeine, could reach the brain in CP consumers contributing to the addictive potential of CP.

Adulteration involves the intentional addition of pharmacologically active substances in an attempt to use less of the intended product without making the user aware. In agreement with this issue, our present results demonstrate that, although the amount of cocaine was lesser (5 mg/kg) the sensitization phenomenon also appears as the presence of caffeine (2.5 mg/kg) would compensate this decrement, boosting equally the effect of cocaine. It is extremely interesting to know that recently the percentage of caffeine found in some CP seized samples is higher than the percentage of cocaine (unpublished data), indicating once again the relevance of adulterants in drugs of abuse. In this study it was not determined if caffeine in CP seized samples really enhances the motivational value of the drug. Further experiments should be performed using specific paradigms such self-administration, to answer this question.

In conclusion, we demonstrated that the systemic and repeated administration of a CP seized sample elicited a sensitization phenomenon in rats. Our findings indicate also that the presence of caffeine substantially contribute to the development and elicitation of this phenomenon. Through this work we provide useful information about the factors implied in the pharmacological effect of CP. We also highlight the role of active adulterants commonly used in other illicit psychostimulants. Finally, our results agree with proposed mechanisms involving adenosinergic agonism for new treatment aimed to cocaine or CP addiction.<sup>35</sup>

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by *Alto Impacto Social* Grant (AIS-ANII, Uruguay) 2009/2/575, Smoked Cocaine in South Cone Countries Grant CICAD-OEA (USA) and PEDECIBA (Uruguay). José Pedro Prieto and Martín Galvalisi had postgraduate fellowships from ANII. We are grateful to Drs. Jessika Urbanavicius, Giselle Prunell and Valentina Valentini for their help and MSc. Marcela Martínez for her technical support. We also thank Dr. Ronald Mc Gregor for his help in language revision.

## Declaration of Interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

## REFERENCES

1. Castaño P. Cocaínas Fumables. *Adicciones*. 2000;12:541–550.
2. Jeri FR. The Coca Paste Epidemic in South America: Epidemiological, Clinical, Experimental and Therapeutic Observations. *Revista de la Sanidad de las Fuerzas Policiales*. 1982;43:170–179.
3. Pérez J. Clínica de la adicción a pasta base de cocaína. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría*. 2003;41:55–63.
4. Cornish JW, O'Brien Ch P. Crack cocaine abuse: An epidemic with many public health consequences. *Annu Rev Public Health*. 1996;17:259–273.
5. Nappo SA, Sanchez ZM, Ribeiro LA. Is there a crack epidemic among students in Brazil?: comments on media and public health issues. *Cad Saude Publica*. 2012;28:1643–1649.
6. Fukushima AR, Carvalho VM, Carvalho DG, et al. Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. *Forensic Sci Int*. 2014;243C:95–98.
7. ElSohly MA, Brenneisen R, Jones AB. Coca Paste: Chemical Analysis and Smoking Experiments. *J Forensic Sci*. 1991;36:93–103.
8. Pascale A, Negrin A, Laborde A. Pasta base de cocaína: experiencia del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico. *Adicciones*. 2010;22:227–232.
9. Gossop M, Griffiths P, Powis B, Strang J. Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. *Br J Addict*. 1992;87:1527–1536.
10. Samaha AN, Robinson TE. Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:82–87.
11. Hatsukami DK, Fischman MW. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *JAMA*. 1996;276:1580–1588.
12. Evrard I, Legleyeb S, Cadet-Tairoua A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *Int J Drug Policy*. 2010;21:399–406.
13. López-Hill X, Prieto JP, Meikle MN, et al. Coca-paste seized samples characterization: Chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav Brain Res*. 2011;221:134–141.
14. Morelli M, Simola N. Methylxanthines and drug dependence: A focus on interactions with substances of abuse. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;200:483–507.
15. Cole C, Jones L, McVeigh J, et al. Adulterants in illicit drugs: A review of empirical evidence. *Drug Test Anal*. 2011;3:89–96.
16. Vanattou-Saïfoudine N, McNamara R, Harkin A. Caffeine provokes adverse interactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and related psychostimulants: Mechanisms and mediators. *Br J Pharmacol*. 2012;167:946–959.
17. Zacca JJ, Botelho ED, Vieira ML, et al. Brazilian Federal Police drug chemical profiling - The PeQui Project. *Sci Justice*. 2014;54:300–306.
18. Gostic T, Klemenc S, Stefane B. A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Sci Int*. 2009;187:19–28.
19. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev*. 1993;18:247–291.
20. Robinson TE, Berridge KC. *Addiction Annu Rev Psychol*. 2003;54:25–53.
21. Vanderschuren LJ, Pierce RC. Sensitization processes in drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010;3:179–195.
22. De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, et al. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur J Neurosci*. 1998;10:3565–3571.
23. Horger BA, Wellman PJ, Morien A, et al. Caffeine exposure sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine. *Neuroreport*. 1991;2:53–56.
24. Schenk S, Horger B, Snow S. Caffeine preexposure sensitizes rats to the motor activating effects of cocaine. *Behav Pharmacol*. 1990;1:447–451.
25. Schenk S, Valadez A, Horger BA, et al. Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration. *Behav Pharmacol*. 1994;5:153–158.
26. Simola N, Cauli O, Morelli M. Sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine: Influence of individual response to caffeine. *Behav Brain Res*. 2006;172:72–79.
27. Di Chiara G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend*. 1995;38:95–137.
28. Filip M, Siwanowicz J. Implication of the nucleus accumbens shell, but not core, in the acute and sensitizing effects of cocaine in rats. *Pol J Pharmacol*. 2001;53:459–466.
29. Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: Mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:857–872.
30. Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, et al. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci*. 1997;20:482–487.
31. Yacoubi M, Ledent C, Ménard J, et al. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *Br J Pharmacol*. 2000;129:1465–1473.
32. Svenningsson P, Nomikos G, Ongini E, et al. Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience*. 1997;79:753–764.
33. Filip M, Frankowska M, Zaniwska M, et al. Involvement of adenosine A2A and dopamine receptors in the locomotor and sensitizing effects of cocaine. *Brain Res*. 2006;1077:67–80.
34. Pawlik E, Mahler H. Smoke analysis of adulterated illicit drug preparations. *Toxichem Krimtech* 2001;78:200–210.
35. O'Neill CE, Hobson BD, Levis SC, et al. Persistent reduction of cocaine seeking by pharmacological manipulation of adenosine A1 and A2A receptors during extinction training in rats. *Psychopharmacology* 2014;231:3179–3188.

## ABSTRACT DE MANUSCRITO EN PREPARACIÓN

### **Cocaine motivational value is enhanced when co-administered with caffeine: relevance of adulterants in reinforcement**

José Pedro Prieto<sup>1\*</sup>, Cecilia Scorza<sup>1\*</sup>, Gian Pietro Serra<sup>3</sup>, Valentina Perra<sup>3</sup>, Giovanna Piras<sup>3</sup>, Martín Galvalisi<sup>1</sup>, Juan Andrés Abin-Carriquiry<sup>2</sup>, Di Chiara G<sup>3,4,5</sup>, Valentina Valentini<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Neuropharmacology and <sup>2</sup>Department of Neurochemistry, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Montevideo, Uruguay, <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Italy; <sup>4</sup>Centre of Excellence “Neurobiology of Dependence”, University of Cagliari; <sup>5</sup>CNR Institute of Neuroscience, section of Cagliari, Italy. \*These authors contributed equally to this work. Corresponding author: Valentina Valentini. Email: [valenin@unica.it](mailto:valenin@unica.it)

Caffeine is one of the psychoactive substances most widely used as adulterant in illicit drugs, such as cocaine. Animal studies have demonstrated that caffeine is able to potentiate cocaine actions, although the enhancement of the cocaine reinforcing property by caffeine is less reported, and the results depend on the paradigms and experimental protocols used.

In the present study we examined the ability of caffeine to enhance the motivational and rewarding properties of cocaine using the intravenous self-administration paradigm in rats. Additionally, the role of caffeine as a primer cue during extinction was evaluated. To this end, we assessed in naïve rats: 1) the ability of the combination of cocaine (0,125 mg/kg/infusion) and caffeine (0,0625 mg/kg/infusion) to maintain self-administration in fixed ratio (FR) and progressive ratio (PR) schedules of reinforcement compared with cocaine and caffeine alone; 2) the effect of caffeine in the maintenance of responding in the animals exposed to the combination of the drugs during cocaine extinction.

Cocaine and the combination of cocaine and caffeine were self-administered on a FR and PR schedules of reinforcement, being the breaking point of the combination of the drugs higher than cocaine alone. Caffeine was not reliably self-administered, but was able to maintain a drug-seeking behavior in rats previously exposed to cocaine plus caffeine.

These findings suggest that the presence of caffeine enhances the reinforcing effects of cocaine and the motivational value of the drug. Our results highlight the role of active adulterants commonly used in illicit street drugs.

## REFERENCIAS

---

- American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Anthony J, Warner L, Kessler R. (1994) Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: basic findings from the national comorbidity survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2:244-268.
- Archer J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior*, 21: 205-235.
- Bachtell R, Self D. (2009) Effects of adenosine A2A receptor stimulation on cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 206:469-478.
- Barat S, Abdel-Rahman M. (1998) Kinetics and rat locomotor activity following cocaine and lidocaine administration. *Journal of Applied Toxicology*, 18:227-232.
- Bedingfield J, King D, Holloway F. (1998) Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 61:291-296.
- Berridge K. (2009) Wanting and liking: observations from the Neuroscience and Psychology Laboratory. *Inquiry*, 52:378-398
- Berridge K, Robinson T, Aldridge W. (2009) Dissecting components of reward: "liking", "wanting", and learning. *Current Opinion in Pharmacology*, 9:65-73.
- Berridge K, Robinson T. (2003) Parsing reward. *TRENDS in Neuroscience*, 26:507-513.
- Bojórquez E. (1991) Probable daño orgánico cerebral en consumidores de pasta de coca. *Psicoactiva*, 5:55-107.
- Bourdreau A, Wolf M. (2005) Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience*, 25:9144-9151.
- Burgdorf J, Panksepp J. (2006) The neurobiology of positive emotions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30:173-187.
- Cadoni C, Solinas M, Di Chiara G. (2000) Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. *European Journal of Pharmacology*, 388:69-76.

Cadoni C, Solinas M, Valentini V, Di Chiara G. (2003) Selective psychostimulant sensitization by food restriction: differential changes in accumbens shell and core dopamine. *European Journal of Neuroscience*, 18:2326-2334.

Carboni E, Imerato A, Perezzi L, Di Chiara G. (1989) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience*, 28:653-661.

Carr D, Sesack S. (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 20: 3864–3873.

Castaño GA. (2000) Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones*, 12:541-550.

Cauli O, Morelli M. (2002) Subchronic caffeine administration sensitizes rats to the motor-activating effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists. *Psychopharmacology*, 162:246-254.

Cauli O, Morelli M. (2005) Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology*, 16:63-77.

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

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

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

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

Daly J, Fredholm B. (1998) Caffeine - an atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 51:199-206.

De Vries T, Schoffelmeer A, Binnekade R, Mulder A, Vanderschuren L. (1998) Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *European Journal of Neuroscience*, 10:3565-3571.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza V. (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, 305:1014-1017



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

Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca M, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47:227-241.

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

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

Feldman R, Meyer J, Quenzer L. (1997) Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates. American Psychological Association.

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

Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *TRENDS in Neuroscience*, 20:482-487.

Ferré S, Von Euler G, Johansson B, Fredholm B, Fuxe K. (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88:7238-7241.

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

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

Filip M, Frankowska M, Zaniowska M, Przegaliński E, Muller CE, Agnati L, Franco R, Roberts D, Fuxe K. (2006) Involvement of adenosine A2A and dopamine receptors in the locomotor and sensitizing effects of cocaine. *Brain Research*, 1077:67-80.

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

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

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

Fredholm B, Ijzerman A, Jacobson K, Klotz K, Linden J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, 53:527-552.

Fucci N, De Giovanni N. (1998) Adulterants encountered in the illicit cocaine market. *Forensic Science International*, 95:247-252.

Fuxe K, Ferré S, Canals M, Torvinen M, Terasmaa A, Macellino D, Goldberg S, Staines W, Jacobsen K, Lluís C, Woods A, Agnati L, Franco R. (2005) Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. *Journal of Molecular Neuroscience*, 26:209-218.

Garrett B, Griffiths R. (1997) The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57:533-541.

Garrett M, Soares-da-Silva P. (1990) Role of type A and B monoamine oxidase on the formation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in tissues from the brain of the rat. *Neuropharmacology*, 29:875-879.

Gasior M, Jaszyna M, Peters J, goldberg S. (2000) Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295:1101-1111.

Gerber G, Wise R. (1989) Pharmacological regulation of intravenous cocaine and heroin self-administration in rats: a variable dose paradigm. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 32:527-531.

Gipson C, Kalivas P. (2014) More cocaine-more glutamate-more addiction. *Biological Psychiatry*, 76:765-766.

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

Gostic T, Klemenc S, Stefane B. (2009) A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Science International*, 187:19-28.

Green J, Dykstra L, Carelli R. (2015) Examination of cocaine dose in a preclinical model of natural reward devaluation by cocaine. *Behavioural Pharmacology*, 26:398-402.

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

Hall C. (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18:385-40.

Hall F, Randall-Thompson J, Sora I, Murphy D, Lesch K, Caron M, Uhl G. (2009) Cocaine-conditioned locomotion in dopamine transporter, norepinephrine transporter and 5-HT transporter knockout mice. *Neuroscience*, 162:870-880.

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

Heimer L, Alheid G, Olmos J, Groenewegen H, Haber S, Harlan R, Zahm D. (1997) The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 9:354-381.

Hobson B, Merritt K, Batchell R. (2012) Stimulation of adenosine receptors in the nucleus accumbens reverses the expression of cocaine sensitization and cross-sensitization to dopamine D2 receptors in rats. *Neuropharmacology*, 63:1172-1181.

Holtzman S, Finn I. (1988) Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 29:411-418.

Hooks M, Jones G, Liem B, Justice J. (1992) Sensitization and individual differences to ip amphetamine, cocaine, or caffeine following repeated intracranial amphetamine infusions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 43:815-823

Hooks M, Jones G, Neill D, Justice J. (1991) Individual differences in amphetamine sensitization: dose-dependent effects. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 41:203-210.

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

Hurd Y, Weiss F, Koob G, And N, Ungerstedt U. (1989) Cocaine reinforcement and extracellular dopamine overflow in rat nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, 498:199-203.

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

Ito R, Dalley J, Robbins T, Everitt B. (2002) Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behaviour under the control of a drug-associated cue. *Journal of Neuroscience*, 22:6247-6253.

Jeri F, Sanchez C, del Pozo T, Fernández M, Carbajal C. (1978) Further experience with the syndromes produced by coca paste smoking. *Bulletin on Narcotics*, 30:1-11.

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

John J, Kodama T, Siegel J. (2014) Caffeine promotes glutamate and histamine release in the posterior hypothalamus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307:R704-R710

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

Junta Nacional de Drogas (2008) Drogas más información menos riesgos. 7a Edición. Junta Nacional de Drogas, Presidencia de la República.

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

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

Kalivas P, Duffy P, DuMars L, Skinner C. (1988) Neurochemical and behavioral effects of acute and daily cocaine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 245:485-492.

Kalivas P, Duffy P. (1993) Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *Journal of Neuroscience*, 13:266-275.

Kalivas P, Sorg B, Hooks M. (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behavioral Pharmacology*, 4:315-334.

Kalivas P, Stewart J. (1991) Dopamine transmission in drug- and stress-induced behavioral sensitization. *Brain Research Reviews*, 16:223-244.

Kalivas P, Volkow N. (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, 162:1404-1413.

- Kalivas P. (2004) Recent understanding in the mechanisms of addiction. *Current Psychiatry Reports*, 6:347-351.
- Kasanetz F, Deroche-Gamonet V, Berson N, Balado E, Lafourcade M, Manzoni O, Piazza V. (2010) Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science*, 328:1709-1712
- Koob G, Le Moal M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 52-58.
- Koob G, Le Moal M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24:97-129.
- Koob G, Le Moal M. (2006) *Neurobiology of addiction*. 1<sup>st</sup> Edition, Elsevier, Academic Press.
- Koob G, Sanna P, Bloom F. (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron*, 21:467-476.
- Koob G, Simon E. (2009) The neurobiology of addiction: where we have been and where we are going. *Journal of Drug Issues*, 39:115-132.
- Koob G, Volkow N. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35:217-238.
- Kuczenski R, Segal D, Aizenstein M. (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamafine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *Journal of Neuroscience*, 11:2703-2712.
- Kuhar M, Pilotte N. (1996) Neurochemical changes in cocaine withdrawal. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 17:260-264.
- Kuribara H. (1994) Modification by caffeine of the sensitization to methamphetamine and cocaine in terms of ambulation in mice. *Life Sciences*, 55:933-940.
- Lee K, Kim Y, Kim A, Helmin K, Nairn A, Greengard P. (2006) Cocaine-induced spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:3399-3404.
- Li Y, Acerbo M, Robinson T. (2004) The induction of behavioural sensitization is associated with cocaine-induced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 20:1647-1654.
- Lindskog M, Svenningsson P, Pozzi L, Kim Y, Fienberg A, Bibb J, Fredholm B, Nairn A, Greengard P, Fisone G. (2002) Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature*, 418:774-778.

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

Lobo M, Nestler E. (2011) The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5,41: 1-11.

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

Macey D, Rice W, Freedland C, Whitlow Ch, Porrino L. (2004) Patterns of functional activity associated with cocaine self-administration in the rat change over time. *Psychopharmacology*, 172:384-392.

Malave L, Broderick P. (2014) Caffeine's attenuation of cocaine-induced dopamine release by inhibition of adenosine. *Journal of Caffeine Research*, 4:35-40.

Meikle MN, Urbanavicius J, Prunell G, Umpiérrez E, Abín-Carriquiry JA, Scorza MC. (2009) Primer estudio pre-clínico de la acción de pasta base de cocaína en el sistema nervioso central. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 73:25-36.

Meiser J, Weindl D, Hiller K. (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal*, 11:34.

Misra A, Vadlamani N, Pontani R. (1986) Effect of caffeine on cocaine locomotor stimulant activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24:761-764.

Moraes M, Scorza C, Abín-Carriquiry A, Pascale A, González G, Umpiérrez E. (2010) Consumo de pasta base de cocaína en Uruguay en el embarazo, su incidencia, características y repercusiones. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 81:100-104.

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

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

Parsons L, Justice J. (1993) Serotonin and dopamine sensitization in the nucleus accumbens, ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus following repeated cocaine administration. *Journal of Neurochemistry*, 61:1611-1619.

Pascale A, Hynes M, Cumsille F, Bares C. (2014) Consumo de pasta base de cocaína en América del Sur: revisión de los aspectos epidemiológicos y médico-toxicológicos.

Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas. Organización de los Estados Americanos.

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

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

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

Pettit H, Justice J. (1989) Dopamine in the nucleus accumbens during cocaine self-administration as studied by in vivo microdialysis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 34:899-904.

Pettit H, Pan H, Parsons L, Justice J. (1990) Extracellular concentrations of cocaine and dopamine are enhanced during chronic cocaine administration. *Journal of Neurochemistry*, 55:798-804.

Pickens R, Meisch R, Thompson T. (1978) Drug Self-administration: an analysis of the reinforcing effects of drugs. Iversen S, Snyder H (Eds.) *Handbook of Psychopharmacology*. Plenum Press, New York.

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

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

Plock N, Kloft C. (2005) Microdialysis-theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25:1-24.

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

Rainnie D, Grunze H, McCarley R, Greene R. (1994) Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. *Science* 263:689-692

Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafai R, Khaku A, Mondello S, Gold M, Kobeissy F. (2013) An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience*, 240:204-218.

Richardson N, Roberts D. (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of Neuroscience Methods*, 66:1-11.

Ridderikhof R, Van den Wildenberg W, Segalowitz S, Carter C. (2004) Neurocognitive mechanisms of cognitive control: the role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain and Cognition*, 56:129-140

Roberts D, Koob G, Klonoff P, Fibiger H. (1980) Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 12:781-787.

Robinson T, Becker J. (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Research Reviews*, 11: 157-198.

Robinson T, Berridge K. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18:247-291.

Robinson T, Berridge K. (2008) The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*, 363:3137-3146.

Robinson T, Kolb B. (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *European Journal of Neuroscience*, 11:1598-1604.

Rodriguez-Espinosa N, Fernández-Espejo E. (2015) Effects of acute and repeated cocaine on markers for neural plasticity within the mesolimbic system in rats. *Psychopharmacology*, 232:57-62.

Russo S, Dietz D, Dumitriu D, Morrison J, Malenka R, Nestler E. (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *TRENDS in Neurosciences*, 33:267-276.

Samaha A, Robinson T. (2005) Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 26:82-87.

Schenk S, Horger B, Snow S. (1990) Caffeine preexposure sensitizes rats to the motor activating effects of cocaine. *Behavioral Pharmacology*, 1:447-451.

Schenk S, Valadez A, Horger B, Snow S, Wellman P. (1994) Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration. *Behavioural Pharmacology*, 5:153-158.



- Schenk S, Worley C, McNamara C, Valadez A. (1996) Acute and repeated exposure to caffeine: effects on reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 126:17-23.
- Schultz W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36:241-263.
- Sesack S, Grace A. (2010) Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35:27-47.
- Seymour C, Wagner J. (2005) Simultaneous expression of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in individual rats. *Brain Research*, 1213:57-68.
- Simola N, Cauli O, Morelli M. (2006a) Sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine: Influence of individual response to caffeine. *Behavioural Brain Research*, 172:72-79.
- Simola N, Fenu S, Costa G, Pinna A, Plumitallo A, Morelli M. (2012) Pharmacological characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: comparison of the effects of different psychoactive drugs and relevance in drug-induced reward. *Neuropharmacology*, 63:224-234.
- Simola N, Frau L, Plumitallo A, Morelli M. (2013) Direct and long-lasting effects elicited by repeated drug administration on 50-kHz ultrasonic vocalizations are regulated differently: implications for the study of the affective properties of drugs of abuse. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17:429-441.
- Simola N, Tronci E, Pinna A, Morelli M. (2006b) Subchronic-intermittent caffeine amplifies the motor effects of amphetamine in rats. *Amino Acids*, 31:359-363.
- Stafford D, LeSage M, Glowa J. (1998) Progressive-ratio schedules of drug delivery in the analysis of drug self-administration: a review. *Psychopharmacology*, 139:169-184.
- Steketee J, Kalivas P. (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological Reviews*, 63:348-365.
- Strain E, Griffiths R. (1995) Caffeine dependence: fact of fiction? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 88:437-440.
- Surmeier J, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *TRENDS in Neuroscience*, 30:228-235.
- Svenningsson P, Nomikos G, Ongini E, Fredholm B. (1997) Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated

with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience*, 79:753-764.

Thomsen M, Caine B. (2005) Chronic Intravenous Drug Self-Administration in Rats and Mice. En: Skolnick, P. Preclinical Models of Neurologic and Psychiatric Disorders. Current Protocols in Neuroscience. Wiley & Sons, Inc.

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

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

Vanderschuren L, Ciano P, Everitt B. (2005) Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *Journal of Neuroscience*, 25:8665-8670.

Vanderschuren L, Everitt B. (2004) Drug seeking becomes compulsive after prolonged self-administration. *Science*, 305:1017-1019.

Vanderschuren L, Kalivas P. (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151:99-120.

Vanderschuren L, Pierce R. (2010) Sensitization processes in drug addiction. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 3:179–195.

Vanderschuren L, Schmdit E, De Vries T, Van Moorsel C, Tilders F, Schoffelmeer A. (1999) A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine and neurochemical sensitization in rats. *Journal of Neuroscience*, 19:9579-9586.

Vezina P, Blanc G, Glowinski J, Tassin J. (1991) Opposed behavioural outputs of increased dopamine transmission in prefrontocortical and subcortical areas: a role for the cortical D-1 dopamine receptor. *European Journal of Neuroscience*, 3:1001-1007.

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

Volkow N, Fowler J, Wang G. (1999) Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *Journal of Psychopharmacology*, 13:337-345.

- Volkow N, Wang G, Fischman M, Foltin R, Fowler J, Abumrad N, Vitkun S, Logan J, Gatley S, Pappas N, Hitzemann R, Shea C. (1997) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature*, 386:827-830.
- Volkow N, Wang G, Telang F, Fowler J, Logan J, Childress A, Jayne M, Ma Y, Wong Ch. (2006) Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *Journal of neuroscience*, 26:6583-6588.
- Walsh R, Cummins, R. (1976) The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 83:482-504.
- White N. (1989) Reward or reinforcement: what's the difference? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 13:181-186.
- Wise R, Koob G. (2014) The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacology*, 39:254-262.
- Wise R. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews*, 5:483-494.
- Wolf M. (2010) The bermuda triangle of cocaine-induced neuroadaptations. *TRENDS in Neurosciences*, 33:391-398.
- Worley Ch, Valadez A, Schenk S. (1994) Reinstatement of extinguished cocaine-taking behavior by cocaine and caffeine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48:217-221.
- Wright J, Gourdon J. (2010) Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology*, 211:1-13
- Wydra K, Golembiowska K, Suder A, Kaminska K, Fuxe K, Filip M. (2015) On the role of adenosine (A)2A receptors in cocaine-induced reward: a pharmacological and neurochemical analysis in rats. *Psychopharmacology*, 232:421-435
- Wydra K, Suder A, Borroto-Escuela D, Filip M, Fuxe K. (2014) On the role of A and D receptors in control of cocaine and foodseeking behaviors in rats. *Psychopharmacology* Nov 26.
- Yacoubi M, Ledent C, Ménard J, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois J. (2000) The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British Journal of Pharmacology*, 129:1465-1473.
- Zahm D. (1999) Functional-anatomical Implications of the Nucleus Accumbens Core and Shell Subterritories. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877:113-128.

Zahm D. (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24:85-105.

Zancheta R, Possi A, Planeta C, Marin M. (2012) Repeated administration of caffeine induces either sensitization or tolerance of locomotor stimulation depending on the environmental context. *Pharmacological Reports*, 64:70-77

## **FINANCIACIÓN**

Beca de Maestría, ANII (2013-2015)

PEDECIBA (alícuotas 2013-2014)

Proyecto Cocaínas Fumables en Países del Cono Sur, Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD) – OEA/USINL (USA) (2014-2015)